

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 8월 19일 (19.08.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/093174 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/11 (2006.01) A01H 1/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/000849
- (22) 국제출원일: 2010년 2월 11일 (11.02.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0011585 2009년 2월 12일 (12.02.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 전남대학교산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 광주광역시 북구 용봉동 300, 500-757 Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 권
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 정영희 (JOUNG, Young Hee) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 지족동 SK hub 1506 호, 350-330 Daejeon (KR). 김아영 (KIM, Ah Young) [KR/KR]; 광주광역시 북구 용봉동 139-32 삼부빌라 B 동 113 호, 500-070 Gwangju (KR). 이상협 (LEE, Sang Hyeob) [KR/KR]; 대전광역시 서구 월평

동 무지개아파트 105 동 1406 호, 302-280 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 대전광역시 서구 둔산동 949 번지 12 층 그린국제특허법률사무소, 302-120 Daejeon (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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

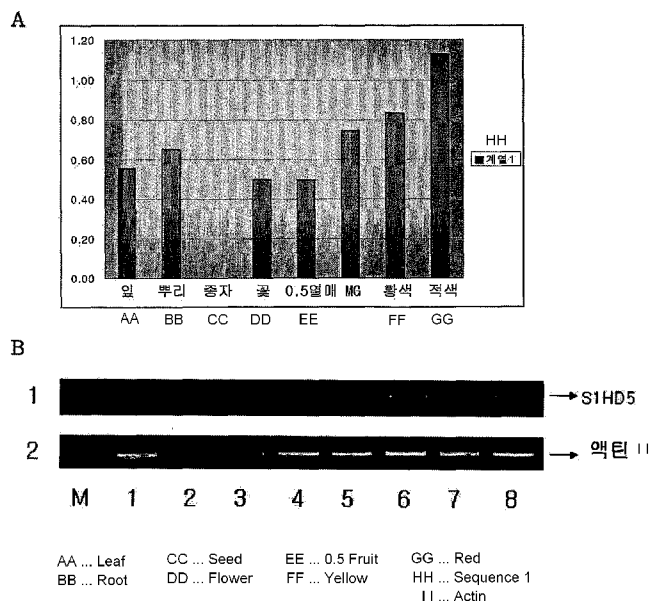
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: SOLANUM LYCOPERSICUM HISTIDINE DECARBOXYLASE GENE-DERIVED FRUIT-SPECIFIC EXPRESSION PROMOTER AND USES THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 토마토 히스티딘 디카르복실라제 유전자 유래 열매 특이적 발현 프로모터 및 이의 용도

[Fig. 5]



(57) Abstract: The present invention relates to a *Solanum lycopersicum* histidine decarboxylase-2 (SIHD-2) gene-derived fruit-specific expression promoter, to a 5' untranslated region (5'-UTR), to a (5'-UTR),-specific expression vector comprising same, to a method for the fruit-specific expression of an exotic gene using the expression vector, to a plant transformed with the expression vector, and to a seed thereof. According to the present invention, a gene introduced from a transformed plant can be specifically expressed fruit tissue as compared to the widely used conventional Cauliflower mosaic virus-derived CaMV 35S promoter which induces the expression of an exotic gene in the whole tissue. Further, the present invention can be valuably used in the development of a transformed plant, which seeks to produce valuable substances from fruit.

(57) 요약서: 본 발명은 토마토 (*Solanum lycopersicum*)의 히스티딘 디카르복실라제-2 (Histidine decarboxylase-2; SIHD-2) 유전자 유래 식물 열매 특이적 발현 프로모터 및 5' 비번역 영역 (untranslated region; 5'-UTR), 이를 포함하는 식물 열매 특이적 발현 벡터, 상기 발현 벡터를 이용하여 외래 유전자를 열매 특이적으로 발현시키는 방법, 상기 발현 벡터로 형질전환된 식물체 및 이의 종자에

관한 것이다. 본 발명에 따르면, 기존에 널리 사용되고 있는 꽃양배추 모자이크 바이러스 유래의 CaMV 35S 프로모터가 전 조직에서 외래 유전자의 발현을 유도하는 것에 비해 형질전환 식물체에서 도입된 유전자를 열매 조직 특이적으로 발현시킬 수 있다. 또한 본 발명은 유용물질을 열매에서 생산하고자 하는 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다.



BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 토마토 히스티딘 디카르복실라제 유전자 유래 열매 특이적 발현 프로모터 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 토마토 히스티딘 디카르복실라제 유전자 유래 열매 특이적 발현 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 토마토 히스티딘 디카르복실라제 유전자 유래 식물체 열매 특이적 발현 프로모터 및 5' 비번역 영역 (untranslated region; 이하 5'-UTR라 약칭함), 이를 포함하는 열매 특이적 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 형질전환된 식물체, 상기 발현 벡터를 이용하여 외래 유전자를 열매 특이적으로 발현시키는 방법 및 상기 방법에 의해 외래 유전자가 열매 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 연구 경향을 살펴보면, 기존의 원핵생물인 박테리아에서의 물질 발현에서 진핵생물인 식물로의 물질 발현으로 연구의 방향성이 변하고 있다. 이것은 진핵생물인 식물에서 얻는 물질은 훨씬 안정적으로 추출할 수 있고 또 식물체 내에서 합성이 되는 동안에 글리코실화와 같은 과정에서 물질의 변화가 박테리아에서보다 적은 확률로 나타난다 (Albert et al. J Exp Bot. 59(10): 2673-2686. Published online 2008 May 31).
- [3] 앞서 개발되어 있는 35S 프로모터는 쌍자엽식물 조직의 모든 부위에서 발현 효율이 굉장히 좋은 프로모터이다. 그래서 식물체에 유전자를 발현시키는데 있어서 가장 유용하게 사용할 수 있는 프로모터이다. 그러나, 이것은 특정 물질을 형질전환하여 원하는 조직에서 발현시키기에는 불필요한 발현으로 식물에서 느끼는 부담이 매우 크다. 그래서 토마토와 같은, 열매를 섭취하는 식물에서 줄기나 잎에서의 불필요한 발현을 줄이고 열매에서 특이적으로 발현하도록 하는 연구가 필요한 것이다. 식물을 연구하는데 있어서 가장 좋은 재료인 토마토는 과육을 전체적으로 섭취할 수 있는 식물로서 어떤 물질을 과발현시킨 후 익혀서 혹은 생 것 그대로를 섭취, 백신으로의 역할을 도모할 수 있는 좋은 재료로 각광받고 있다. 이 같은 이점에 기인하여 최근 경구용 백신 개발에 있어서 토마토 열매는 좋은 재료라는 것이 확인되고 있다 (Giovanni Levia. EMBO Rep. 2000 November 15; 1(5): 378-380). 실제로 최근 많은 백신 연구사업을 살펴보면 감자나 고구마와 같은 작물을 이용한 백신 개발이 많이 연구되고 있고, 시판되어 백신으로써 사용하고 있는 상품들이 개발되어 있다 (Mason et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1996 May 28; 93(11): 5335-5340). 그래서, 본 연구를 통해 열매 특이적으로 과발현되는 프로모터의 개발을 통해 얻고자 하는 물질의 열매특이 발현을 연구하고자 하였다.

- [4] 토마토와 같은 식물의 열매는 완전 성숙에 이루어진 후에야 그 섭취가 가능하기 때문에 성숙기에 접어든 열매에서 시작된 물질발현이 완숙기까지 유지되어진다면 훨씬 많은 양의 물질이 열매 안에 축적될 것이고 이와 같은 효과를 얻기 위해서 성숙과정 중에도 계속 발현율이 유지되거나 점점 증가하는 유전자를 선별하게 되었다.
- [5] 본 발명자는 마이크로어레이 방법을 통해서 토마토 열매의 Mature green 시기에서부터 Red 시기까지 유전자의 발현이 점점 증가하거나 혹은 유지되는 유전자들을 선별하였고, 그 중에서도 가장 발현 효율이 좋았던 유전자인 토마토 히스티딘 디카르복실라제유전자가 선별되었다. 이 유전자는 토마토 열매가 성숙되는 과정 즉, Braking이 시작되면서 발현이 축적되는 유전자로써 토마토의 열매가 익는데 관여하기 때문에 우리가 찾는 발현 효율이 좋은 프로모터로서도 적합할 것이라는 생각을 하였다.
- [6] 한국특허등록 제0784165호에는 고추식물의 병원체 감염에 대한 저항성과 고추열매의 숙성과정에 관여하는 고추식물 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제를 조절하는 프로모터가 개시되어 있으며, 한국특허등록 제0574563호에는 애기장대 유래 식물체 고효율 발현 프로모터 및 이를 함유하는 식물체 고효율 발현 벡터가 개시되어 있으나, 본 발명의 프로모터와는 상이하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 토마토 히스티딘 디카르복실라제 유전자의 프로모터 및 5'-UTR을 클로닝한 후, 프로모터 및 5'-UTR을 바이너리 벡터에 삽입하여 토마토에 도입한 결과, 형질전환 토마토의 열매 조직에서 외래 유전자가 특이적으로 발현됨을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 토마토의 히스티딘 디카르복실라제 유전자에서 유래된 열매 특이적 발현 프로모터 또는 5'-UTR을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 열매 특이적 발현 프로모터 및/또는 5'-UTR을 포함하는 열매 특이적 발현 벡터 및 상기 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 식물체 열매에서 유용 물질을 대량 생산하고자 하는 경우, 상기 열매 특이적 발현 프로모터 또는 5'-UTR을 이용하여 외래 유전자를 식물체 열매에서 발현시키는 방법을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 외래 유전자가 열매 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

발명의 효과

- [12] 본 발명에 따르면, 토마토의 히스티딘 디카르복실라제 유전자에서 유래된 열매

특이적 발현 프로모터 및 5'-UTR을 이용하여 외래 유전자를 식물체에서 발현시킨 결과, 식물체 열매에서 특이적으로 유전자를 발현시킬 수 있는 신규 프로모터임을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 SOL genomic network 데이터베이스의 마이크로어레이 데이터를 보여준다. 토마토 성숙 과정 (A) 및 SOL genomic network 데이터베이스(<http://www.sgn.cornell.edu>)의 마이크로어레이 데이터에 의한 열매 특이적으로 발현되는 유전자의 발현 프로파일링 분석 (B). DAP, days after pollination; MG, Mature green stage; B, Breaking stage.
- [14] 도 2는 SIHD-1 프로모터 영역의 분리를 위한 게놈 워킹 PCR을 보여준다. A-D, 1라운드에서 4라운드까지 각각의 게놈 워킹 PCR 산물. E, 940 bp 전장(full length) SIHD-1 프로모터의 PCR 산물. (M, size marker; 1-4, 각각 *EcoRV*, *DraI*, *PvuII*, *StuI*로 처리된 토마토 게놈 DNA 라이브러리)
- [15] 도 3은 전사 개시 부위(+1)의 5' 플랭킹 영역 upstream의 SIHD-1 프로모터 서열을 보여준다. UTR, 비번역 영역.
- [16] 도 4는 프로모터 활성 분석 벡터의 모식도이다. pCAM-2300HD (SIHD)는 전장 프로모터용 벡터이며, pCAM-2300HD Δ 630 (Δ SIHD₆₃₀) 및 pCAM-2300 Δ 310 (Δ SIHD₃₁₀)는 부분적으로 결실된 프로모터이며, pCAMBIA 1302 (35S)는 토마토에서 일시적 발현을 위한 양성 대조구이다. NOS-t, NOS terminator; 35S, CaMV35S 프로모터; GFP, 녹색형광단백질 코딩 유전자; His tag, 헥사 히스티딘 tail.
- [17] 도 5는 토마토 조직의 SIHD-2 유전자 발현을 보여준다. 토마토 조직 및 열매 발달 단계별 SIHD-1 유전자의 발현 수준. 실시간 PCR 결과 (A). 값은 앞에서 액틴을 1로 설정했을 때의 상대적인 SIHD-1 발현 수준이다. 잎(1), 뿌리(2), 종자(3), 꽃(4), 0.5cm 녹색 열매(5), MG(6), 황색 열매(7), 적색 열매(8)에 대한 RT-PCR 결과 (B). 양성 대조구는 토마토 액틴 유전자이다.
- [18] 도 6은 서던 블롯 혼성화를 보여준다. 토마토 식물로부터 분리된 게놈 DNA의 DNA 블롯을 500 bp SIHD-1 프로모터 프로브와 혼성화하였다. 레인 1 및 2에 나타난 화살표는 SIHD-1 프로모터-특이적인 밴드이다. 각 레인은 10 ug 게놈 DNA를 포함하며, HindIII (레인 1) 및 EcoRI (레인 2)로 절단된다.
- [19] 도 7은 SIHD-2 프로모터 활성의 분석 결과이다. Agro-infiltration에 따른 일시적인 발현은 SIHD-1 프로모터를 갖는 GFP 발현의 상대적인 수준은 토마토 조직에서 CaMV 35S 프로모터와 필적할만하다는 것을 보여주었다. 값은 35S-GFP를 1.00으로 설정할 때 상대적인 GFP 발현 수준이다 (A). 값은 평균을 나타낸다 (B).
- [20] 도 8은 Agro-infiltration에 따른 일시적 발현에서, SIHD-2 전장 프로모터, Δ SIHD630, Δ SIHD310 부분적으로 결실된 프로모터를 이용한 GFP 발현 수준이

토마토 완적기 열매에서 CaMV 35S 프로모터에 펠적할만하다는 것을 보여준다. 값은 평균을 나타내며, 각 구축물을 3만복으로 샘플링하였다 (GFP, 녹색형광단백질; TSP, 총 가용성 단백질; mg, 토마토 열매의 녹수기).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [21] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 도 3의 서열(서열번호 1)의 1 내지 784 (전사 개시 부위로부터 -784 내지 -1 부위)의 염기서열을 포함하는 열매 특이적 발현 프로모터를 제공한다.
- [22] 기존에 널리 사용되고 있는 꽃양배추 모자이크 바이러스 유래의 CaMV35S 프로모터가 전 조직에서 도입된 유전자를 발현시키는데 비해, 상기 본 발명의 열매 특이적 발현 프로모터는 형질전환 식물체에서 도입된 유전자를 열매 특이적으로 발현시킬 수 있다.
- [23] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 도 3의 서열(서열번호 1)의 785 내지 940 (전사 개시 부위로부터 +1 내지 +156 부위)의 염기서열을 포함하는 5'-UTR을 제공한다.
- [24] 또한, 상기 프로모터 서열 또는 5'-UTR 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 변이체는 염기 서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기 서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기 서열이다. 구체적으로, 상기 프로모터 서열 및 5'-UTR 서열은 서열번호 1의 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.
- [25] 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [26] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 식물체의 열매 특이적 발현 프로모터 및/또는 5'-UTR을 포함하는 열매 특이적 발현 벡터를 제공한다.
- [27] 본 발명의 열매 특이적 발현 벡터는 상기 본 발명의 프로모터만을 함유하거나 본 발명의 5'-UTR에 CaMV 35S 프로모터와 같은 일반 식물체 발현 프로모터를 조합하여 사용할 수도 있으나, 바람직하게는 상기 본 발명의 프로모터와 5'-UTR을 모두 포함하는 것이 식물체에서 도입 유전자를 열매 특이적으로 발현시키기에 좋다.
- [28] 본 발명의 열매 특이적 발현 벡터는 외래 유전자를 도입한 식물체 내에서 일시적으로 발현시킬 수 있는 일시적 (transient) 발현 벡터 및 외래 유전자를 도입된 식물체에서 영구적으로 발현시킬 수 있는 식물 발현 벡터로 사용할 수 있다.
- [29] 본 발명에 이용될 수 있는 바이너리 벡터는 *A. tumefaciens*의 Ti 플라스미드와 함께 존재시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 RB (right border)과 LB

(left border)을 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 자주 사용되는 pBI101(Cat#: 6018-1, Clontech, 미국), pBIN19(Genbank 수탁번호 U09365), pBI121, pCAMBIA 벡터 등을 사용하는 것이 좋다.

- [30] 본 발명의 일 구현예에 따른 열매 특이적 발현 벡터는 도 4에 도시된 pCAM-2300HD 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 프로모터를 GFP 유전자가 있는 프로모터 분석용 바이너리 벡터(pCAMBIA 1391Z)에 삽입하여 pCAM-2300HD (도 4)를 제조하여 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)을 이용한 식물 형질전환에 이용하였다. 상기 GFP 리포터 유전자를 다른 목적 외래 유전자로 치환할 수 있음은 당업자에게 자명하다.

- [31] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 제조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

- [32] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환 하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

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

- [34] 본 발명의 일 구현예에 따른 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼

- α -아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [35] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 본 발명의 열매 특이적 식물 발현 벡터로 형질전환된 대장균(*E. coli*) 또는 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)를 제공한다.
- [36] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 본 발명의 열매 특이적 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [37] 본 발명의 열매 특이적 식물 발현 벡터는 쌍자엽 혹은 단자엽 식물에 상관없이 어떤 식물체도 형질전환시킬 수 있으나, 본 발명에서는 토마토에서 형질전환을 실시하였다. 본 발명의 일 구현예에 따른 상기 식물체는 토마토, 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 또는 완두 등의 쌍자엽 식물일 수 있다.
- [38] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및(또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, *Nature* 296, 72-74; Negritiu I. et al., June 1987, *Plant Mol. Biol.* 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 *Bio/Technol.* 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, *Mol. Gen. Genet.* 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, *Nature* 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.
- [39] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다.
- [40] "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 열매, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일

수 있다.

- [41] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명의 열매 특이적 발현 벡터에 외래 유전자를 재조합하는 단계; 및
- [42] 상기 재조합된 열매 특이적 발현 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 열매 특이적으로 발현시키는 방법을 제공한다.
- [43] 상기 외래 유전자는 식물체 열매에서 발현을 원하는 어떤 유전자도 될 수 있으며, 본 발명의 열매 특이적 발현 벡터에서 상기 프로모터의 뒤에 위치하며 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다. 상기 재조합된 열매 특이적 발현 벡터를 식물체에 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같이 실시할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 상기 식물체는 토마토, 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 또는 완두 등의 쌍자엽 식물일 수 있다.
- [44] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 외래 유전자가 열매 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다. 상기 형질전환 식물체는 열매 특이적 발현 프로모터 및/또는 5'-UTR에 의해 외래 유전자를 열매 특이적으로 발현시킬 수 있다.

[45]

- [46] 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.

[47]

[48] 재료 및 방법

[49] 1. 식물 재료

- [50] 토마토 (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) 식물체는 배양실에서 24°C의 온도를 유지하였다.

[51]

[52] 2. 토마토 게놈(genomic) DNA 분리 및 5'-upstream 영역을 알아내기 위한 게놈 워킹 PCR

- [53] 토마토 게놈 DNA를 추출하기 위해, 토마토 잎 조직을 액체 질소를 이용하여 곱게 간 후, DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)의 프로토콜을 따라 추출하였다. 이후, 2.5ug의 게놈 DNA를 80 unit의 *Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II, *Stu*I를 이용하여 블런트(blunt) 말단이 생기도록 37°C에서 16시간 이상 처리하였고, 페놀:클로로포름 (1:1)으로 정제한 후 100% 에탄올을 이용하여 회수하여 20ul의 멸균 증류수에 녹였다. 이 중 4ul를 Genome walker Adaptor 단편 (clontech, USA)와 라이게이션(ligation)하였으며, Adaptor 프라이머 1(API)와 SIHD 유전자 특이적 프라이머 1(GSP1)로 1차 PCR을 수행하였으며, 반응 조성은 다음과 같다: DNA

중합효소 버퍼, 1.5mM Mg(OAc)₂, 각각 2.5mM dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 각각 10pM 프라이머 (AP1 및 SIHDGSP1); 주형으로서 1ul ligated DNA, 및 0.1U DNA 중합효소. 또한 1차 PCR 반응 조건은 94°C에서 25sec; 72°C, 3 min 조건으로 7 사이클을 수행한 후, 94°C, 25s; 67°C, 3 min 조건으로 32 사이클을 수행하였으며, 추가적으로 67°C, 7 min 1회 수행한 후, 4°C로 저하시켜 반응을 종결시켰다. 1차 PCR 생산물을 1/50 희석하여 AP2와 GSP2로 nested 2차 PCR을 수행하였으며, 반응 조성은 1차 PCR 반응 조성과 같이 수행하였으며, nested 2차 PCR의 반응은 94°C, 25s; 72°C, 3 min 조건으로 5 사이클을 수행 후, 94°C, 25s; 67°C, 3min에서 20 사이클을 수행하고, 추가적으로 67°C, 7min 1회 수행하여 4°C 저하시켜 반응 종결하였다. 이상의 PCR에 이용된 프라이머 서열은 표 1에 나타내었다. PCR 결과를 확인하고자 1% 아가로스 겔에 전기영동을 수행하였다.

[54]

[55] **3. DH5α/ *E.coli* 적격 세포 (competent cell; CP cell) 제조 및 형질전환**

[56] *E. coli* 균주 DH5α를 LB 배지 (펩톤 10g/L, 효모 추출액 5g/L, NaCl 10g/L, pH7.2) 3ml에 접종하여 37°C에서 18시간 이상 진탕 배양한 후, 100ml LB 액체 배지에 계대배양하여 600 nm에서 O.D 값이 0.4~0.45까지 배양하였다. 배양액을 얼음에 15분간 방치한 후, 4°C에서 4000rpm으로 20분간 원심분리하여 회수하였다. 회수한 *E. coli*를 ice-cold 80mM MgCl₂-20mM CaCl₂ 용액에 처리하였다. 이를 얼음에 15분간 둔 후, 4000rpm/4°C으로 20분간 원심분리하여 ice-cold 0.1M CaCl₂ 용액 2ml에 처리한 후 형질전환에 이용하였다. 즉시 사용할 경우에는 30분간 얼음에 둔 후 사용하였고, 그렇지 않은 경우는 15~20% 글리세롤을 첨가하여 -70°C에 보관하였다.

[57] 적격 세포에 DNA를 섞은 후, 얼음에 30분 이상 둔 후, 42°C에서 90초간 덥으로써 열 충격을 가한 후, 항생제가 함유되어 있지 않은 LB 액체 배지 1ml을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이후, 항생제가 함유된 LB 배지에 도말하여 형질전환된 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니는 배양하여 Accuprep. mini kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 플라스미드를 분리한 후, 제한효소를 이용하여 확인하였다.

[58]

[59] **4. 아그로박테리움 (*Agrobacterium*) 적격 세포 제조 및 형질전환**

[60] 아그로박테리움을 YEP (효모 추출액 10g/L, 펩톤 10g/L, NaCl 5g/L, pH7.2) 액체 배지 5ml에 접종하여 28°C에서 진탕 배양한 후, 배양한 1ml을 50ml YEP 액체 배지에 계대하여 600 nm에서 O.D 값이 0.6~1.0이 될 때까지 배양하였다. 이를 30분간 얼음에 둔 후, 4000rpm/4°C으로 20분간 원심분리하여 ice-cold 0.15M NaCl에 재부유킨 후, 얼음에 10분간 두었다. 그 후, 4000rpm/4°C으로 20분간 원심분리하여 재회수된 펠렛은 1ml의 20mM CaCl₂에 재부유시켜 50ul씩 분주하였다. 이를 액체 질소에 급냉동하여 -70°C에 보관하였다.

[61] 보관되어 있던 적격 세포에 DNA 1ug을 섞은 후 액체질소에 2분간 얼린 후,

5분간 37°C에서 열 충격을 주었고, 가볍게 섞어준 후, 앞 과정을 1회 반복하였다. 그 후, 얼음에 30분간 둔 후, YEP 액체 배지 1ml을 넣어주고, 28°C에서 2시간 동안 배양한 후 Rif 50mg/L, Km 50mg/L 가 포함된 YEP 고체배지에 도말하여 형질전환된 콜로니를 선별하였다.

[62]

[63] **5. SIHD 프로모터 영역의 재조합 벡터**

[64] SIHD 프로모터 영역은 게놈 위킹 PCR에 의해 1kb 지역을 밝혀내었고, 이를 SIHD F 프라이머와 SIHD R 프라이머로 PCR하여, 이를 pCAMBIA1391Z에 재조합하기 위해 HindIII과 BamHI 효소로 자른 후, T4 ligase에 의해 24°C에서 3시간 라이게이션하였고, DH5 α /*E.coli* 적격 세포에 형질전환하여, LB+Km 50mg/L 아가 플레이트에서 선별하여 이를 HindIII과BamHI 효소로 잘라 확인하였으며, 플라스미드를 추출하였다. 추출된 플라스미드는 *Agrobacterium* LBA4404 균주 적격 세포에 형질전환하여, YEP + Rif 50mg/L + Km 50mg/L 아가 플레이트에서 선별하여, 이를 Agro-infiltration을 이용한 식물 형질전환에 이용하였다.

[65] 토마토 일시적 발현 분석(transient expression assay)을 수행하기 위해, pCAMBIA2300에 GFP가 융합된 벡터에 SIHD 프로모터 영역을 위와 같은 방법으로 재조합하였고, *Agrobacterium* strain LBA4404 적격 세포에 형질전환하였다. 또한, cis-acting element의 역할과 발현 수준을 확인하기 위해, deletion test를 수행하고자, SIHD 프로모터 영역을 -480/+156 영역과 -155/+156 영역으로 각각 재조합하였다. 먼저, 각각의 영역을 전장(full length)에서 Δ SIHD630 프라이머와 Δ SIHD310 프라이머를 SIHD 역방향 프라이머와 함께 PCR하여, HindIII과 BamHI 효소로 잘라 pCAMBIA2300-GFP 벡터에 재조합하였고, 이를 *Agrobacterium* strain LBA4404 적격 세포에 형질전환하였다. 클로닝에 이용한 프라이머 서열은 표 1에 나타내었다.

[66]

[67] **6. RNA 추출 및 실시간 PCR**

[68] RNA는 실시간 PCR에 사용하기 위해 추출하였다. TRI REAGENT를 이용하여 토마토의 0.5cm 직경 green, mature green, breaking, red ripe stage 그리고 잎에서 각각 50mg의 시료를 곱게 간 후 사용하였다. TRI 시약은 먼저 50mg의 토마토 조직을 균질화한 후에 1ml의 TRI 시약을 넣는다. 볼텍싱하고 실온에서 5분간 둔다. 0.2ml의 클로로포름을 넣고 격렬하게 혼합한다. 실온에서 15분 둔 후 원심분리를 4°C에서 12000rpm으로 15분간 수행한다. 수성상(aqueous phase) 0.5ml을 새 튜브로 옮기고 0.5ml의 이소프로판올을 넣고 잘 섞어준다. 실온에서 10분간 둔 후에 원심분리를 4°C에서 12000rpm으로 15분간 수행한다. 상등액을 버리고 RNA 펠렛만 75% EtOH 0.5ml로 세정한다. 이 펠렛은 DEPC가 들어간 물 20ul에 잘 녹여 준다.

[69] RT-PCR 은 앞에서 추출된 RNA를 사용한다. RNA 1ug를 정량하여 각각

프라이머와 섞은 후에 실험한다. SYBR Green Master Mix kit를 사용하였다 (QuantiTect SYBR Green PCR Handbook. WWW.QIAGEN.COM). 실시간 PCR 프로그램은 열 변성을 15분 동안 94°C에서 한 후에 사이클 조건을 94°C에서 1분 동안 52°C에서 1분 동안 그리고 72°C에서 30초 동안 설정하여 40 사이클을 수행하였다. 프라이머는 *SIHD* 엑손과 3'-UTR 특이적 프라이머 세트를 제작하여 수행되었고, 양성 대조구로 토마토 액틴 유전자의 프라이머를 사용하여 PCR 후 사용되었다.

[70]

[71] 7. 서던 블롯 혼성화

[72] 토마토 게놈 DNA 20ug을 사용하였다. *SIHD*-2 유전자 프로모터는 서던 블롯 DIG 프로브 합성 키트(Rochi)를 이용해서 이미 알고 있는 유전자를 이용해 새로이 알아낸 5'-upstream 360bp의 길이의 DNA를 DIG 프로브 합성 키트를 사용하여 PCR하였다. 이 결과물을 확인한 후에 서던 블롯을 수행하였다. DNA를 로딩하기 전에 이미 제작된 프라이머를 사용하여 DIG 프로브를 합성하여 준비한다. 그리고 토마토의 잎에서 전체 게놈 DNA를 추출하였고, DNA 20ug을 각각 *Hind*III, *Eco*R I처리 후에 0.8% 아가로스 겔에 로딩하였다. 25V에서 5시간 전기영동한다. 전기영동이 끝나면 겔의 DNA를 진공을 사용하여 셀룰로스 막 (Hybond N+, Amersham)에 DNA를 Transfer하고 혼성화하여 그 결과를 보았다. 진공 장치에 막 (Hybond N+, Amersham)과 겔을 겹쳐 놓은 후 장치를 작동시키고 겔 위에 0.25M HCl 30ml을 붓는다. 10분 동안 반응시킨다. 변성 용액 (denaturation solution)(0.4N NaOH) 50ml을 붓고 20분 반응시킨다. 중화 용액 (0.2M Tris-HCl pH7.5)을 50ml 붓고 20분 반응시킨다. 다음 Transfer 단계는 Transfer solution을 30분마다 충전하는 방식으로 2시간 동안 수행한다. DIG 프로브 항체를 사용하여 검출한 후에 발색시키는 방법으로 실험하였다. 혼성화는 혼성화 용액 (5xSSC, 0.02% SDS, 0.1% N-라우로일 사르코신 Na-salt, 1% Blocking reagent)에 예비혼성화를 1시간 수행한다. 그 후에 DIG으로 라벨한 DNA 프로브를 예비혼성화 용액을 버리고 프로브 용액 25ml을 충전한다. 24시간 후에 프로브 용액을 제거하고 2xSSC, 0.1% SDS 용액으로 상온에서 5분간 세정한다. 2xSSC, 0.5% SDS 용액(20ml)으로 시약을 바꾼 후 예비혼성화 단계와 같은 온도로 15분간 두 번 세정한다. 면역학적 검출 단계는 세정 버퍼 (0.1M 말레산, 0.15M NaCl pH 7.5, 0.3% Tween 20)를 이용하여 상온에서 5분간 세정한다. 10x 블로킹 용액 (블로킹 시약, 말레산 버퍼)과 말레산 버퍼 (0.1M 말레산, 0.15M NaCl, NaOH로 pH 7.5로 조정)를 1:9로 혼합한 후에 상온에서 30분간 인큐베이션한다. 1:9로 혼합한 블로킹 버퍼에 항-디곡시제닌-AP를 첨가(20ml 블로킹 버퍼일 때 4ul 항-디곡시제닌-AP)하여 상온에서 30분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 세정 버퍼 100ml로 상온에서 15분간 두 번 세정한다. 그 다음 검출 버퍼 (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl) 20ml을 상온에서 5분 처리한다. 이 검출 버퍼에 200ul NBT/BCIP를 첨가한다 (200ul NBT/BCIP/검출 버퍼 10ml). 상온에서 16시간 이상

반응시킨다.

[73]

[74] **8. 일시적 발현 분석 (Transient expression assay)**

[75] 일시적 발현 분석을 수행하기 위해 *Agrobacterium* LBA4404 균주를 전배양하여, 200uM 아세토시린곤이 들어간 20ml의 YEP 액체 배지에 계대 배양하여 O.D = ~0.7까지 키운 후, 4500rpm/4°C에서 20분간 원심 분리하여 회수한 세포를 200uM 아세토시린곤이 첨가된 1/2MS 배지 (MS 2.2g, 2% 수크로스, pH5.7) 20ml에 재부유시켜 이를 토마토의 종자에 주사기를 이용하여 아그로박테리움 감염시키고, 잎과 열매 조직에 침윤(Agroinfiltration)하였다. 시료는 2.5일 뒤에 채취하였고, 이를 단백질 추출 버퍼 (PEB)와 함께 간 후, 15000rpm/4°C에서 30분간 원심분리하여 준비하여, His tag 단클론 항체를 이용한 ELISA 방법을 통해 발현량을 확인하였으며, 아그로박테리움 균 자체에서 발현되는 GUS 발현량을 기준으로 nomalization하였다.

[76]

[77] **9. ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)**

[78] 시료를 단백질 코팅 버퍼 (PCB, 3.3g/L Na₂CO₃, 6.0g/LNaHCO₃, pH9.6)와 함께 분쇄한 후, 4°C에서 15000rpm으로 원심분리하여 상층액을 96 웰 마이크로플레이트에 100ul 분주하여 이를 상온에 2시간 두었다. 이후, 단백질 추출 버퍼 (PEB, 1.16g/L Na₂HPO₄, 0.1g/LKCl, 0.1g/LK₃PO₄, 4.0g/LNaCl, pH7.4)로 세정하고, 블로킹 버퍼 (5% skim milk) 200ul를 분주하여 상온에 2시간 두었다. 이후, 이를 2차례 PEB로 세정한 후, 10⁻⁷으로 희석한 1차 항체 (novagen, Germenty)를 50ul씩 분주하여 상온에 2시간 동안 두어 원하고자 하는 단백질간의 상호 작용이 잘 일어날 수 있도록 하였다. 이후, 4차례 이상 PEB로 세정하여 준 후, 2차 His tag 단클론 항체 (sigma, USA)를 1:2000 PEB로 희석하여 50ul씩 분주하였다. 반응은 1시간 동안 실온에 두었으며, 이를 4차례 PEB로 세정하여 준 후, 기질 용액 (BD bioscience, USA) 50ul를 분주하고, 30분간 상온에 둔 후, stop solution (2.5M H₂SO₄) 50ul를 분주하여 반응을 종결시켰다. 이를 450nm의 흡광으로 그 값을 측정하였다 (Konrad Birkhaug. Am J Public Health Nations Health. 1950 May; 40(5): 545-554).

[79]

[80] **실시예 1. 열매 특이적 발현 유전자군 선별**

[81] SOL genomic network 데이터베이스 (<http://www.sgn.cornell.edu>)의 토마토 마이크로어레이 결과에서 열매의 성숙함에 따라 발현이 증가되는 총 11개의 유전자를 선택하였다 (도 1). 선별된 유전자의 3'UTR 부분과 엑손 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하여 실제로 열매에서 발현율이 좋은지 RT-PCR을 사용하여 mRNA의 발현율을 조사한 결과, 토마토의 *Histidine decarboxylase-1*, -2 (SIHD-1, SIHD-2) 및 *lipoxigenase*, *Guanine nucleotide-Binding protein beta subunit* (GBB) 유전자의 경우 녹수기(mature green stage)에서부터 완적기(red ripe

stage)까지 발현율이 점차 증가되었다.

[82]

[83] 실시예 2. 게놈 워킹 (Genome Walking)

[84] 마이크로어레이 결과 찾아낸 11개의 유전자를 모두 게놈 워킹 PCR을 이용하여 프로모터 부위를 알아내는 실험을 하였다. 먼저 이미 알고 있는 유전자 정보를 이용하여 유전자 특이적인 프라이머 GSP1과 GSP2를 제작하였고, 이 프라이머와 게놈 워킹 키트에 있는 Adaptor 특이적인 프라이머 AP1, AP2를 이용하여 게놈 워킹 라이브러리에서 PCR를 수행하였다. SIHD-1, SIHD-2, GBB 유전자로부터 약 1 kb 이상의 putative 프로모터 부분을 분리하였다. 예비실험으로 분리된 putative 프로모터의 활성을 일시적 발현 분석 방법으로 토마토 열매에서 확인한 결과, SIHD-2 프로모터만이 열매 특이적인 발현 양상을 보였다. SIHD-2 유전자의 게놈 워킹 PCR에 사용된 프라이머 세트는 표 1에 나타내었다. 표 1에서, GSP 및 AP 프라이머를 게놈 워킹 PCR에 이용하였으며, SIHD Fwd/Rvs, ΔS1HD630, ΔS1HD310 프라이머를 전장 및 부분적으로 결실된 프로모터 영역의 증폭에 이용하였으며, Fwd/Rvs 프라이머를 실시간 PCR 분석에 이용하였다.

[85]

[86] 표 1. SIHD-1 프로모터 분리를 위한 프라이머.

[87]

Genome walking PCR primers	
AP1	5'-GTAATACGACTCACTATCGGGC-3'(서열번호 2)
AP2	5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'(서열번호 3)
1 Round PCR	GSP1 5'-AATGCCACAAGGCATTGGACATCCCAA-3'(서열번호 4)
	GSP2 5'-CATCCCAAGAATTTGTGCCCTGAAATTG-3'(서열번호 5)
2 Round PCR	GSP1 5'-ATGGAGATTGCCCTCAGTGCCACCAC-3'(서열번호 6)
	5'-CTGTAGGGTGCTGAGTAAAGGGGTCTCCAC-3'(서열번호 7)
3 Round PCR	GSP1 5'-GAGGAGAGAGGCGAGCGAGAGAGGGT-3'(서열번호 8)
	5'-TCTCTATCTCCATGCGGTAGAGAGGTTGTGTCTT-3'(서열번호 9)
4 Round PCR	GSP1 5'-CGTTGATTCCAGTTTTTGTTCGAC-3'(서열번호 10)
	5'-AATTTAATATATAATGTACTAGTATGATTT-3'(서열번호 11)
Full length primers	
SIHD Fwd	5'-TAAGCTTAGCCACTATATTTATTTTAC-3'(서열번호 12)
	<i>HindIII</i>
Rvs	5'-AGGATCCGTTCAATTCTTCGGAAGATG-3'(서열번호 13)
	<i>BamHI</i>
Deletion test primers	
ΔS1HD630	5'-TAAGCTTCATTGAAAGGRGRGGAT-3'(서열번호 14)
ΔS1HD310	5'-TAAGCTTGAGGCAATTATTCTCATC-3'(서열번호 15)
Real-Time PCR primers	
Fwd	5'-CATTGCGATGCAGCATTATGTG-3'(서열번호 16)
Rvs	5'-TTCAAGTCATGGTRTCCAAGGAGT-3'(서열번호 17)

[88] * 밑줄친 부분은 제한효소 자리를 나타낸다.

[89]

[90] 4 round의 게놈 워킹 PCR에 의해 SIHD-2의 156 bp 5' 비번역 영역 (5'UTR)과 784 bp의 프로모터 부위를 찾았으며 (도 2의 A,B,C,D), 이를 바탕으로 contig 염기서열을 구성한 뒤 SIHD Fwd/Rvs 프라이머를 제작하였다. 이들 프라이머를 이용하여 토마토 게놈 DNA에서 5'UTR이 포함된 약 940 bp 프로모터 부위를 증폭하였다 (도 2의 E). 증폭된 SIHD-2 프로모터 부위를 pGEM-T 벡터에 재조합하여 염기서열을 확인하고, PLANTCARE (www.plantcare.com) 시스템을 통해 SIHD-2 프로모터 부위를 분석한 결과 다양한 cis-acting 조절인자들을 찾아내었다. Minimal 프로모터 영역은 -70과 -30 위치에 각각 CAT box와 TATA box가 존재함으로서 추정되어 진다. 이외에도 SIHD-2 프로모터의 염기서열상에서 -780 부위에 CAT box, -390 부위의 TGACG box 등의 cis acting 조절인자들이 분석되었다(도 3).

[91]

[92] 실시예 3. 토마토 조직에서 SIHD-2 유전자의 발현

[93] 토마토의 잎, 종자, 줄기, 꽃 조직과 성숙 단계별 열매 조직에서 RNA를 추출하여 실시간 PCR과 RT-PCR을 수행한 결과, SIHD-2 발현은 완적기의 열매를 제외한 나머지 조직에서는 액틴보다 낮은 수치를 나타내었다. 하지만 열매가 성숙됨에 따라 발현량이 점진적으로 증가하여 완적기에서 가장 높은 발현량을 나타냈으며 이 발현량은 액틴 발현량 보다 높은 수치를 보였다 (도 5). 이로서 SIHD-2 유전자는 열매 특이적으로 발현되고 있고 또한 열매의 성숙이 진행됨에 따라 발현이 증가되는 유전자임을 알 수 있었다.

[94]

[95] 실시예 4. 서던 블롯 혼성화

[96] *Histidine decarboxylase* 유전자는 토마토에서 여러 패밀리로 존재한다. SIHD-2 프로모터가 토마토 게놈에서 몇 카피로 존재하는지를 알기 위해서 서던 블롯을 수행하였다. HindIII를 처리한 시료는 6kb의 위치에서 한 개의 밴드를 볼 수 있었고, EcoRI를 처리한 시료에서는 4kb의 위치에서 또한 한 개의 밴드를 볼 수 있었다 (도 6). 이 결과는 SIHD-2 유전자의 프로모터는 토마토 게놈에서 1 카피로 존재함을 보여준다.

[97]

[98] 실시예 5. SIHD-2 프로모터 활성 분석

[99] SIHD-2 유전자 프로모터 부위를 증폭하여 GFP C-말단 부위에 Hexa-histidin tail이 융합되어 있는 pCAMBIA2300-GFP 플라스미드에 재조합하여 pCAM-2300HD 벡터를 제작하여 프로모터 활성분석에 이용하였다 (도 4). 재조합된 pCAM-2300HD를 포함하고 있는 *Agrobacterium*을 토마토 조직에 Agro-infiltration 방법으로 주입한 후 2-3일 후 조직에서 일시적으로 발현되는 GFP 양을 확인하였다. 각각의 조직에서 CaMV35S 프로모터의 조절을 받는 GFP 유전자 (pCAMBIA 1302)의 발현양을 1.00으로 보고 SIHD-2 프로모터 상대적인 활성을 비교해 본 결과, 잎 조직에서는 SIHD-2의 활성이 35S 프로모터에 비해

0.5배 정도로 낮은데 반해 완적기의 열매에서는 2배 이상 높아짐을 볼 수 있었다 (도 7의 A). 또한 잎 조직에 비해 완적기의 열매에서 약 2.5배 정도의 높은 발현양을 보여주고 있고 이런 결과는 35S 활성이 잎 조직과 비교하여 완적기의 열매에서는 50% 수준으로 떨어지는 것을 고려한다면 SIHD-2 프로모터는 열매 특이적으로 발현되는 것을 증명하는 결과이다 (도 7의 B).

[100]

[101] 실시예 6. 결실 (deletion) 분석을 이용한 프로모터 활성부위 조사

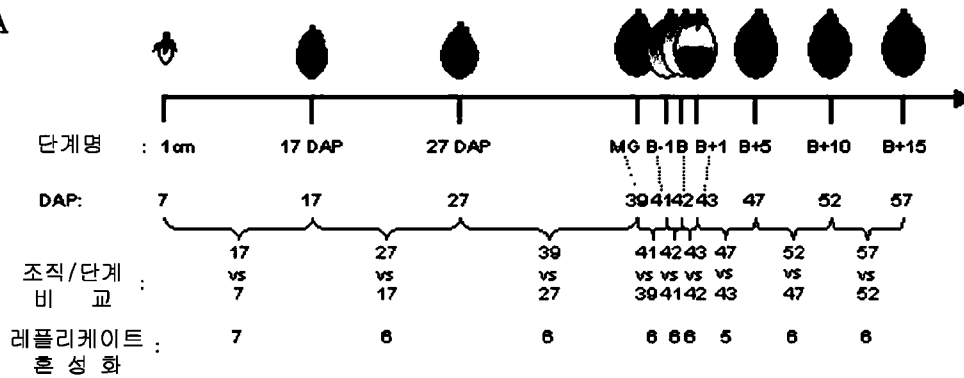
[102] 프로모터의 활성부위를 알아보기 위하여 결실 분석을 수행하였다. 먼저 156 bp의 5'UTR가 포함된 약 940 bp의 프로모터 부위의 5' upstream 부위의 304 bp를 결실한 Δ SIHD630, 5' upstream 부위의 629 bp를 결실한 Δ SIHD310 프로모터를 pCAM2300-GFP에 재조합하여 토마토 완적기 열매 조직에서 일시적 발현 방법으로 프로모터 활성을 조사하였다. 그 결과 프로모터 활성은 전장 프로모터인 SIHD-2에서 가장 높게 나타났으며, 두 가지 결실 프로모터에서는 발현양이 80% 이상 감소하였다. 또한, Δ SIHD630와 Δ SIHD310을 비교한 결과 프로모터 활성의 차이가 거의 없었다 (도 8). 이는 열매 특이성을 나타내는 cis-acting 조절인자가 SIHD-2 프로모터의 -784 ~ -304 부근에 존재할 가능성을 보여주는 것이라 생각된다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 1 내지 784 (-784 내지 -1 부위)의 염기서열을 포함하는 식물 열매 특이적 발현 프로모터.
- [청구항 2] 서열번호 1의 785 내지 940 (+1 내지 +156 부위)의 염기서열을 포함하는 5'-UTR.
- [청구항 3] 제1항의 열매 특이적 발현 프로모터, 제2항의 5'-UTR, 또는 제1항의 열매 특이적 발현 프로모터 및 제2항의 5'-UTR을 포함하는 열매 특이적 식물 발현 벡터.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 도 4에 도시된 pCAM-2300HD인 것을 특징으로 하는 열매 특이적 식물 발현 벡터.
- [청구항 5] 제3항 또는 제4항의 열매 특이적 식물 발현 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*).
- [청구항 6] 제3항 또는 제4항의 열매 특이적 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환된 식물체.
- [청구항 8] 제3항 또는 제4항의 열매 특이적 식물 발현 벡터에 외래 유전자를 재조합하는 단계; 및
상기 재조합된 식물 발현 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 열매 특이적으로 발현시키는 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제8항의 방법에 의해 제조된 외래 유전자가 열매 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체.

[Fig. 1]

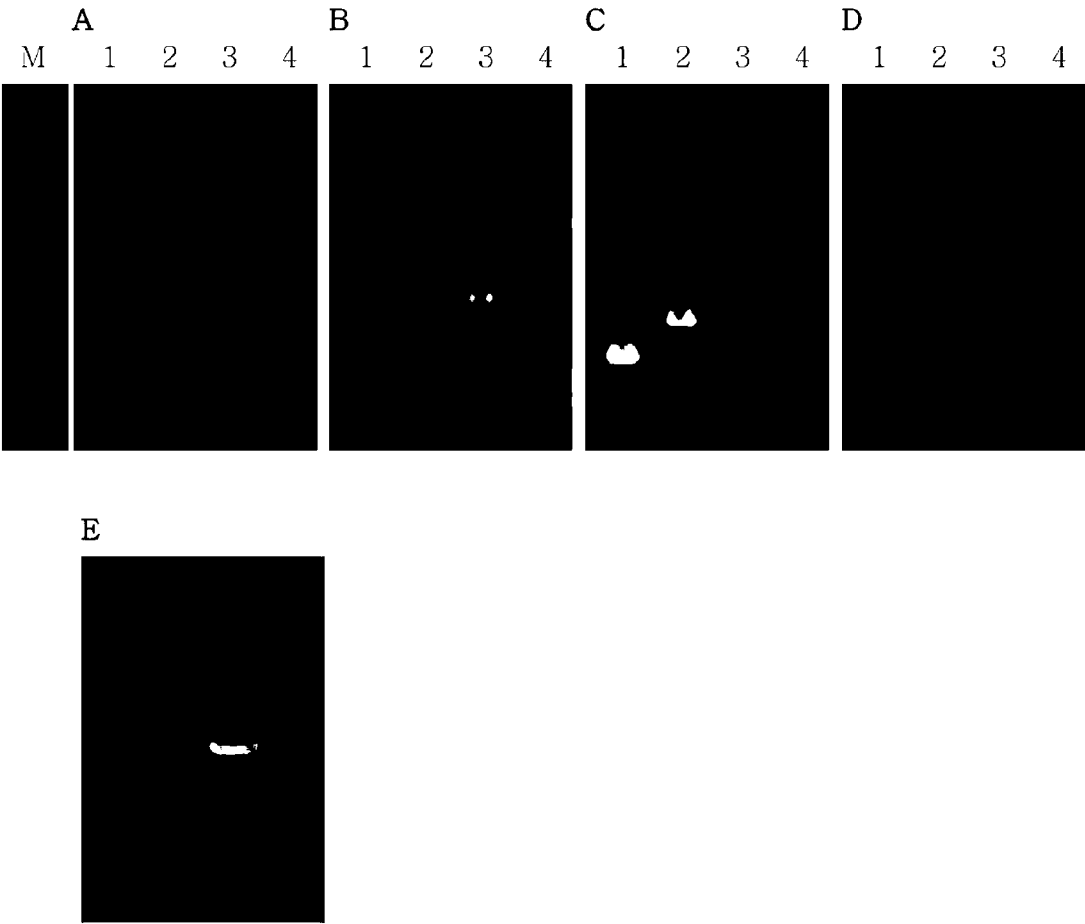
A



B

어레이 ID	SGN Unigene Genebank best hit(5)	7DAP	17DAP	27DAP	39DAP	41DAP	42DAP	43DAP	47DAP	52DAP	57DAP
1-1-7.1.9.17	CAA61106 GB1 단백질 [감자]	0.0	-0.4	-0.4	-0.3	0.1	3.0	3.6	3.9	2.1	3.1
1-1-7.1.6.2	hits 미발견	0.0	-0.1	0.2	-0.4	0.2	3.2	4.0	4.4	2.8	3.2
1-1-4.4.12.21	CAA73722 추정 단백질 키나아제 [토마토]	0.0	-0.4	-0.8	-0.6	0.5	3.0	3.8	4.4	3.0	3.5
1-1-6.1.6.2	AAA74393 리폭시게나아제	0.0	-0.3	-0.2	-0.3	0.7	3.6	4.5	5.0	3.5	4.3
1-1-6.1.8.8	CAA50719 히스티딘 디카르복실라아제 [토마토]	0.0	0.1	0.4	0.4	1.0	3.6	3.9	4.2	2.6	3.3
1-1-5.2.19.14	CAC82998 칼슘-의존성 단백질 키나아제 2 [담배]	0.0	0.7	0.6	0.7	1.1	3.4	4.2	4.6	3.3	4.1
1-1-7.1.8.8	CAA50719 히스티딘 디카르복실라아제 [토마토]	0.0	0.1	0.4	0.5	1.1	3.8	4.4	5.1	3.4	3.7
1-1-8.4.17.18	CAA50719 히스티딘 디카르복실라아제 [토마토]	0.0	0.5	0.5	0.7	1.1	3.2	4.1	4.7	3.7	4.3
1-1-5.4.19.14	CAA50719 히스티딘 디카르복실라아제 [토마토]	0.0	-0.1	-0.2	0.3	1.4	4.4	5.4	5.9	4.7	5.5
1-1-7.1.3.13	AAQ12264 익스팬신 1 단백질: LeExp1 [토마토]	0.0	0.3	0.3	0.9	2.0	3.2	3.1	3.0	2.4	2.4
1-1-6.4.16.5	AAA74393 리폭시게나아제	0.0	0.4	0.6	1.5	2.0	3.2	3.5	3.0	2.3	2.5

[Fig. 2]



[Fig. 3]

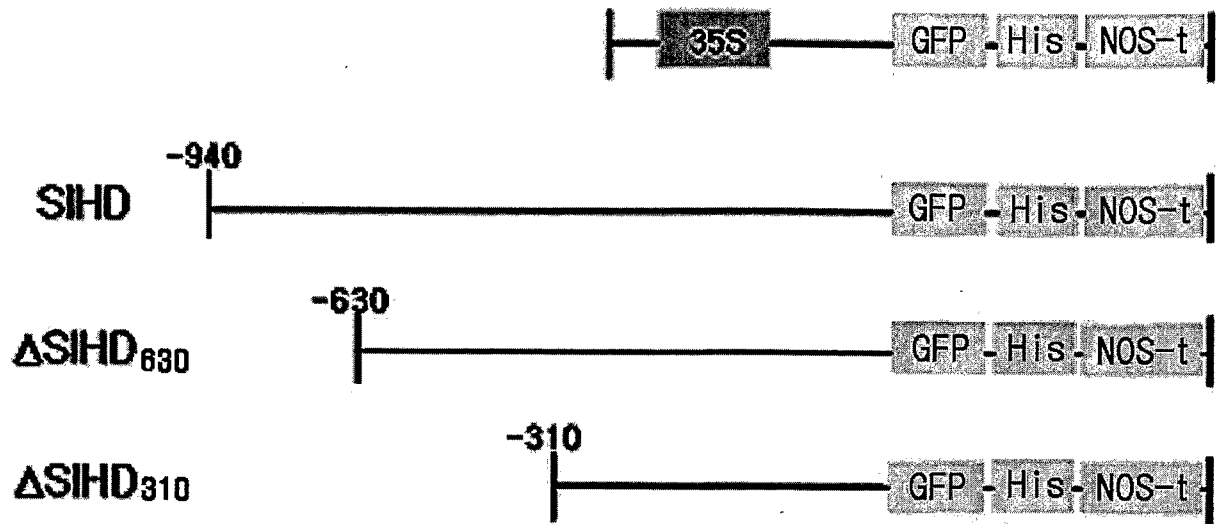
```

-784 AGCCACTATATTTATTTTACATTATTAATTTGCCATTTTA -745
      CAT-box
-744 TATAATTATTCCAATACAATTAAATTTCCACAAAATTTAA -705
-704 GTGTGCAATCGACAAAATAAATGAGACATGAAGGGAGTGT -665
-664 TTGGTAAAACGAAAAATGTTTTTCATATAAGAATGCCTTT -625
-624 TAGAATAAGTGGGTTATTTTTTTTATTTTTTATTTTGTATT -585
-584 TAGTACATAATTATTTTTTTTTCATCTTAAACATGTATTAT -545
-544 TAAATATAATTTAAATAAAAACTATGAGAGATGAAGATAG -505
-504 AGGGACGGGGATGAAGATGAGGTGCATTGAAAGGTGTGGA -465
-464 TTACTACCAATTAAAATGTTAGTAACTTGTTTTCCCAACT -425
-424 TTCATTAATTATTCCCTATTTTTTTTAAAGAATTGACGAAC -385
      TGACG-motif
-384 TGAACCTAAGACTCCTATCTCCTAATTATTAAGGGAGAAA -345
-344 AAATGAAATATTTTTTCAAGTTTACGTTATTTTCAAAGTT -305
-304 TTAGATATTTTCCGTTAACATGTTCAACATAACAGTGATG -265
-264 AAATTTAAGATTCACCACACAAAAGTTAAGAAGGCAAAGC -225
-224 AATTTTTGTTGTTATAAATTGAAGGTTCCAAGGATAATGA -185
-184 GACTCACAAAACTTTATCTCTTTAATTTGAGGCAATTAT -145
-144 TCTCATCTCAAATTATTACAATTTTTAGCTCTATTAGGAT -105
-104 GGGAAGTCAAAGTGTACGTAATATTTATGCTCAATTTTCT -65
      CAAT box
-64 AGTTTTCTCTTTTATATACTCATTCATTCATTTTAAATCA -25
      TATA box
-24 TACTAGTACATTATATATTTAAATT -1
+1 4rd GSP2 5'-UTR TTAATTTTTTGTGTGA +16
+17 TTATGAAATAGGAATTTGACTCAACAGTAGTCGCAACAAA +56
+57 AACTGGAATCAACGCACCATTGTCATCTCCAAGGGACAAT +96
      4rd GSP1
+97 ATGTGTCTTAGTTTGATTGAACCTCATATTAAGAATAAAA +136
+137 CATCTTCCGAAGAATTGAAC +156

+542 ~ +910 +1811~ +1869 +2629~ +2649
+157 ATG-----3rd GSP2~GSP1-----2rd GSP2~GSP1-----1rd GSP2~GSP1-----
      Start codon

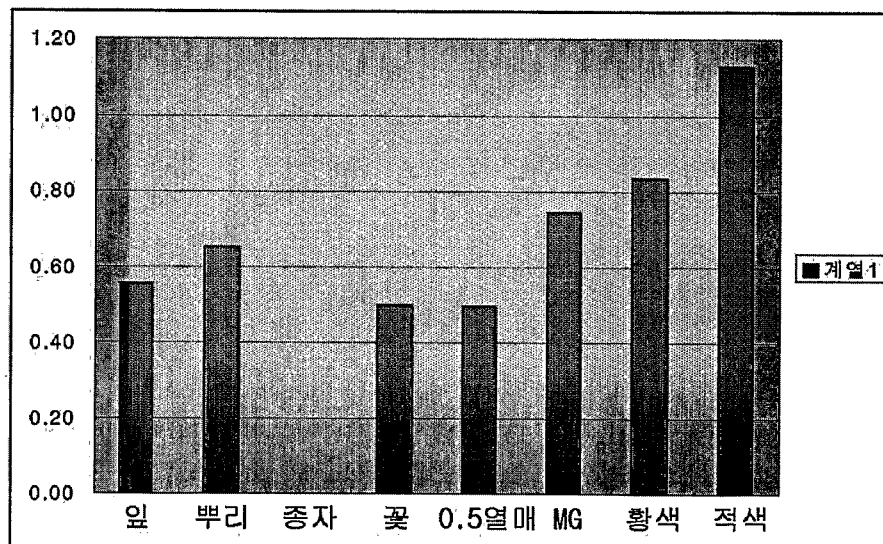
```

[Fig. 4]

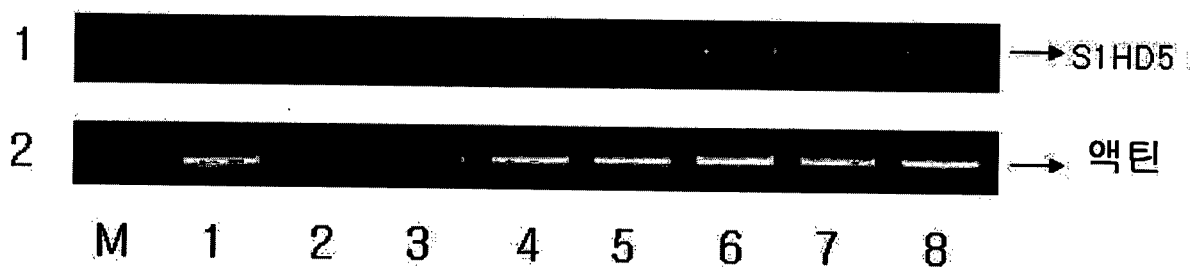


[Fig. 5]

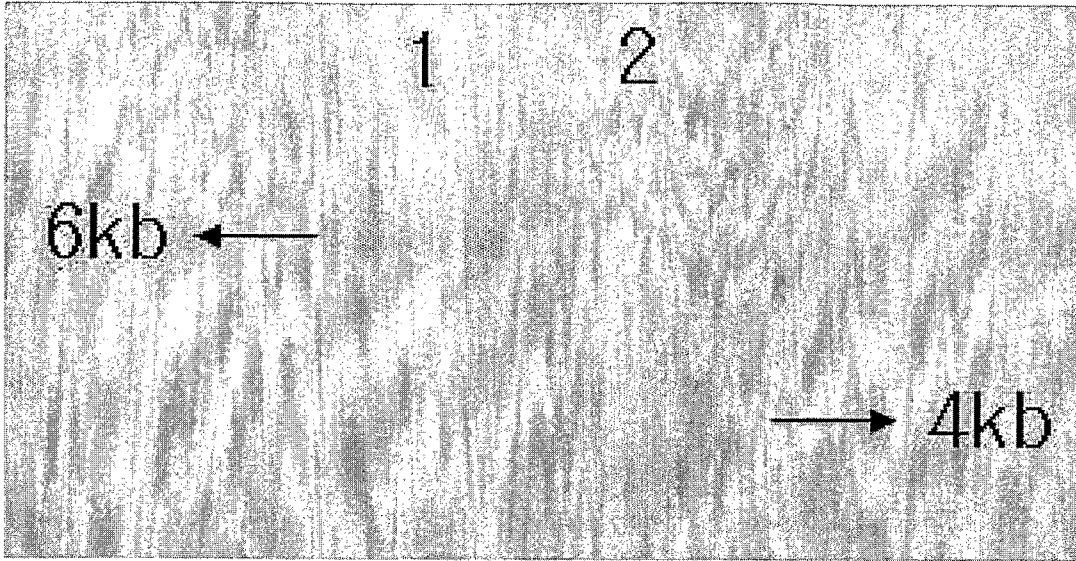
A



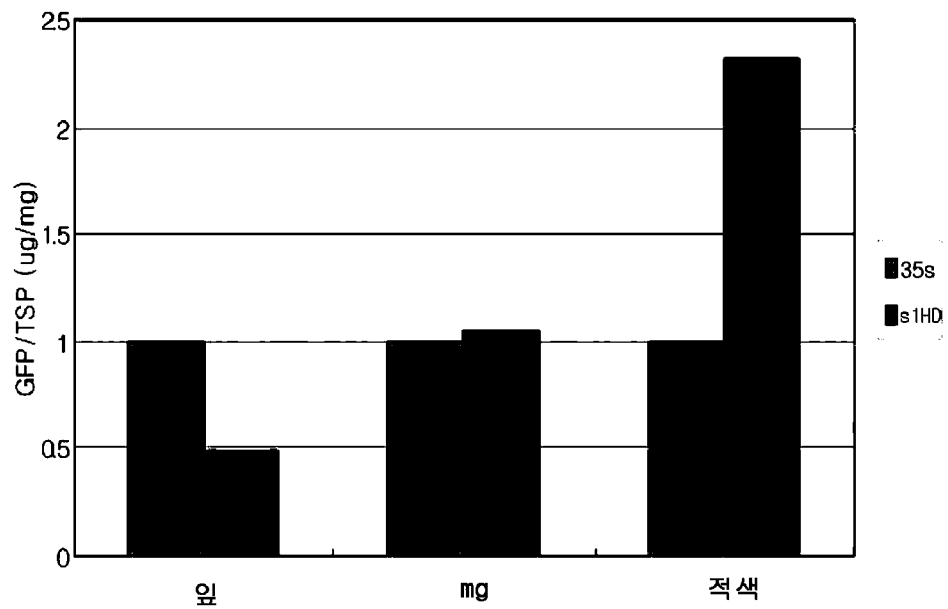
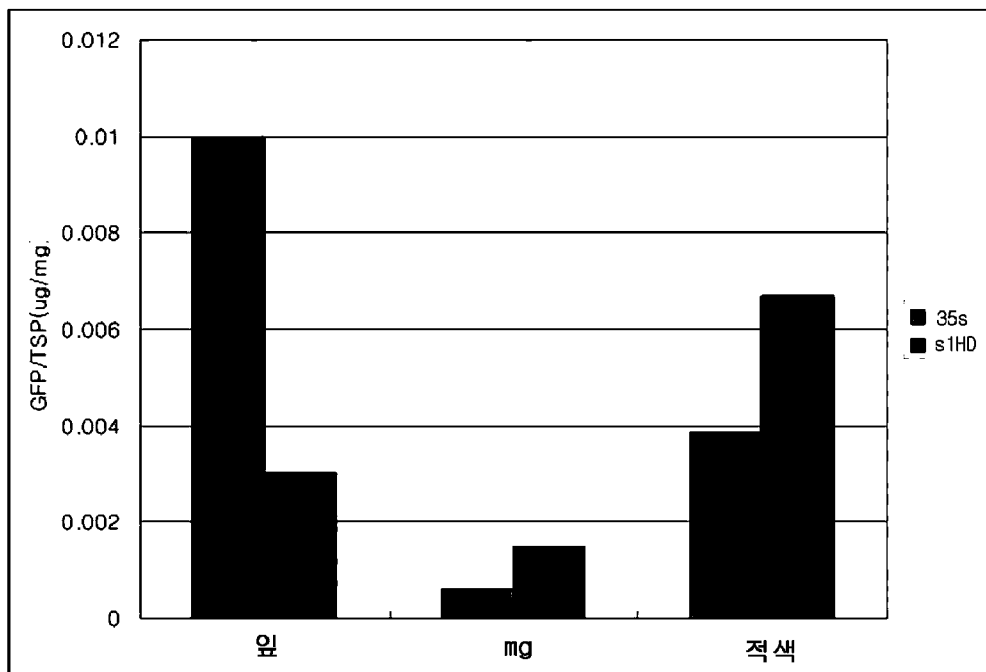
B



[Fig. 6]



[Fig. 7]

A**B**

[Fig. 8]

