

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0054879
(43) 공개일자 2025년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 6/46* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8227 (2013.01)
A01H 6/4636 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2023-0137667
(22) 출원일자 2023년10월16일
심사청구일자 2023년10월16일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정기홍
경기도 수원시 영통구 영통로154번길 56, 103동 1102호(망포동, 한양수자인 에듀파크)
고윤실
경기도 화성시 동탄순환대로19길 59, 2025동 1703호(목동, 힐스테이트 동탄)
문선옥
경기도 용인시 기흥구 흥덕2로118번길 26, 904동 503호(영덕동, 흥덕우미린 레이크포레)
(74) 대리인
특허법인정진

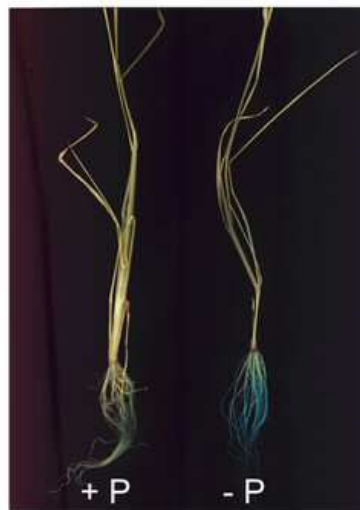
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 벼 LOC_0s07g43670 유전자 유래의 인산 결핍 유도성 뿌리 우세한 프로모터 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 벼 LOC_0s07g43670 유전자 유래의 인산 결핍 유도성 뿌리 우세한 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 프로모터는 인산 결핍 시 뿌리 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 조절하여 벼를 포함하는 외떡잎 식물 내지 주요 곡물의 인산 결핍 환경에서 뿌리의 유용한 형질 개선에 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 15/8271 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395077235
과제번호	RS-2022-RD010277
부처명	농촌진흥청(P46)
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청(1390000)
연구사업명	저탄소그린라이스생산기술개발(029111010010111001133414)
연구과제명	메탄가스 감축을 위한 건답직파 육종소재 개발 및 육종효율 증진연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711187107
과제번호	2022R1C1C2006595
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	RNA 분해인자를 활용한 인산 저투입 고생산성 작물 개발 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)경희대학교산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2027.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어지는, 인산결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터를 포함하는, 인산결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 발현 벡터.

청구항 3

제2항의 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포.

청구항 4

제2항의 발현 벡터 또는 상기 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포로 형질전환된 식물체.

청구항 5

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 인산결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물.

청구항 6

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터로 형질 전환된 형질 전환 세포를 포함하는, 인산결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서,

상기 인산결핍 환경에서 뿌리 우선적 발현 유도는 전반적인 뿌리에서 우선적 발현인, 인산결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물.

청구항 8

제5항 또는 제6항에 있어서,

상기 인산결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물이 벼(Oryza sativa)에 적용되는 것인, 인산결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항의 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물로 형질 전환되어 인산결핍 환경에서 외래 유전자를 외떡잎 식물체의 뿌리에서 우선적으로 발현하는, 형질 전환 외떡잎 식물체.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 외떡잎 식물체는 벼(*Oryza sativa*)인 형질 전환 외떡잎 식물체.

청구항 11

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터로 외떡잎 식물체를 형질 전환시키는 단계를 포함하는, 인산결핍 환경에서 외래 유전자를 뿌리에서 우선적으로 발현하는 형질 전환 외떡잎 식물체의 제조 방법.

청구항 12

하기의 단계들을 포함하는 인산결핍 환경에서 외래 유전자를 뿌리에서 우선적으로 발현시키는, 형질 전환 외떡잎 식물체의 제조방법:

(a) 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 인산결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물을 제조하는 단계;

(b) 외떡잎 식물체에 상기 조성물을 도입하는 단계; 및

(c) 상기 조성물이 도입되어 인산결핍 환경에서 외래 유전자를 뿌리 우선적으로 발현하는 형질 전환 외떡잎 식물체를 선별하는 단계.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 외떡잎 식물체는 벼(*Oryza sativa*)인 형질 전환 외떡잎 식물체의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벼 (*Oryza sativa*) LOC_0s07g43670 유전자 유래의 인산 결핍 유도성 뿌리 우세한 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인산 결핍 환경에서 외래 유전자를 뿌리에 우세하게 발현시키는 벼 LOC_0s07g43670 유전자 유래의 프로모터 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 분자생물학의 발달로 외래 유용유전자의 분리 및 조작을 할 수 있게 되어 유용유전자를 벼를 비롯한 많은 식물 세포에 형질 전환하여 새로운 유전자가 조합된 형질전환체를 얻음으로써 여러 가지 생명현상을 규명하는 유전자 발현 연구는 물론 육종의 좋은 소재가 되고 있다

[0004] 프로모터는 유전자의 상부 쪽에 연결된 유전체 부위로서 이에 연결된 구조 유전자가 mRNA로 전사(transcription)되도록 조절하는 역할을 한다. 기본 대사에 필요한 단백질들은 세포 내에서 일정 농도를 유지하

여야 하므로 이들의 유전자에 연결된 프로모터는 일반전사인자의 작용만으로도 항상 활성화되어 있다. 이에 반하여 평시에는 역할이 없고 특수한 상황에서만 기능이 요구되는 단백질들은 주변으로부터의 환경적 요인 또는 외부 자극 때문에 활성화된 특이 전사인자(specific transcription factor)가 결합함으로써 활성화될 수도 있다.

[0005] 즉, 프로모터(promoter)는 외래 유전자의 발현을 필요에 따라 식물체의 전신 또는 특별한 조직에만 국한해 형질 전환 목적을 달성할 수 있으며 기능에 따라 아래와 같은 프로모터들을 포함할 수 있다.

[0006] 첫째로 전신발현 유도 프로모터를 들 수 있다. 식물 전신발현 유도 프로모터로는 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 쌍떡잎식물용 프로모터로 사용되고 있다. 벼 등의 외떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자 프로모터들이 주로 이용됐으며, 최근 벼 시토크롬 C 유전자(OsOcl)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다(대한민국등록특허 제10-0429335호). 이들은 식물 형질 전환 기본 운반체 내에 선발 마커로 이용되는 항생제나 제초제 저항성 유전자 및 리포터 유전자의 발현을 유도하기 위해 이미 내재되어 있으며, 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체 내 기능을 밝히고자 시도할 때 우선적으로 고려되는 프로모터들이다. 그러나 이러한 프로모터에 연결된 특정 유전자의 상시적이고 과다한 발현(overexpression)은 생체대사에 불필요한 대량의 단백질이 주는 유독효과로 인하여 형질 전환 식물체가 발아되지 않거나 왜소하게 되는 등의 부작용이 나타나는 경우가 많다. 대표적인 예로서, CaMV35S 프로모터를 사용하여 환경 스트레스 전사인자 유전자 DREB1A를 과발현시킨 애기장대가 저온 및 저수분 조건에 대하여 저항성을 증진되는 것은 관찰되었으나, 성장이 저해되어 왜소증(dwarfed phenotype)을 보이면서 아미노산 프롤린 및 수용성 당류의 생산이 함께 증가하는 것이 확인되었다(Lie et al., Plant Cell 10: 1391-1406, 1998; Gilmour et al., PlantPhysiol. 124: 1854-1865, 2000). 이러한 부작용은 CaMV35S 프로모터 대신 환경 스트레스 관련 유전자인 rd29A의 유도성 프로모터를 사용함으로써 최소화할 수 있다(Kasuga et al, Nat. Biotechnol. 17: 287-291, 1999).

[0007] 둘째로, 잎 등의 기타 조직 특이 프로모터를 들 수 있다. 잎 등의 광합성 조직에서만 강력한 유전자의 발현을 유도하는 벼와 옥수수 유래의 알비씨에스(rbcS: ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 프로모터, 아그로박테리움 유래의 식물 뿌리 발현을 유도하는 RoID 프로모터, 감자 유래 괴경 특이 발현 유도 파타틴(patatin) 프로모터, 토마토 유래의 과실 성숙 특이 발현 유도 피디에스(PDS: phytoene synthase) 프로모터 등이 있다.

[0008] 위와 같은 프로모터들은 대부분 식물체의 생존 환경, 또는 특정의 스트레스 조건에 따라 프로모터의 활성 변화를 고려하는 것이 아니므로 상시로 발현을 유도하는 프로모터가 아닌, 더욱더 세밀하게 특정 조건 또는 특정 조직에서 목적 유전자의 발현을 유도할 수 있는 스트레스 유도성 프로모터 발굴이 필요하다.

[0009] 인산은 작물 생육을 위한 주요 비료 성분이자 수량성에 직결되는 필수적인 영양분으로써, 전 세계 작물 생산량의 40% 가 인산 스트레스에 영향받는 것으로 알려져 있다. 안정적인 작물 생산을 위해서 화학비료 사용은 필수적이거나, 인산비료의 전체 시비량에 20~30% 만이 식물에 흡수하고 나머지는 비활성화 상태로 토양에 빠르게 고정되어 부영양화 등의 부작용을 일으킨다.

[0010] 한편, 뿌리는 식물지지만 아니라 주요 영양소와 물을 흡수하는 주요 기관으로써 뿌리 발달은 영양분 흡수 증진을 통한 식물의 생산성 증진과 비료의 저사용을 통한 환경 분야에서 크게 이바지할 것으로 예측된다.

[0011] 위와 같은 기술 실정을 고려할 때, 개발자의 의도에 따라 보다 정밀하게 유전자 발현의 장소를 조절할 수 있는 새로운 프로모터, 예컨대 특정한 환경 혹은 특정 조직에서만 발현되어야 하는 유전자(예:영양분 결핍, 추운 환경, 가뭄, 염분 스트레스 등)를 발현시킬 수 있는 스트레스 유도성 조직 특이적 신규 프로모터에 대한 연구개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) KR 101965971 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 인산 결핍 환경에서 뿌리 우선적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 인산 결핍 환경에서 뿌리 우선적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터 또는 상기 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포로 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 인산 결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 (Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 인산 결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 (Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질 전환 세포를 포함하는, 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물로 형질전환되어 인산 결핍 환경에서 외래 유전자를 외떡잎 식물체의 뿌리에서 우선적으로 발현하는, 형질전환 외떡잎 식물체를 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 인산 결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 (Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터로 외떡잎 식물체를 형질 전환시키는 단계를 포함하는, 인산 결핍 환경에서 외래 유전자를 뿌리에서 우선적으로 발현하는 형질 전환 외떡잎 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 인산 결핍 환경에서 외래 유전자를 뿌리에서 우선적으로 발현시키는, 형질 전환 외떡잎 식물체의 제조방법으로,
- [0023] (a) 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 (Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 인산결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물을 제조하는 단계;
- [0024] (b) 외떡잎 식물체에 상기 조성물을 도입하는 단계; 및
- [0025] (c) 상기 조성물이 도입되어 인산결핍 환경에서 외래 유전자를 뿌리 우선적으로 발현하는 형질 전환 외떡잎 식물체를 선별하는 단계를 포함하는 제조방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0027] 상기과 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 식물의 외부 자극에 의해 조직 또는 기관 특이적으로 외래 유전자를 발현할 수 있는 프로모터들을 발굴함으로써 식물의 특정 조직 또는 기관에 국한시켜 목적 유전자를 특이적으로 발현 또는 저해할 수 있는 시스템을 확립하고자 하였다.
- [0028] 이를 위하여, 인산 결핍 환경에서 외래 유전자의 유도가 가능한 프로모터에 대해 연구한 결과, 벼의 LOC_0s07g43670의 프로모터가 인산 결핍시 뿌리에서 우선적으로 외래 유전자의 발현을 유도함을 확인하였다.
- [0029] 이에 따라 상기 프로모터를 확보하여 이를 포함하는 발현벡터를 제조한 후 이를 식물에 도입하여 형질 전환시킨 형질 전환체가 인산 결핍 환경에서 뿌리 우선적으로 리포터 유전자를 발현시킴을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0030] 보다 상세하게, 본 발명자들은 공개된 벼 알엔에이-식 (RNA-seq) 자료를 참조하여 인산 결핍 스트레스를 21일 주었을 때 우선적으로 뿌리에서 발현이 올라가는 유전자 820개를 분리하였다. 상기 유전자 중 LOC_0s07g43670 유전자는 인산 결핍시 뿌리에서만 발현이 현저히 증가하는 것으로 보였고 이를 검증하기 위해 실시간 증폭

(Real-time PCR) 기법을 이용하여 인산 결핍 시 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

- [0031] 이를 기초로 LOC_0s07g43670의 프로모터의 염기서열 해독 정보를 참고하여 LOC_0s07g43670의 -2118부터 +729까지의 프로모터 영역과 두번째 exon의 일부를 포함하는 영역을 게놈 DNA PCR를 통해서 분리하고 이렇게 분리된 프로모터를 pGA3519 벡터에 In-fusion cloning 방식으로 직접적으로 넣어 염기서열을 해독하여, 형질전환된 식물체를 제작하였다. 형질전환된 식물체에서 인산 결핍 스트레스를 21일 준 후 GUS 반응을 검증함으로써, 해당 프로모터가 인산 결핍 시 뿌리 우선적 유전자 발현을 유도하여 본 발명을 완성하였다.
- [0033] 본 발명은 인산 결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터를 제공한다. 본 발명에 따른 상기 인산 결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터는 벼의 LOC_0s07g43670의 프로모터 영역을 포함하며, 보다 바람직하게 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함한다.
- [0034] 본 발명에 따른 프로모터는 인산 결핍 환경 예를 들어, 토양에 인산이 부족한 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현을 유도함으로써 인산 결핍의 스트레스 환경에 대한 저항성을 부여한다.
- [0035] 프로모터는 유전자의 환경적, 시기적 및 조직적 발현을 조절하는 필수적인 요소로서, 본 발명에 따른 프로모터는 인산 결핍 환경에서 식물체의 뿌리에서 외래 유용 유전자의 발현을 우선적으로 유도할 수 있다. 바람직하게 뿌리의 말단부, 보다 바람직하게 뿌리의 신장대에서 우선적 발현을 유도할 수 있다.
- [0036] 즉, 본 발명의 프로모터는 벼의 LOC_0s07g43670의 프로모터로서 외래 유전자의 발현이 인산 결핍 시 뿌리에 우선적으로 이루어지도록 유도하는 인산 결핍 유도성 뿌리 우선적 발현 프로모터(이하 '본 발명의 프로모터'라 함)이다.
- [0037] 본 발명에 있어서 "우선적"이란, 본 발명에 따른 프로모터에 의한 고발현성, 특이성 등을 모두 포함하여 식물 일부에서 우선적 발현 증가를 의미한다. 예컨대 본 발명에 따른 프로모터가 결여된 식물체와 대비하여 50% 이상, 60 % 이상, 70 % 이상, 80 % 이상, 90 % 이상, 100% 이상, 200% 이상, 5배 이상 또는 그 이상의 발현 증가를 의미한다.
- [0038] 본 발명의 프로모터는 예컨대 LOC_0s07g43670의 -2118부터 +729까지의 프로모터 영역이다. 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 프로모터와 일부 유전자 영역은 공개된 벼 게놈 서열 상, LOC_0s07g43670 앞쪽과 유전자의 일부를 포함하는 서열로, 서열번호 1로 표시되는 염기 서열 중 일부가 치환, 삽입 또는 삭제되더라도 공개된 벼 게놈 서열 상 LOC_0s07g43670의 프로모터와 일부 유전자 영역에 위치한 서열과 상동성이 유지되어 실질적으로 동등한 효과를 나타낸다면 본 발명의 범주에 포함될 수 있다. 즉, "본 발명의 프로모터"와 "기능적으로 동등한 절편"을 포함할 수 있으며, 상기 프로모터와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분일 수도 있다. 이러한 핵산 절편은 서열번호 1에 기재된 염기서열과 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상 동성을 가지며, 이러한 핵산 절편은 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다. 바람직하게 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것이다.
- [0040] 또한, 본 발명은 상기 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0041] 위 프로모터는 인산 결핍 환경에서 뿌리 우선적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터로 앞서 정의된 바와 같다.
- [0042] 본 발명에서 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며, DNA를 복제하고, 숙주 세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘 다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서, 발현 벡터는 재조합 DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입 시, 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 게놈 내에 통합되는 것들을 포함한다.

- [0043] 상기 통상의 벡터는 본 발명의 프로모터를 도입할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하나, 바람직하게는 pCAMBIA계열, pGA계열, pGWB계열, 예컨대, pGA3519, pCAMBIA3301, pCAMBIA3300, pGA3426, pGA3780, pGWB12, pGWB14와 같은 Ti-plasmid 및 이에 파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 이들 벡터는 본 발명의 프로모터 및 외래 유전자를 포함하며 인산 결핍 시 뿌리에서 우선적으로 외래 유전자 발현에 현저한 효과를 가진다.
- [0044] 본 발명의 발현 벡터는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 발현 벡터는 3' 방향에 목적 단백질에 대한 외래 유전자가 발현되도록 한다. 바람직하게는 상기 발현 벡터는 인산 결핍 시 뿌리에 우선적으로 발현시키고자 하는 유용한 외래 유전자를 포함할 수 있다.
- [0046] 이러한 외래 유전자의 종류에는 제한이 없다. 다만, 식물이 성장하기 위해서는 양분과 물의 흡수가 중요하며 그 역할을 뿌리가 주요하게 담당하며, 뿌리를 통한 영양분 흡수능을 향상시킴으로써, 생산성 증대가 가능하다. 따라서 상기 외래 유전자는 인산 결핍 시 뿌리에 앞서 언급된 기능 및 영양분 흡수능 향상에 대한 특성과 관련된 것이면 바람직하다. 예컨대 인산 결핍 시 뿌리 발달과 관련된 유전자로서 벼의 Phosphate transporter6, WRKY76 등이 도입될 수 있다. 또한, 양분 흡수에 관여하는 OsPT4 유전자들이 도입될 수 있으며, 이러한 외래 유전자에 관한 예시로 도입 가능한 유전자의 종류가 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 상기 발현벡터는 통상의 벡터에 본 발명의 프로모터를 도입한 것일 수 있으며, 이처럼 본 발명의 프로모터를 도입하여 발현벡터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자라면 공지 방법에 따라 용이하게 실시 가능하다.
- [0049] 또한, 본 발명은 본 발명은 상기 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포를 제공한다.
- [0050] 상기한 재조합 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스팩션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포; 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 임의의 식물 세포가 이용가능하다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 가능하다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 줄기, 잎, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다.
- [0053] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터 또는 상기 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포로 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0054] 상기 식물체는 바람직하게 외떡잎 식물체일 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명은 인산 결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 (Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물을 제공한다.
- [0057] 인산 결핍 환경에서 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물은 외떡잎 식물체에 외래 유전자를 도입하고 형질전환된 외떡잎 식물체를 인산 결핍 환경에 노출시키는 경우 뿌리에서 외래 유전자의 발현을 우선적으로 유도할 수 있다. 본 발명에 있어서, 외떡잎 식물체는 본 발명의 일 실시양태에 따른 벼 (*Oryza sativa*)를 포함하여 외떡잎 식물로 구분되는 식물체 모두를 제한 없이 포함한다. 본 발명에 있어서, 인산 결핍 시 뿌리 우선적 발현 유도는 외떡잎 식물체의 인산 결핍 조건에서 뿌리에 우선적 발현을 의미한다.
- [0058] "본 발명의 형질전환 외떡잎 식물체"와 "기능적으로 동등한 형질전환 외떡잎 식물체"는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 변이체와 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 이용하여 제조된 형질 전환 외떡잎

식물체로써, 외떡잎 식물체에서 프로모터 효과가 실질적으로 동등한 특징을 가지는 형질전환 외떡잎 식물체이다.

[0059] 본 발명의 식물체의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키기 위한 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 외떡잎 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 예를 들어, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법 (Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu 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 투메파시엔스 (Agrobacterium tumefaciens) 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염 (EP 0301316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 이러한 변이체는 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명은 인산 결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 (Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질 전환 세포를 포함하는, 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물을 제공한다.

[0063] 또한, 본 발명은 상기 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물로 형질전환되어 인산 결핍 환경에서 외래 유전자를 외떡잎 식물체의 뿌리에서 우선적으로 발현하는, 형질전환 외떡잎 식물체를 제공한다.

[0064] 위 외떡잎 식물체는 바람직하게 외떡잎 식물체는 벼이다. 이러한 형질 전환 외떡잎 식물체는 도입된 외래 유전자가 외떡잎 식물체에 인산 결핍 시 뿌리에 우선적으로 발현되는 특성을 나타낸다.

[0066] 또한, 본 발명은 인산 결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 (Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터로 외떡잎 식물체를 형질 전환시키는 단계를 포함하는, 인산 결핍 환경에서 외래 유전자를 뿌리에서 우선적으로 발현하는 형질 전환 외떡잎 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0068] 또한, 본 발명은 인산 결핍 환경에서 외래 유전자를 뿌리에서 우선적으로 발현시키는, 형질 전환 외떡잎 식물체의 제조방법으로,

[0069] (a) 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 인산결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현 유도용 조성물을 제조하는 단계;

[0070] (b) 외떡잎 식물체에 상기 조성물을 도입하는 단계; 및

[0071] (c) 상기 조성물이 도입되어 인산결핍 환경에서 외래 유전자를 뿌리 우선적으로 발현하는 형질 전환 외떡잎 식물체를 선별하는 단계를 포함하는 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0073] 본 발명은 벼 LOC_0s07g43670 유전자 유래의 인산 결핍 유도성 뿌리 우세한 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 프로모터는 인산 결핍 시 뿌리 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 조절하여 벼를 포함하는 외떡잎식물 내지 주요 곡물의 인산 결핍 환경에서 뿌리의 유용한 형질 개선에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0075] 도 1a는 LOC_Os07g43670 유전자의 조직별 발현 양상을 나타낸 도이다.
- 도 1b는 인산 결핍 유무에 따른 LOC_Os07g43670 유전자의 줄기 또는 뿌리에서의 발현 양상 확인을 나타내는 도이다.
- 도 2는 LOC_Os07g43670 프로모터를 포함하는 GUS 식물체 제조를 위해 사용한 벡터의 다이어그램을 나타낸 도이다.
- 도 3은 형질 전환 식물체에서 LOC_Os07g43670 프로모터의 조직별 (A: 식물 전체, B: 뿌리, C: 지엽, D: 꽃, E: 잎, F: 종자) 발현을 확인하기 위한 GUS 염색 결과를 나타내는데, 뿌리 우선적으로 발현함을 확인할 수 있다.
- 도 4는 형질 전환 식물체에서 LOC_Os07g43670 프로모터가 인산 결핍 시 뿌리에서 우선적으로 발현을 보이는 GUS 염색 결과를 나타내는 도이다.
- 도 5는 LOC_Os02g44654와 대비하여 LOC_Os07g43670이 인산 결핍 시 뿌리에서의 발현이 월등히 높음을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0076] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다.
- [0077] 그러나, 아래의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0079] <실시예 1> 인산 결핍 시 뿌리에서 우선적으로 발현되는 벼 유전자 대량 선별

- [0080] 인산 결핍 환경에서 우선적으로 발현하는 유전자를 선별하기 위하여, 공개된 RNA-seq 데이터베이스인 NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)에서 벼 알엔에이 식 (RNA-seq) 자료인 SRA097415 (인산 결핍 처리를 1 시간, 3시간, 6시간, 24시간, 3일, 7일, 21일, 21일 1시간, 21일 6시간, 또는 21일 24시간으로 하여 뿌리 또는 줄기 샘플에 대해 3반복으로 확인한 총138개의 샘플)를 이용하여 유전자 선별 작업을 수행하였다.

- [0081] 인산 결핍시 뿌리에서 특이적으로 발현하는 유전자를 선별하기 위하여, 공개된 RNA-seq 데이터에서 우선적으로 유전자 820개를 선별하였고, 이를 이용하여 인산결핍시 뿌리에서 발현하는 유전자 선별 분석을 수행하였다. K-means clustering 분석 방법을 이용하여, 제시된 유전자 발현 분석용 데이터베이스 중 인산 결핍 처리 21일을 기준으로 뿌리에서 발현이 높은 유전자 그룹을 분리하였다.

- [0082] 이는 전사체 자료 분석용 소프트웨어인 MeV의 K-means clustering 분석 방법을 사용하여 수행하였으며, 인산 결핍 시 뿌리 발현 분석용 데이터베이스 중 결핍조건에서 뿌리에서 발현이 우선적인 820종의 유전자가 분리되었다.

[0084] <실시예 2> LOC_Os07g43670 유전자의 조직별 발현 양상 및 인산 결핍시 발현 양상 분석

- [0085] RNA-seq 데이터베이스 분석을 통해 식별된 LOC_Os07g43670 유전자의 식물의 조직별 (잎집, 잎몸, 뿌리, 종자, 꽃, 원추꽃차례) 발현 및 인산 결핍 시 줄기 또는 뿌리에서의 발현 양상을 분석하기 위해 Real-time PCR을 수행하였다.

- [0086] 구체적으로, 제조업체의 프로토콜에 따라 RNAiso Plus Kit (Takara Bio, 교토, 일본)를 사용하여 RNA를 추출하였고, cDNA를 합성하였다. Real-time PCR 분석을 위해 OsUbi5를 참조 유전자로 사용하였다. PCR은 95℃에서 15초, 57℃에서 30초, 72℃에서 60초의 사이클링 조건을 사용하였다. 이 실험은 4개의 독립적인 생물학적 복제물을 사용하여 3회 반복되었다. 상대적인 전사 수준과 배수 변화는 각각 2-DCt 및 2-DDCt 방법으로 계산되었다.

- [0087] 그 결과, 도 1a 및 도 1b에 나타낸 바와 같이, LOC_Os07g43670 유전자가 다른 조직에 비해 뿌리에서 매우 높게 발현하고, 더불어 인산 결핍 시 뿌리에서 우세하게 발현이 증진됨을 확인하였다.

[0089] <실시예 3> 인산 결핍시 뿌리 발현을 유도하는 프로모터의 클로닝

[0090] LOC_0s07g43670의 프로모터를 클로닝하기 위하여 작성된 프라이머들과 동진 벼 (*Oryza sativa* L. japonica cultivar-group) 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 실시하였다. 주형 DNA는 100 ng로 사용하였고, 각 프라이머는 5 pmol로 사용하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 30초, 56℃에서 30초, 68℃에서 300초를 4회 반복한 후; 95℃에서 30초, 62℃에서 30초, 68℃에서 300초를 35회 반복하고 마지막으로 68℃, 10분으로 하였다. PCR 산물은 전기영동하여 크기를 확인하고, In-fusion cloning 방식을 통해 XbaI으로 절단된 pGA3519 벡터 (promoter-GUS cloning용 벡터)에 직접적으로 클로닝하여 50℃에서 15분간 Fusion 하였다.

[0091] Fusion 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 200 μ l과 혼합하여 1.5 ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 37℃ 오븐에 1분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 추가로 튜브에 넣은 다음 3시간 동안 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프랩하였다. 미니 프랩으로 얻은 DNA를 제한 효소 KpnI과 XbaI을 사용하여 효소 절단 후 전기영동에서 아가로스 젤을 분리하고 밴드를 확인하였다. 이렇게 해서 얻어진 클로닝 DNA를 다시 염기 서열 분석을 하여 에러가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다. 염기서열 분석은 capillary sequencing 법으로 하였으며(마크로젠 의뢰), 염기서열분석은 NGUS1과 프로모터 내 서열을 이용한 프라이머들을 사용하였다. 프로모터 클로닝용 프라이머 및 염기 서열 분석을 위해 사용된 프라이머는 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

표 1

[0092] LOC_0s07g43670의 프로모터 클로닝용 프라이머

프라이머 명칭	서열 (5'-3')
LOC_0s07g43670_GUS_FP	GTTAACGAGCTCTAGCGAACAGTCTCATCGATCTGTCAGG (서열번호 2)
LOC_0s07g43670_GUS_RP	CCGGGGATCCTCTAGCTCCGCCACGAGGTCCTTGA (서열번호 3)

표 2

[0093] 염기 서열 분석을 위한 프라이머

프라이머 명칭	서열 (5'-3')
NGUS1	AACGCTGATCAATTCACAG (서열번호 4)

[0094] 상기에서 분석된 서열을 서열번호 1에 나타내었으며, LOC_07g43670의 프로모터 영역은 -2118부터 +729까지의 프로모터 영역과 두번째 exon의 일부를 포함하는 영역이 프로모터 서열로 사용되었다.

[0095] 상기에서 분석된 서열을 서열번호 1에 나타내었으며, LOC_07g43670의 프로모터 영역은 -2118부터 +729까지의 프로모터 영역과 두번째 exon의 일부를 포함하는 영역이 프로모터 서열로 사용되었다.

[0097] <실시예 4> 형질전환 세포의 제작

[0098] 상기 실시예 3에서 제작한 식물 발현용 벡터를 추출하였다.

[0099] 아그로박테리움 컴피턴트 셀(*Agrobacterium tumefaciens* LB4404) 50 μ l와 2 μ g의 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 액체질소에 75초 넣은 후, 37℃ 오븐에 5분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 넣은 다음 3시간 동안 28℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프랩한 후, KpnI과 XbaI을 사용하여 효소 절단 후 사이즈를 확인하였다.

[0100] 상기 생성된 형질전환된 아그로박테리움을 이용하여 벼의 형질 전환 실험에서 사용하였다.

[0102] <실시예 5> 형질전환 식물체의 제작

[0103] N6D 고체 배지에서 동진벼 종자를 7일 정도 28℃ 생장실에서 키워서 벼의 캘러스를 생성하였다. 생성된 캘러스를 상기 실시예 5에서 얻은 식물 발현용 벡터로 형질 전환된 아그로박테리움을 72시간 키운 세포와 혼합하여

N6D-Acetosyringone을 포함한 배지에서 22℃ 암처리 성장실에 방치하였다.

[0104] 아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 행구어 낸 다음 N6D 고체 배지에서 hygromycin 선발을 1차(hygromycin 30 mg/L), 2차(hygromycin 40 mg/L)에 걸쳐서 계대 배양을 통해 진행하였다. 선발은 28℃ 성장실에서 각각 2주 씩 합해서 4 주 동안 이루어졌다. 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR (hygromycin 40 mg/L) 고체배지에 옮겨 4주 28℃ 광조건 성장실에서 재분화를 유도한 후, 식물체를 MS 고체 배지로 옮기고 7일 28℃ 광조건 성장실에서 키우고 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

[0106] <실시예 6> 형질전환 식물체를 이용한 인산 결핍 유도 발현 검증

[0107] 재분화된 식물체의 조직 별 발현 및 인산 결핍 스트레스 특이적 GUS 발현을 확인하기 위하여, 수확한 종자를 20 개씩 28℃에서 7일간 배양한 후 10 개체는 조직 별 발현을 하기 위해서 뿌리, 잎은 GUS 염색 처리하였고, 관형 재배를 통해 지엽, 종자, 꽃 조직을 추가적으로 GUS 염색을 하였다. 남은 10개체를 요시다 양액 (1.425 mM NH₄NO₃, 0.513 mM K₂SO₄, 0.998 mM CaCl₂, 1.643 mM MgSO₄, 0.075 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.25 mM NaSiO₃, 0.009 mM MnCl₂, 0.019 μM H₃BO₃, 0.155 μM CuSO₄, 0.152 μM ZnSO₄, 및 0.125 mM EDTA-Fe 포함하고, 인산 충분 조건에서는 0.323 mM NaH₂PO₄를 더 포함하며 결핍조건은 NaH₂PO₄를 포함하지 않음)하에 수경재배로 21일 키운 후 GUS 염색 처리하였다. GUS 용액은 0.5 M sodium phosphate buffer 200 ml, 12.5 mM potassium ferricyanide 100 ml, 12.5 mM potassium ferrocyanide 100 ml, 0.5 M EDTA 20 ml, 10% Triton X-100 50 ml, 10 ml 의 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 X-gluc 1 g과 Methanol 200 ml을 넣고 증류수로 1 L의 부피를 맞추어 제조되었다. 각 계통의 식물체를 모두 15 ml의 GUS 염색액에 24시간 처리한 후 70% 에탄올과 100% 에탄올을 순차적으로 이용하여 상온에서 탈색하였다.

[0108] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 형질 전환 식물체에서 LOC_0s07g43670 프로모터가 잎 조직과 종자에서는 발현이 없었고 근관과 뿌리털을 포함한 뿌리에서 전반적으로 우선적으로 발현되었다.

[0109] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 형질 전환 식물체들은 인산 충분 혹은 결핍조건에서 뿌리에서 우세한 GUS 발현을 보이는 것이 확인되었으며, 특히 인산 결핍 조건에서 뿌리에 전반적으로 우세하게 발현이 증가되었다.

[0110] 위 확인되는 바와 같이, 도 1, 도 3 및 도 4의 결과를 토대로 LOC_0s07g43670의 프로모터가 인산결핍 시 뿌리 우선적으로 발현을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 상기 분석 결과를 통해 LOC_0s07g43670 유전자의 프로모터 영역이 인산 결핍 환경에서 외래 유전자의 뿌리 우선적 발현을 유도함을 확인하였다.

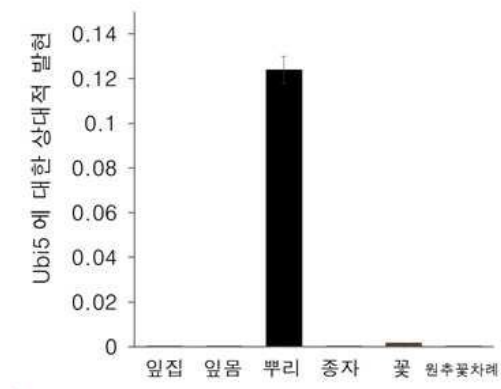
[0112] <실시예 7> 형질전환 식물체를 이용한 인산 결핍 유도 발현 검증

[0113] 인산 결핍 유도 프로모터로 공지되어 있는 LOC_0s02g44654 유전자의 프로모터와 비교하여 LOC_0s07g43670 프로모터의 인산 결핍 시 벼 뿌리에서의 GUS 발현 수준을 비교하였다.

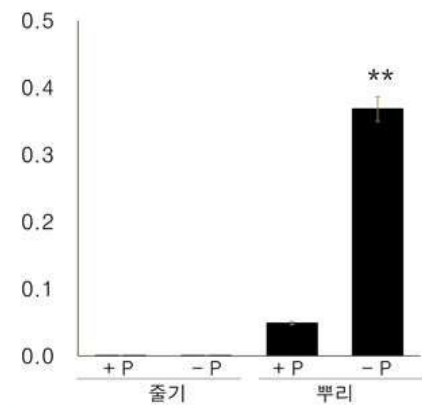
[0114] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, LOC_0s07g43670의 발현이 LOC_0s02g44654 보다 월등히 발현이 우세하게 증가함을 확인하였다.

도면

도면1a



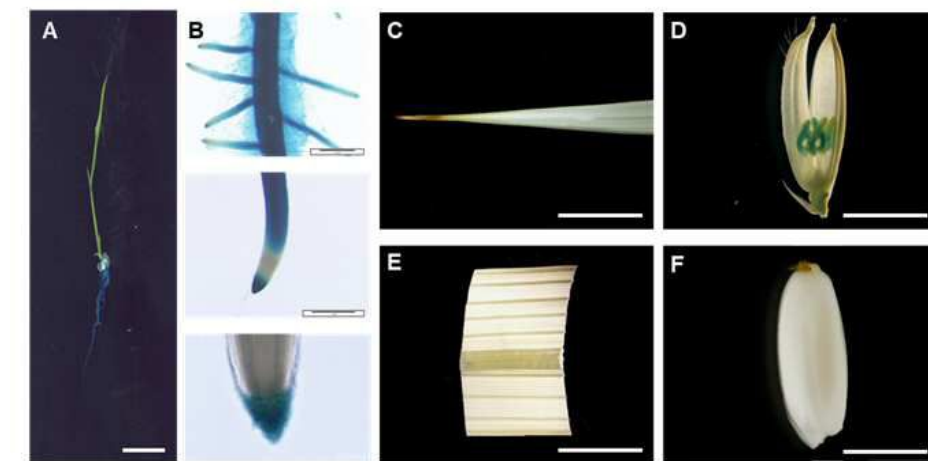
도면1b



도면2



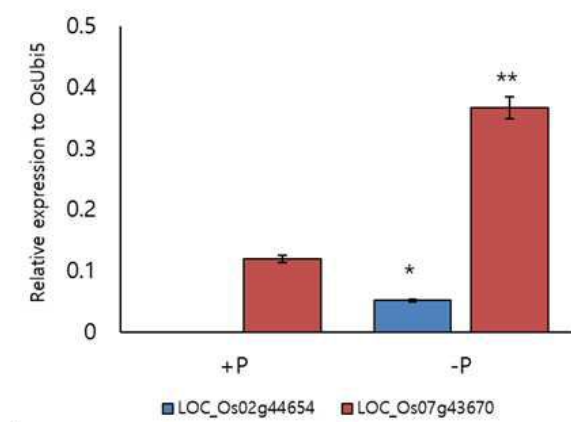
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.