



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년04월01일
(11) 등록번호 10-1379972
(24) 등록일자 2014년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0015044
(22) 출원일자 2013년02월12일
심사청구일자 2013년02월12일
(56) 선행기술조사문헌
KR100510959 B1
KR101126266 B1

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
홍종찬
경상남도 진주시 하대로 142, 102동 202호(하대동, 현대아파트)
신수영
인천광역시 연수구 먼우금로 19, 105동 605호(동춘동, 동남아파트)
(74) 대리인
특허법인 충정

전체 청구항 수 : 총 11 항

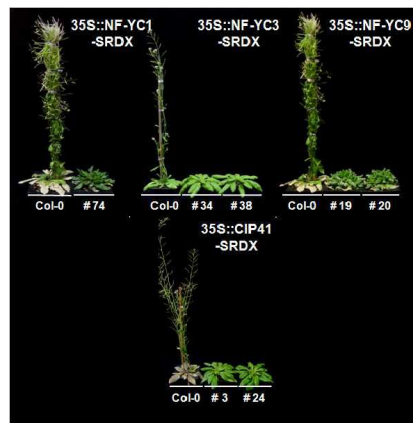
심사관 : 유진오

(54) 발명의 명칭 C I P 4 1 및 이를 이용한 식물의 개화시기 조절방법

(57) 요약

본 발명은 애기장대 유래의 G2-유사 전사인자(G2-like transcription factor)인 CIP41의 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 상기 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자를 이용한 식물의 개화시기 조절용 조성물, 재조합벡터, 형질전환 식물, 식물의 개화시기 조절방법, 및 식물의 개화 조절 물질 동정방법 등에 관한 것이다. 본 발명의 CIP41의 발현을 억제시킨 형질전환 식물은 야생형에 비하여 그 개화시기가 지연되었다. 또한 이 단백질은 광주기성 개화조절 인자인 CO (CONSTANS) 단백질과 결합하므로 CO와 함께 개화시기를 조절하는 역할을 할 것으로 예측된다. 따라서 본 발명의 개화시기 조절방법을 이용하여 유용한 형질전환 식물들을 개발할 수 있다. 특히, 수확량이 극대화되도록 형질전환 작물들을 설계할 수 있으며, 바이오 연료나 환경문제 해결 등의 용도로도 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자
우수경
 경상남도 함양군 안의면 갈촌길 6-1
심순애
 경상남도 진주시 명석면 진주대로2122번길 12-5

김혜진
 경상남도 사천시 곤양면 곤북로 48
전수정
 경상남도 진주시 내동로348번길 10, 102동 1605호
 (가좌동, 가좌그린빌주공아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ00951402
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21사업-시스템농생명공학사업단
연구과제명	인터랙티브기법을 이용한 생장 및 재해관련 전사인자 발굴 및 기능분석
기 여 율	1/1
주관기관	농촌진흥청
연구기간	2013.02.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

애기장대 유래의 CIP41 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA를 포함하는 식물의 개화시기 조절용 조성물.

청구항 2

애기장대 유래의 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진 또는 억제시키는 것을 특징으로 하는 개화시기 조절 식물 제작용 재조합백터.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 재조합백터는 CIP41을 암호화하는 유전자 및 상기 유전자에 융합된 억제 모티프(repressor motif) SRDX를 포함하는 것을 특징으로 하는 개화시기 조절 식물 제작용 재조합백터.

청구항 4

제2항 또는 제3항의 재조합백터로 형질전환된 식물.

청구항 5

애기장대 유래의 CIP41을 암호화하는 유전자를 이용한 식물의 개화시기 조절방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 조절은 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현을 유도 또는 억제하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 식물의 개화시기 조절방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조절은 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현을 유도할 수 있는 재조합백터로 식물체를 형질전환시켜 식물의 개화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 식물의 개화시기 조절방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 조절은 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 재조합백터로 식물체를 형질전환시켜 식물의 개화를 지연시키는 것을 특징으로 하는 식물의 개화시기 조절방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 유전자의 발현을 억제시키는 방법은 CRES-T (Chimeric Repressor gene Silencing Technology) 시스템에 의한 것이며, 상기 재조합백터는 억제 모티프(repressor motif)인 SRDX를 포함하는 것을 특징으로 하는 식물의 개화시기 조절방법.

청구항 10

애기장대 유래의 CIP41을 암호화하는 유전자를 이용한 식물의 개화 조절 물질 동정방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 방법은 식물체에 대상 물질을 처리하는 단계; 및 상기 식물체에서 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 식물의 개화 조절 물질 동정방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 애기장대 유래의 G2-유사 전사인자(G2-like transcription factor)인 CIP41의 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 이용한 식물의 개화시기 조절용 조성물, 재조합백터, 형질전환 식물, 식물의 개화시기 조절방법, 및 식물의 개화 조절 물질 동정방법 등에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 개화는 식물이 영양생장에서 생식생장으로 전환되는 중요한 발달과정이다. 개화시기의 적절한 조절은 그 식물의 존속과 번식 측면에서 매우 중요하다. 지금까지 개화시기 조절에 관한 연구는 주로 모델 식물인 애기장대 (*Arabidopsis*)를 통해 진행되어 왔으며, 그 중에서도 광주기성 개화조절(photoperiodic flowering control)에 관하여 가장 많은 연구가 진행되어 왔다. 콘스탄스(CONSTANS; CO)는 광주기성 개화조절에 있어 핵심 인자로 작용하고, CO가 하위단계의 *FT*와 *SOC1*과 같은 flowering integrator 유전자들을 활성화시킴으로써 개화를 촉진한다고 보고되어 있다. 그러나 분자수준에서 CO가 어떻게 *FT*의 발현을 유도하는지에 대한 연구는 아직 미흡한 상태이다. 최근에 단백질 네트워크 연구를 통해 많은 조절 단백질이 다른 단백질과 결합하여 기능을 하고 있다는 사실에 비추어 볼 때 CO도 여러 다른 전사조절 단백질과 직, 간접적으로 결합하여 *FT*를 활성화시킬 것으로 추측된다. 대한민국 등록특허 KR 10-0775957에는 CO 단백질의 식물 개화시기 조절인자로서의 용도에 관하여 기재되어 있으며, 공개공보 WO 96/014414에도 애기장대 유래의 CO 유전자 및 그와 상동성 있는 유전자의 용도에 관해 기재되어 있다.

[0003] 이에 본 발명자들은 하이스루풋 이스트 투 하이브리드 스크리닝 (high-throughput yeast two hybrid screening)을 통해 CO와 결합하는 후보물질을 검색하고, 이들의 기능을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다. 본 발명에 따른 G2-유사 전사인자인 CIP41 (At5g06800)의 기능에 관해서는 아직 밝혀진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 애기장대 유래의 CIP41을 이용한 식물의 개화시기 조절 물질을 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은 CIP41을 이용한 식물 형질전환용 재조합백터를 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 다른 목적은 CIP41을 이용하여 개화시기가 조절된 형질전환 식물을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 CIP41을 이용하여 식물의 개화시기를 조절하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 CIP41을 이용하여 식물의 개화를 조절하는 물질을 동정하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 애기장대 유래의 CIP41을 이용한 식물의 개화시기 조절 물질을 제공한다. 상기 조성물은 CIP41 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA를 포함할 수 있다.

[0010] 또한, 본 발명은 애기장대 유래의 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진 또는 억제시키는 것을 특징으로 하는 개화시기 조절 식물 제작용 재조합백터를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 재조합백터는 CIP41을 암호화하는 유전자 및 상기 유전자에 융합된 억제 모티프(repressor motif) SRDX를 포함하는 것일 수 있다.

- [0012] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 재조합백터로 형질전환된 식물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 애기장대 유래의 CIP41을 암호화하는 유전자를 이용한 식물의 개화시기 조절방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조절은 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현을 유도 또는 억제하여 이루어질 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조절은 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현을 유도할 수 있는 재조합백터로 식물체를 형질전환시켜 식물의 개화를 촉진하는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조절은 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 재조합백터로 식물체를 형질전환시켜 식물의 개화를 지연시키는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유전자의 발현을 억제시키는 방법은 CRES-T (Chimeric Repressor gene Silencing Technology) 시스템에 의한 것일 수 있으며, 상기 재조합백터는 억제 모티프(repressor motif)인 SRDX가 사용될 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 애기장대 유래의 CIP41을 암호화하는 유전자를 이용한 식물의 개화 조절 물질 동정방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법은 (a) 식물체에 대상 물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 식물체에서 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 CIP41의 발현을 억제시킨 형질전환 식물은 야생형에 비하여 그 개화시기가 지연되었다. 또한 이 단백질은 광주기성 개화조절 인자인 CO (CONSTANS) 단백질과 결합하므로 CO와 함께 개화시기를 조절하는 역할을 할 것으로 예측된다. 따라서 본 발명의 개화시기 조절방법을 이용하여 유용한 형질전환 식물들을 개발할 수 있다. 특히, 수확량이 극대화되도록 형질전환 작물들을 설계할 수 있으며, 바이오 연료나 환경문제 해결 등의 용도로도 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 CO 결합 단백질을 찾기 위하여 사용된 이스트 투 하이브리드 스크리닝 방법을 나타낸 그림이다.
- 도 2는 이스트 투 하이브리드 스크리닝에 사용할 바이트(bait) 플라스미드 BD-CONSTANS에 대한 자가활성(self-activation) 측정 결과이다. A는 콘스탄스 단백질의 구조이다. B는 BC-CO(1-373)(전장) 및 BD-CO Δ 133-174 구조물에 대한 자가활성 측정 결과이다. C는 BD-CO(1-373) (전장) 및 BD-CO Δ 133-174 구조물에 대하여 ONPG liquid β -galactosidase 어세이를 사용하여 자가활성을 측정한 결과이다.
- 도 3은 이스트 투 하이브리드 스크린을 사용하여 단백질간 결합을 실험한 결과이다. 1404개의 애기장대 TF들을 pDEST22 벡터에 넣고 각각 Gal4-BD-CO Δ 133-174 바이트 플라스미드를 포함하는 효모 세포에 형질전환시키고 리포터 유전자들의 활성으로 스크리닝을 수행하였다.
- 도 4는 CRES-T (Chimeric Repressor gene silencing Technology)를 설명하는 그림이다. CRES-T에서, 키메라 억제인은 억제 도메인(RD)에 결합함으로써 전사 활성인자에서 전사 억제인으로 전환된다.
- 도 5는 장일(LD) 조건에서 6개의 SRDX 형질전환 식물들의 개화시기가 지연되었음을 보여주는 실험결과이다.
- 도 6은 G2-유사 전사인자인 CIP41의 유연관계를 분석한 결과이다.
- 도 7은 장일 조건에서 35S::CIP41-SRDX의 개화시기가 지연되었음을 보여주는 실험결과이다.
- 도 8은 CO 및 본 발명의 CIP41 단백질의 세포내 위치 및 위치 발현 패턴을 나타내는 실험결과이다.
- 도 9는 효모에서 CO 및 본 발명의 CIP41 단백질 사이의 결합을 나타내는 실험결과이다.
- 도 10은 식물에서 CO 및 본 발명의 CIP41 단백질 사이의 결합을 나타내는 실험결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 애기장대 유래의 콘스탄스(CONSTANS; CO) 단백질은 광주기성 개화조절에 있어 핵심 인자로 작용한다는 사실이

알려져 있으므로, 본 발명자들은 1400여 개의 전사인자 암호화 영역(coding region)이 클로닝된 Gal4-AD 라이브러리를 이용하여 CO와 결합하는 핵심 전사인자를 선발하고자 하였다. 잠정적으로 CO와 결합하는 단백질들을 찾기 위하여, 본 발명자들은 96 웰(well) 이스트 투 하이브리드(yeast two hybrid)법으로 이스트 투 하이브리드 스크리닝을 수행하였다(도 1). 분석에 앞서, 효모에서 바이트 구조물(bait construct) (BD-CONSTANS)의 자가 활성을 시험하였다. *GAL2::ADE2* 및 *GAL1::HIS3* 리포터(reporter) 유전자들을 갖고 있는 효모 균주 pJ694A에 BD-CO 플라스미드를 삽입시켰다. Gal4 BD-CO는 0.5mM 3-AT 농도 및 SD-Leu-His-Ade(SD-L-A-H) 배지에서도 자가 활성을 나타내었다(도 2). CO의 중간 영역(133-174)이 잠정적인(putative) 활성 도메인으로 예상되었기 때문에, Gal4 BD-CO Δ 133-174 결손형(deletion form)을 제작하였다. 예상대로, BD-CO Δ 133-174 결손 구조물은 SD-Leu-His-Ade(SD-L-A-H) 배지뿐만 아니라 0.5mM 3-AT 농도에서도 자라지 않아 자가활성을 나타내지 않았다(도 2). 96-웰 미세적정 플레이트(microtiter plate)를 사용하여 BD-CO Δ 133-174를 포함하는 바이트(bait) 세포들을 Gal4 AD에 융합된 각각의 TF로 개별적으로 형질전환시켰다. 그 후 총 1,404개의 형질전환체들을 다양한 선택배지로 옮겨서, 3개의 리포터(reporter) 유전자들인, *ADE2*, *HIS3* 및 *LacZ*를 동시에 활성화시키는 클론(clone)들을 선별하였다(도 3). 위와 같이 애기장대(*Arabidopsis*)의 전사인자 라이브러리에서 유전체 수준의 이스트 투 하이브리드 스크린(yeast two-hybrid screen)을 수행한 결과, 잠정적으로 CO와 결합할 것으로 예측되는 47개의 단백질들을 최종적으로 선별하였으며, 이 중에는 18개의 비-박스(B-box) 단백질들, 4개의 bZIPs (basic leucine zipper proteins), 5개의 CCAAT-박스 결합 단백질 등이 포함되었다.

[0023] 위와 같이 선별된 47개의 (잠정적인) CO 결합 단백질들의 생물학적 기능, 특히 실질적으로 개화시기에 영향을 미치는지 알아보기 위하여, CRES-T 시스템을 사용하였다[Hiratsu, K., et al. (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J.* 34: 733-739]. CRES-T는 식물의 전사인자들의 기능분석 및 식물 형질의 유전적 조작을 위하여 최근 개발된 매우 효과적인 수단이다. CRES-T에서는, 억제 도메인인 SRDX에 융합함으로써 전사 활성인자(activator)에서 억제인자(repressor)로 전환된 키메라 억제인자(chimeric repressor)가 식물에서 발현된다(도 4). SRDX는 SUPERMAN 억제인자(repressor)에서 발견된 변형된 EAR (ERF associated Amphiphilic Repression) 모티프(motif)이다. 키메라 억제인자는, 내생적인(endogenous) TFs들의 존재에도 불구하고, 표적 유전자의 전사를 억제시킴으로써 TF의 기능을 상실시킨다. 47개의 CO-결합 단백질들을 SRDX 억제인자 도메인과 융합시킴으로써 키메라 억제인자(chimeric repressor)로 전환시켰다. 아그로박테리움-매개 형질전환(*Agrobacterium*-mediated transformation)을 이용하여 상기 구조물(construct)들을 야생형 식물에 형질전환시켰다. 장일(long-day; LD) 조건에서 10일 후에 하이그로마이신(hygromycin)을 포함하는 MS 배지에서 저항성을 나타낸 형질전환 T₁ 식물들을 선별하여 토양으로 옮겼다. 각각의 형질전환 식물의 초기 분석 이후에, T₁ 세대에서 35S::NF-YC1-SRDX, 35S::NF-YC3-SRDX, 35S::NF-YC4-SRDX 및 35S::CIP41-SRDX를 포함하는 형질전환 식물들은 LD 조건에서 개화시기가 지연되는 것을 확인하였다(도 5). 이전의 연구에서, NF-YCs는 전장(full-length) CO와 결합하며, 유전적으로 CO-매개 개화 촉진에 필요한 인자라는 것이 밝혀져 있었다[Kumimoto, R.W., et al. (2010) NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 63: 379-391]. 본 발명자들 역시 3개의 NF-YC들이 CO-매개 개화 전사인자들임을 확인하였다. 하지만, G2-유사(like) 전사인자 CIP41 (At5g06800)의 개화시간 조절 기능에 대해서는 아직 알려진 바 없었다.

[0024] 상기 CRES-T 실험에서 CIP41은 식물의 개화와 관련성이 있는 것으로 나타났으므로 그 기능에 관한 추가적인 실험을 진행하였다. CIP41은 중간에 잠재적인(putative) myb-유사(like) DNA 결합 도메인을 가진 G2-유사 전사인자이다(도 6). 그러나 지금까지 CIP41의 기능은 알려진 바 없다.

[0025] 35S::CIP41-SRDX 형질전환 식물은 T₁ 식물에서 개화시기가 지연되었다. 개화시기 및 mRNA 발현 수준을 측정하기 위하여 T₃ 동형접합체(homozygote) 종자들을 얻었다. mRNA 발현 수준은 RT-PCR을 이용하여 측정하였다. 138개의 T₃ 식물들에 대하여 장일(long-day; LD) 조건에서 개화시간을 측정하였다. 식물의 추대생성(bolting)시 잎의 수의 평균이 15.2개였던 모체의(parental) Col-0에 비하여, 35S::CIP41-SRDX 형질전환 식물은 추대생성 전에 거의 세 배(평균=43.25)나 되는 잎을 생성하였다(도 7). 또한, 35S::CIP41-SRDX 형질전환 식물들은 어린 묘목 상태에서부터 성장이 지연되었다.

[0026] 한편, CIP41이 CO-매개 개화 조절과 관련이 있는지 알아보기 위하여, CIP41의 발현 위치 패턴이 CO의 것과 중복되는지를 조사하였다. CIP41 단백질들의 세포 내 위치(subcellular localization)를 조사하기 위하여, CaMV 35S 프로모터에 의해 조절되는 GFP-융합(fused) CIP41 (GFP:CIP41)을 제작하였다. 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개법을 사용하여 상기 GFP 융합 구조물(construct)을 담배 표피세포에서 일시적으로 발현시

켰다. 세포 내 위치는 형광현미경을 사용하여 분석하였다. GFP-CO 융합단백질은 세포 내에서 핵 안으로 위치하는 것으로 알려져 있다[Jang, S.H., et al. (2008) *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *TheEMBOJournal*.27:1277-1288]. 실험 결과, GFP:CO와 GFP:CIP41은 모두 핵에 위치하였다(도 8A). 이러한 결과는 CIP41이 CO와 같은 핵 단백질임을 의미한다. 다음으로 본 발명자들은 프로모터에 의해 조절되는 GUS (β -glucuronidase) 유전자 구조물 (*pCIP41::GUS*)을 이용하여 CIP41의 발현 위치(spatial expression)를 조사하였다. CIP41::GUS 활성은 주로 자엽(cotyledons) 및 잎의 관다발 조직(vascular tissue)에서 관찰되었다(도 8B). 이러한 CO와 CIP41의 중복되는 발현 패턴은 CIP41이 광주기성 경로에서 CO와 함께 개화시기 조절 역할을 수행한다는 것을 보여준다.

[0027] 이스트 투 하이브리드(yeast two hybrid) 스크리닝 결과, CIP41이 CO와 결합(interaction)하는 단백질이라는 것을 알 수 있었다. CO 및 CIP41 사이의 단백질-단백질 결합을 확인하기 위하여, BD-CO Δ 133-174를 사용한 이스트 투 하이브리드 어세이를 수행하였다. BD- 및 AD- 구조물(construct)들을 포함한 형질전환체들을 SD -T-L 및 SD -T-L-A-H 고체 배지에 점적하여 연속희석(serial dilution)시켰다. 효모 어세이 결과 CO 단백질은 효모에서 CIP41과 결합하였다(도 9). 추가로, 식물에서 CO가 CIP41 단백질과 결합하는지 알아보기 위하여 아그로박테리움을 침투시킨 담배 잎을 사용하여 BiFC 어세이를 수행하였다. BiFC 어세이를 수행하기 위하여, 바이너리 게이트웨이 벡터(binary gateway vector), pDEST-VYCE(R)^{GW} 및 pDEST-VYNE(R)^{GW} 를 각각 전장(full-length) CO 및 CIP41에 대하여 사용하여, C-YFP 및 N-YFP 단편에 대한 융합 구조물을 만들었다. 양 구조물들을 담배 잎에서 공동발현시키자, 형질전환 세포들의 핵 분획물에서 강한 YFP 신호들이 검출되었다(도 10). 이러한 결과들은 식물에서 CIP41이 CO 단백질과 결합하며, 이들 복합체가 개화시기 조절에 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 암시한다.

[0028] 따라서 본 발명은 애기장대 유래의 CIP41을 이용한 식물의 개화시기 조절 물질을 제공할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 CIP41 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 CIP41의 아미노산 서열 및 이를 암호화하는 유전자의 염기서열은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 유전체 데이터베이스에서 각각 유전자와 표지번호 At5g06800으로 검색이 가능하다.

[0029] 본 발명에 따른 CIP41 단백질의 범위는 상기 표지번호에 의해 검색되는 공지의 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. 여기에서 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 상기 공지의 아미노산 서열로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. 여기에서 "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체 내에서 개화시기 조절에 관여하는 활성을 의미한다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 CIP41 단백질을 코딩하는 유전자를 제공할 수 있다. 본 발명의 유전자는 상기 CIP41 단백질을 코딩하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 상기 공지되어 있는 서열로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 변이체는 상기 공지된 염기서열과 각각 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 여기에서 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 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(gap)를 포함할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 애기장대 유래의 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진 또는 억제시키는 것을 특징으로 하는 개화시기 조절 식물 제작용 재조합백터를 제공한다. 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 재조합백터는 본 발명에 따른 CIP41을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터일 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 재조합 백터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 여기에서 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 것을 지칭하는 것이다. 상기 벡터로 형질전환된 재조합 세포는 상기 세포의 자연 형태에서는 발현되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 자연 상태의 세포에서 발현되는 유전자를 발현할 수 있으나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다. 여기에서 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분

자를 지칭한다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용될 수 있다. "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0032] 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 DNA를 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 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 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 포스포노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 일실시예에 있어서, 식물 발현 벡터의 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적 (constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다. 또한 상기 벡터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAm1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투머파시엔스(agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 재조합벡터로 형질전환된 식물을 제공한다. 상기 식물은, 예를 들어, 담배, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 쌍자엽 식물일 수 있으나, 바람직하게는 애기장대이다. 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 식물양자를 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; 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-코딩된) 입자충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 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. 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 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 된다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종

자, 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.

[0035] 또한, 본 발명은 본 발명의 CIP41을 암호화하는 유전자를 이용한 식물의 개화시기 조절방법을 제공한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조절은 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현을 유도할 수 있는 재조합벡터로 식물체를 형질전환시켜 식물의 개화를 촉진시키는 것일 수 있다. 또한, 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 개화시기 조절 방법은 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 재조합벡터로 식물체를 형질전환시켜 식물의 개화를 지연시키는 것일 수 있다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 개화시기 조절 방법은 CIP41을 암호화하는 유전자의 기능을 상실시켜 개화를 지연시키는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 개화시기 조절방법은 외래 유전자 삽입 또는 유전자 결실 등에 의하여 CIP41 유전자의 기능 상실을 직접 유도하거나, 식물에 기능 상실이 유도된 CIP41 유전자를 포함하는 DNA 구조체를 사용하여 형질전환시킴으로써, 개화를 지연시키는 방법일 수 있다. 예컨대, 상기 CIP41 유전자의 기능 상실은 상기 유전자 내부의 특정 위치에 T-DNA와 같이 식물 세포 염색체 내 삽입 가능한 DNA 단편이 삽입됨으로써 유도될 수 있다. 또한, 상기 CIP41 유전자의 기능 상실은 상기 유전자의 전부 또는 일부가 제거되어 유도된 것일 수 있다. 본 발명의 개화시기 조절 방법은 식물을 상기와 같은 방법으로 기능이 상실된 CIP41 유전자를 포함하는 DNA 구조체에 의하여 형질전환시킴으로써, 상기 식물의 개화를 지연시키는 방법일 수 있다.

[0036] 본 발명의 방법에 의해 개화가 조절될 수 있는 식물체의 예로는, 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스 등을 포함하는 사료작물류 등이 있다.

[0037] 또한, 본 발명은 본 발명의 CIP41을 암호화하는 유전자를 이용한 식물의 개화 조절 물질 동정방법을 제공한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법은 (a) 식물체에 대상 물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 식물체에서 CIP41을 암호화하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (a)단계의 대상 물질에는, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드 모조물, 단백질, 화합물 및 생물체제 등이 포함될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (a)단계의 물질을 처리하는 방법에는 식물에 대한 형질전환 방법이 포함될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (b)단계의 유전자 발현수준 측정은 노던 블랏, 웨스턴 블랏, RT-PCR 등 공지된 측정방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] <실시예 1>

[0040] 이스트 투 하이브리드 스크리닝(Yeast two-hybrid screening)

[0041] 콘스탄스(CONSTANS; CO)를 제거한 바이트 구조물(bait construct) (COΔ133-174)을 pJ69-4A (*MAT a trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*)에 형질전환시켰다. BD-COΔ133-174를 포함하는 효모 세포를 루이신(leucine)이 결핍된 고체 SD 배지(SD -L)에 도말하였다. 자라는 콜로니를 액체 SD -L 배지에서 배양시켰다. BD COΔ133-174 구조물을 다양한 농도(0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM 및 5 mM)의 3-AT를 포함하는 루이신 및 히스티딘 결핍 고체 SD 배지(SD -L-H)에서 배양시켜 자가 활성화(auto-activation)를 조사하여, 바이트로 사용하기에 적합한 것을 선별하였다. 1400개의 AD-TF DNA를 각각 0.5 μg씩 96 웰(well) RV 플레이트(바이오니아사, 대한민국)의 각각의 웰에 첨가하였다. 갓 자란 BD-CONSTANS 함유 효모세포들을 각각의 웰에 첨가하고 small scale LiAc 법(Clontech)에 따라 형질전환시켰다. 컴피턴트 세포(competent cell)를 포함하는 BD-CONSTANS 분주물(aliquot) 50 μl를 96 웰 RV 플레이트에 옮기고, 300 μl

의 40 % PEG (polyethylene glycerol)를 RV 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 효모 세포를 30℃에서 30분간 배양한 뒤, 42℃에서 15분간 열 충격(heat shock)을 가하였다. 형질전환된 세포들을 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리시킨 뒤 생성된 펠렛(pellets)을 100 μ l의 SD 배지에 녹였다. 6.5 μ l의 형질전환 효모 세포들을, 트립토판 및 루이신 결핍 고체 SD 배지(SD -T-L), 0 mM 에서 5 mM의 3-AT를 함유한 트립토판, 루이신 및 히스티딘 결핍 SD 배지(SD -T-L-H), 및 트립토판, 루이신, 아데닌, 히스티딘 결핍 SD 배지(SD -T-L-A-H)에 점적(spottting)하였다.

[0042] <실시예 2>

[0043] 식물 및 배양 조건

[0044] 본 발명의 실시예에서는 *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0)를 실험 식물로 사용하였다. 표면 살균 처리한 애기장대(*Arabidopsis*) 종자들을 2% 수크로오스 및 0.25% 피타겔(phytagel)을 함유한 MS (Murashige & Skoog)에 뿌리고, 어둠 속에서 3일간 4℃로 배양한 뒤, 배양 챔버로 옮겨 LD (16시간 명/8시간 암) 조건에서 22℃로 배양하였다. 개화 시기는 식물의 추대생성(bolting)시에 잎의 총 수를 세어 측정하였다.

[0045] <실시예 3>

[0046] 형질전환 식물의 제작

[0047] CO와 결합하는 TF들의 전장(full-length)을 CaMV 35S 프로모터, 게이트웨이 카세트(gateway cassette) 및 SRDX 억제인자 도메인(repressor domain)을 포함하는 pH35GEAR 벡터에 삽입하였다. 모든 구조물(construct)들을 *Agrobacterium* strain GV3101 에 삽입시킨 뒤, 플로럴 딥 방법(floral dip method)으로 Col-0 식물들에 형질전환시켰다[Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743]. 30 μ g/ml의 하이그로마이신을 포함하는 MS (Murashige & Skoog) 배지에서 하이그로마이신(hygromycin) 저항성으로 형질전환 종자들을 선별하였다.

[0048] <실시예 4>

[0049] 총(total) RNA 분리 및 RT-PCR

[0050] 유전자 발현 패턴을 분석하기 위하여, 트리졸(TRIZol) (Invitrogen)을 생산자의 매뉴얼에 따라 사용하여 야생형 식물들로부터 총 RNA를 분리하였다. ReverTra Ace (Toyobo)를 사용하여 올리고(dT)₁₈ 프라이머로 4 μ g의 총 RNA로부터 cDNA를 합성하고, 이를 PCR-증폭에 사용하였다. cDNA 양을 표준화하기 위한 내부 대조군으로 *ACTIN2* (*Act2*)를 사용하였다.

[0051] <실시예 5>

[0052] 조직화학 GUS 어세이

[0053] 묘목(seedling)을 LDs 조건으로 고체 배지(Murashige & Skoog)에서 10일간 배양하고, 페트리 접시에 놓은 후, 아세톤을 10분간 처리하였다. 이어서, 식물들을 50 mM 인산염(phosphate) 버퍼, 0.2 % Triton-X, 2 mM 페리시안화 칼륨(potassium ferricyanide), 2 mM 페로시안화 칼륨(potassium ferrocyanide), 및 0.1 % (W/V) X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide)를 포함하는 염색 버퍼에서 37℃로 배양하였다. 염색 후에, 시료들을 표백하고 70% 에탄올로 1시간 동안 건조시켰다.

[0054] <실시예 6>

[0055] 담배 잎에서의 단백질의 일시적 발현

[0056] GFP 발현을 위하여 CIP41 구조물을 바이너리(binary) 식물 벡터인 pMDC43에 클로닝시킨 후, 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 안으로 도입시켰다. 아그로박테리움을 이용한 일시적(transient) 형질전환은 공지된 방법에 따라 수행하였다[Voinnet, O., et al. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33: 949-956]. 선별용 항생제를 포함한 10 mL YEP에서 플라스미드를 포함하는 아그로박테리움을 28℃로 오버나잇 배양한 후, 원심분리를 통해 수득한 뒤, 침입(infiltration) 배지(10 mM MgCl₂, 100 μ M acetosyringone, 및 10mM MES)에서 배양하였다. 침입 배지에서 3시간 동안 세포들을 실온에서 보관한 후, 3주령 *Nicotianabenthhamiana* 식물에 시린지(syringe)법으로 침투시켰다. 침입 후에, LD 조건 하에서 식물들을 1일에서 3일 동안 22℃로 보관하였다.

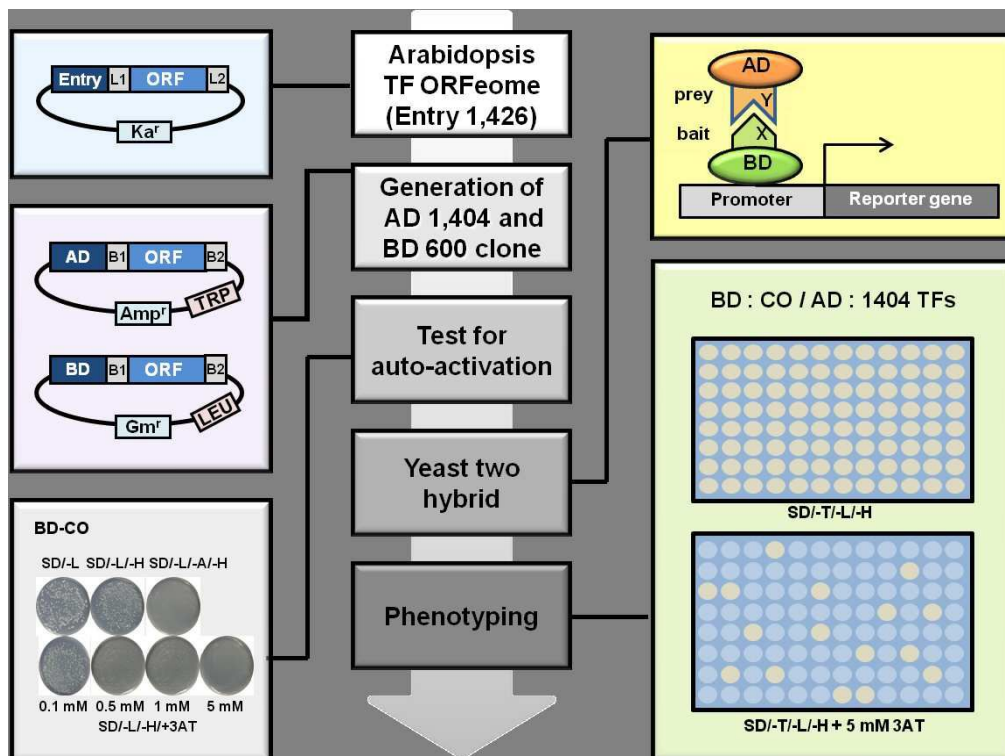
[0057] 형광 신호 및 명시야(bright-field) 사진들은 Olympus AX-70 형광현미경으로 찍었다.

[0058] BiFC 어세이를 위하여, 유전자들을 BiFC 벡터인, pDEST-VYCE(R)^{GW} 및 pDEST-VYNE(R)^{GW} 에 클로닝하였다[Gehl, C., et al. (2009) New GATEWAY vectors for High Throughput Analyses of ProteinProtein Interactions by Bimolecular Fluorescence Complementation. *Mol plant*. 2: 1051-1058]. 아그로박테리움을 이용한 일시적인 형질전환은 3주령 된 담배 잎으로 수행하였다.

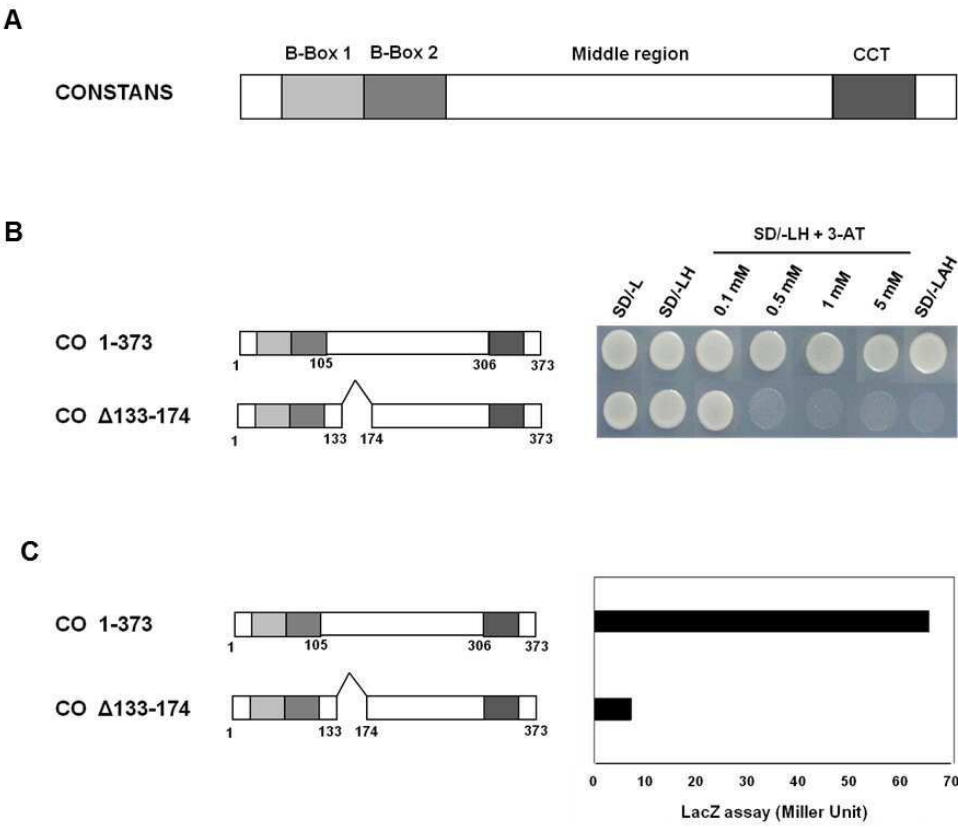
[0059] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

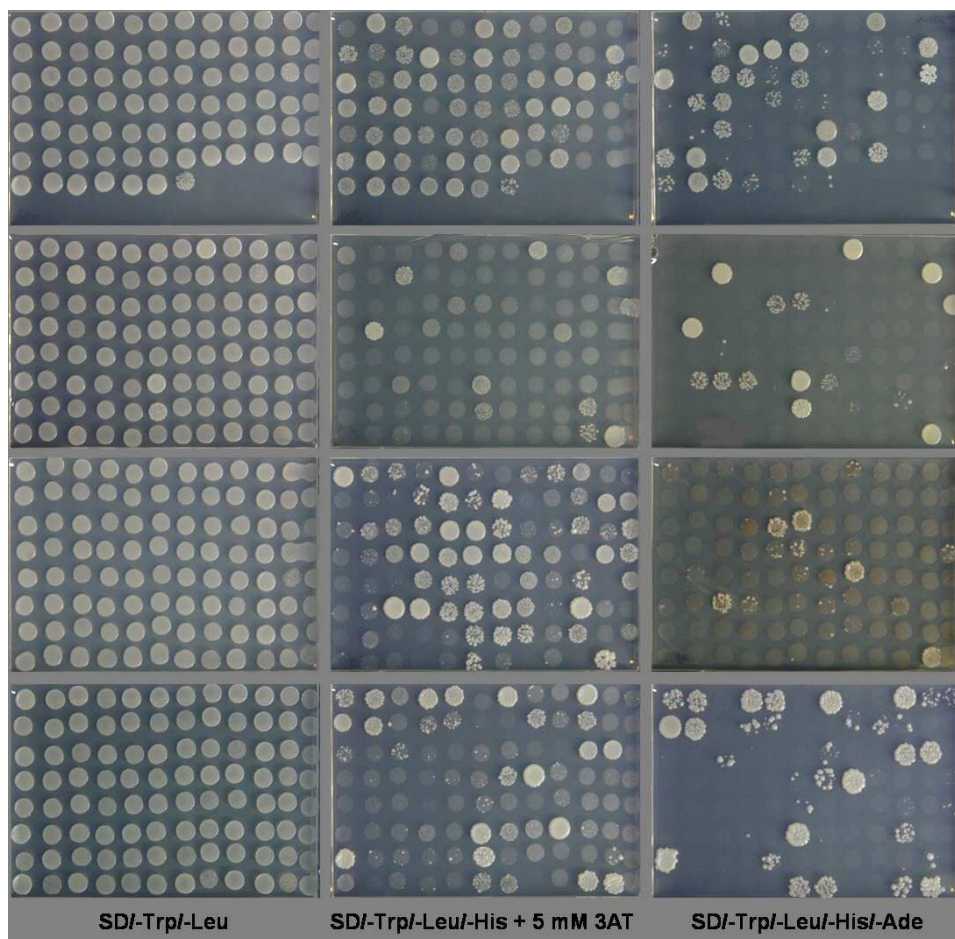
도면1



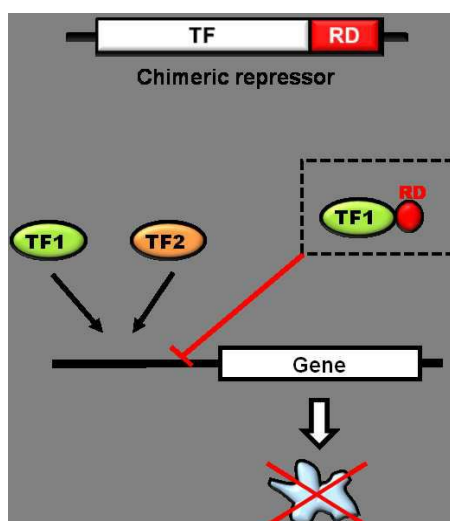
도면2



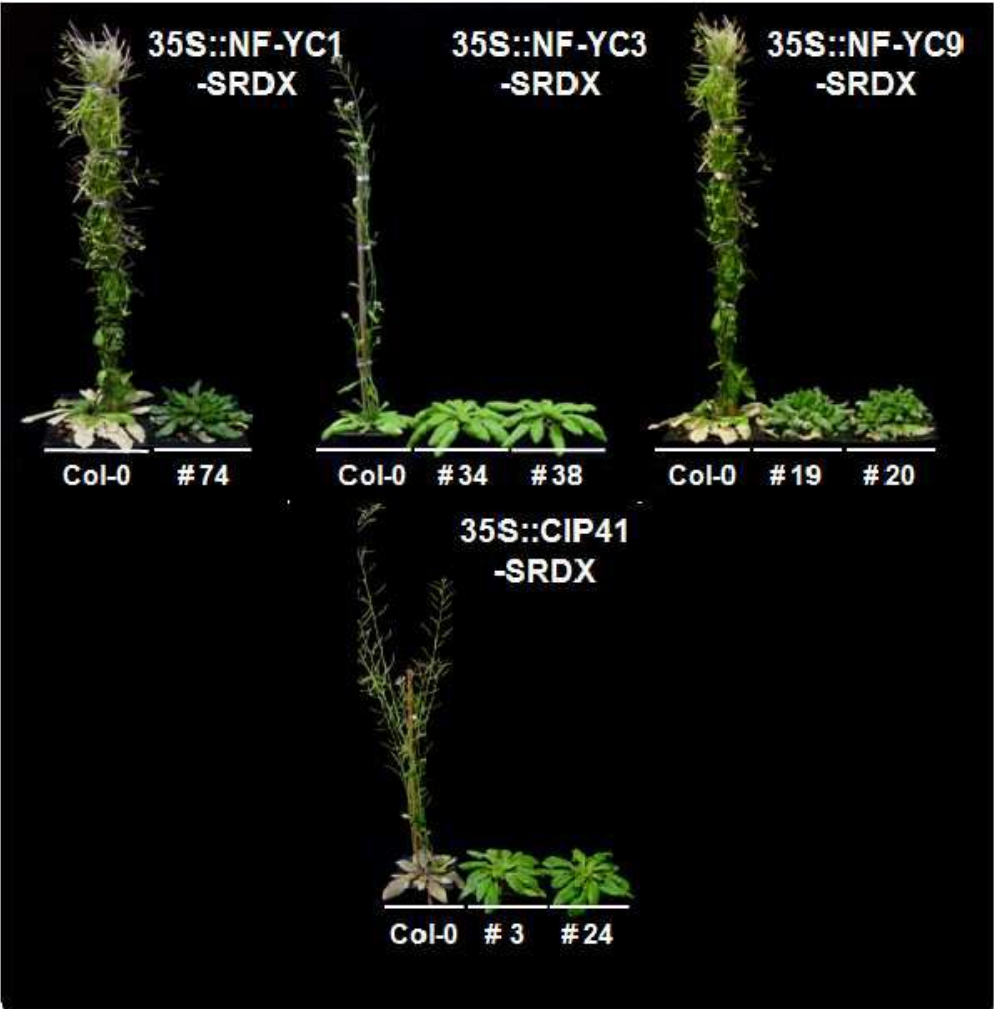
도면3



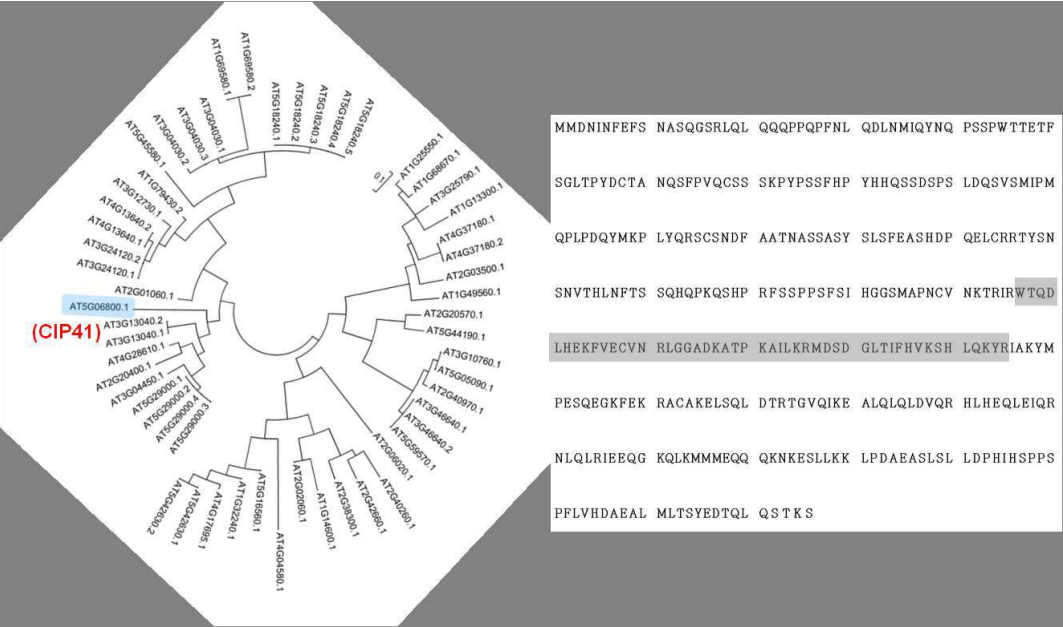
도면4



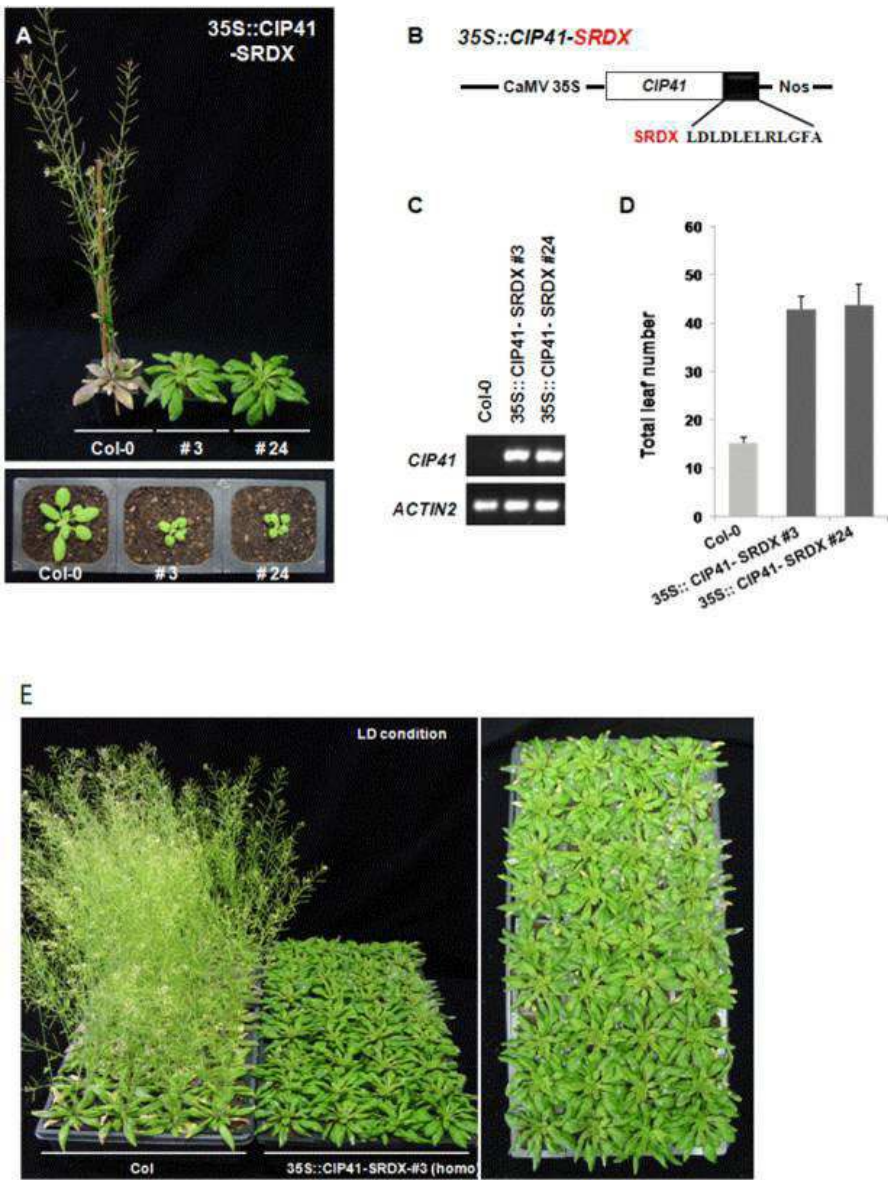
도면5



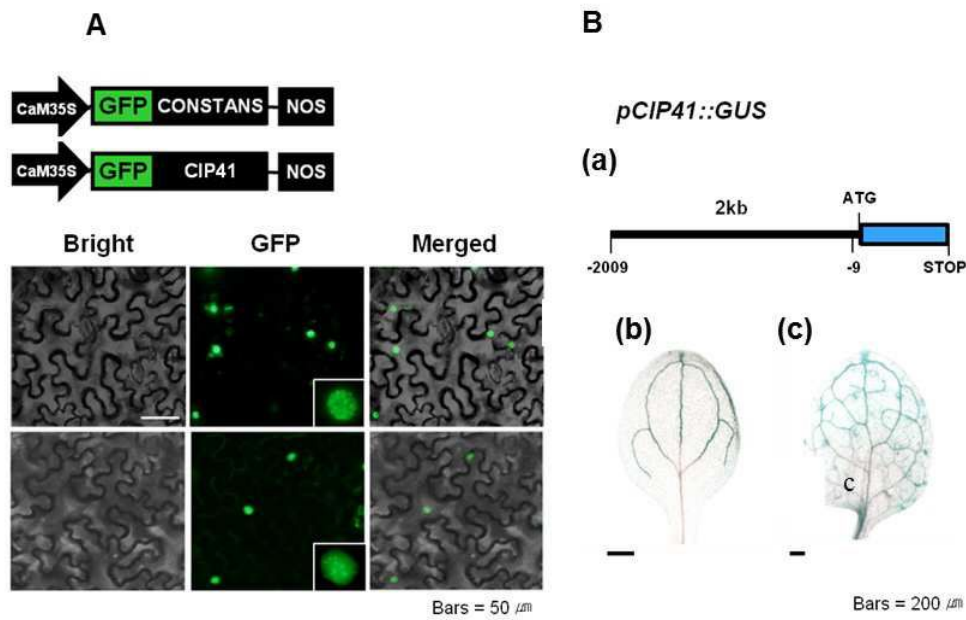
도면6



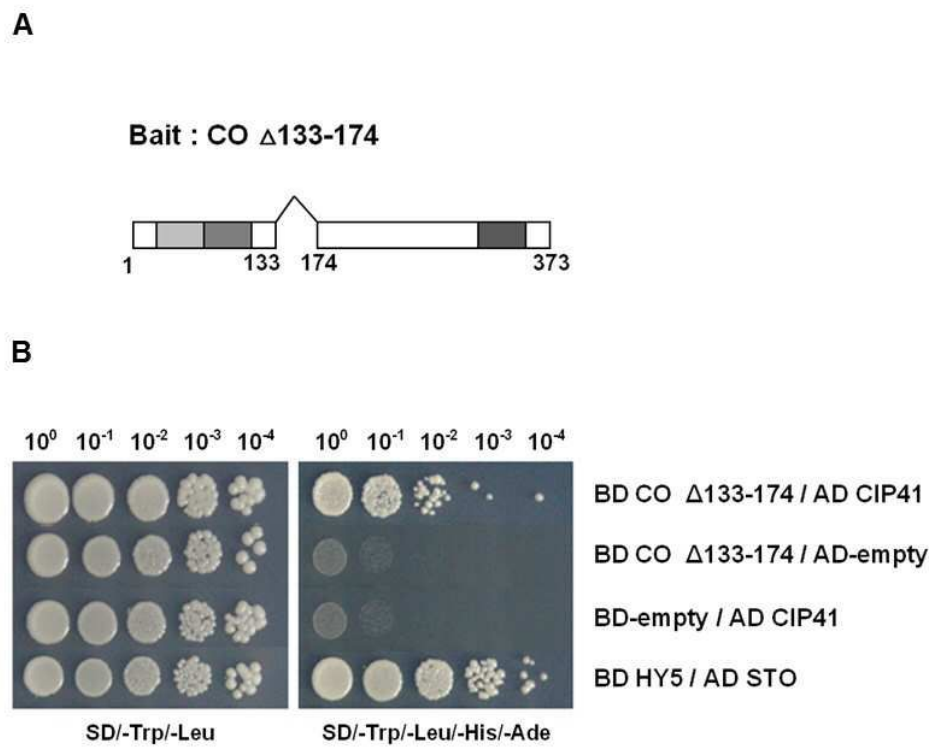
도면7



도면8

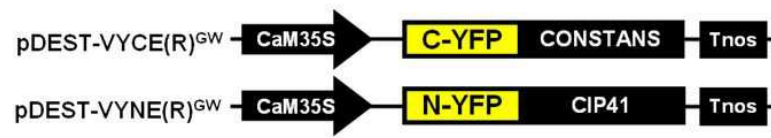


도면9



도면10

A



B

