

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0050490 (43) 공개일자 2014년04월29일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(21) 출원번호 10-2012-0116968	(72) 발명자 이호정 서울 광진구 용마산로36길 70, 401호 (중곡동, 엘림빌라)	
(22) 출원일자 2012년10월19일 심사청구일자 2012년10월19일	홍석환 광주 북구 서양로 62-2, 401호 (중흥동, 서진빌라) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 김순웅	

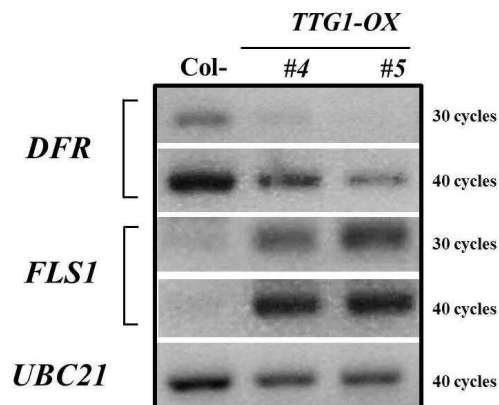
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **TTG1을 이용한 식물 생장이 촉진되고 가뭄 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체**

(57) 요약

본 발명은 *TTG1* 유전자의 과발현되어, 식물의 생장이 촉진되고, 가뭄 스트레스에 내성을 가지며 플라보놀 합성이 증가된 형질전환 식물체, 및 가뭄 스트레스에 대한 식물체의 내성을 증가시키거나 식물체의 플라보놀 생성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 따라서 본 발명에 의하면 플라보노이드 생합성 경로의 유전적 조작에 의해 ABA 및 비생물적 스트레스의 저해를 극복할 수 있는 스트레스 내성 작물의 개발 및 항산화능을 가진 플라보놀의 생산을 촉진할 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

대표도 - 도4a



(72) 발명자

김준혁

서울 성북구 화랑로17길 28, (상월곡동)

누옌 호아이 누옌

서울 성북구 안암로 145, 136-713 (안암동5가, 고려대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 112068031SB010

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 [주관] 폴리페놀 대사조절 유채품종 개발을 통한 유채유 향산화능 향상에 관한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.08.08 ~ 2013.08.07

특허청구의 범위

청구항 1

TTG1 유전자가 도입되어 과발현되어, 식물의 생장이 촉진되고 비생물적 스트레스에 대해 내성을 갖는 형질전환 식물체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 비생물적 스트레스는 ABA에 의한 스트레스 또는 가뭄 스트레스인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

청구항 3

TTG1 유전자가 도입되어 과발현되어, 플라보놀 생산이 증가된 형질전환 식물체.

청구항 4

TTG1 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시켜 식물체의 플라보노이드 생합성 경로를 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 뿌리 성장을 촉진하는 방법.

청구항 5

TTG1 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시켜 식물체의 플라보노이드 생합성 경로를 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 비생물적 스트레스는 ABA에 의한 스트레스 또는 가뭄 스트레스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

TTG1 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시켜 식물체의 플라보노이드 생합성 경로를 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 플라보놀 생산을 증가시키는 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 *TTG1*을 이용한 식물 생장이 촉진되고 가뭄 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 *TTG1* 유전자의 과발현되어, 식물의 생장이 촉진되고, 가뭄 스트레스에 내성을 가지며 플라보놀 합성이 증가된 형질전환 식물체, 및 가뭄 스트레스에 대한 식물체의 내성을 증가시키거나 식물체의 플라보놀 생성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

식물은, 병원균, 초식동물, 저온 및 가뭄과 같은 생물적 또는 비생물적 인자에 의한 환경 변화에 민감하다. 이들 스트레스에 저항하기 위해, 식물은 발달적 변화를 겪는데, 주어진 환경에서 어린싹(shoot) 및 뿌리 시스템 구조에서 유연성(plasticity)을 나타낸다. 예를 들어, 식물은 정상 조건하에서 많은 측근(lateral root, 이하 LR과 혼용함)을 생성하는 반면, 측근의 개시 및 신장은 건조한 조건하에서는 제한되는데, 이는 토양 깊은 곳의 물에 도달하기 위한 주근(primary root)의 신장을 최대화하기 위한 것이다 (Malamy 2005; van der Weele et al. 2000; Xiong et al. 2006). 발달적 유연성(developmental plasticity)은 장기간에 걸쳐 진화되어 왔고, 식물의 "리얼-타임 어댑션(real-time adaption)"에 영향을 미쳐 특정 환경에 순응하게 할 수 있다.

[0003]

뿌리는 식물 생장의 특이한 특징으로 발달적 유연성에 대한 연구를 위한 최적의 시스템을 제공한다 (Malamy

2005). 뿌리 시스템 구조의 주요 결정인자 중 하나는 측근(LR) 개시 및 성장이다. 이 발달 프로세스는 오옥신, ABA, 가뭄 스트레스 및 삼투압과 같은 내부 및 외부의 인자들에 의해 영향을 받는다(Fukaki and Tasaka 2009; Deak and Malamy 2005).

- [0004] 중요한 식물호르몬인 오옥신은, 주로 생장점(shoot apex)에서 생성되어 극성 오옥신 수송체에 의해 뿌리로 이동된다(Ljung et al. 2001). 오옥신의 극성 흐름 (Polar flows)은 기관 발달, 세포 신장 및 세포 분열을 조절하여, 굴광성(phototropism), 굴중성(gravitropism) 및 굴촉성(thigmotropism)과 같은 반응에서 어린싹 및 뿌리 시스템 구조를 변경하게 된다(reviewed in Peer et al. 2011).
- [0005] 대조적으로, ABA는 측근 발생의 부정적 조절자 (negative regulator)로서 뿌리의 생장 및 기능을 저해한다(Pilet 1975; Deak and Malamy 2005). 외부에서 첨가된 ABA는 측근 분열조직의 활성화 이전에 패어런트 루트(parent root)에서 측근 원시세포(LR primordia)의 발생을 억제한다(De Smet et al. 2003). 알려진 바와 같이, ABA-유도 측근 저해는 오옥신-독립적 경로를 통해 발생한다(Fukaki and Tasaka 2009). 배지에 오옥신을 첨가하여도 ABA에 의한 측근 저해를 억제할 수 없는데, 이 사실은 ABA에 민감하고 오옥신에 독립적인 체크포인트(ABA-sensitive, auxin-independent checkpoint)는 발생 후 단계(post-emergence stage)에 관련되어 있다는 것을 암시한다(De Smet et al. 2003). 이와 대조적으로, 뿌리 성장 저해 분석에서 애기장대 열성 돌연변이 *axr2-1/iaa7*는 외생 ABA에 저항성인 반면, *slr-1/iaa14* 돌연변이는 ABA에 과민성으로, 이는 Aux/IAA-의존적 오옥신 신호전달도 ABA에 대한 식물 뿌리의 반응에 영향을 미친다는 것을 암시한다(Fukaki and Tasaka 2009).
- [0006] 플라보노이드는 2차 대사산물로서, 구조에 따라 플라보논, 이소플라보노이드, 안토시아닌, 플라보놀, 카테킨, 플라보논 및 프로안토시아니딘을 포함하는 여러 가지 서브클래스로 구분된다. 플라보노이드가 식물의 생장 및 발달에 필수적이지는 않지만, 플라보노이드는 근류형성(nodulation), 번식력(fertility), 방어 시스템(defense system) 및 UV로부터 보호(UV protection)에서 중-특이적 역할을 한다(Peer and Murphy 2007).
- [0007] 플라보노이드 생합성-관련 유전자들의 조화된 업-레귤레이션(up-regulation)에 대해서는 잘 확립되어 있고, 플라보노이드 생합성을 위한 일부 구조 유전자들이 다양한 식물 종에서 확인되었다(Olsen et al. 1993; Shirley et al. 1995). 애기장대 유전자 *TRANSPARENT TESTA 2 (TT2)*, *TRANSPARENT TESTA 8 (TT8)* 및 *TTG1*은 MYB, bHLH 및 WD40 전사인자를 각각 인코딩한다; 이들 단백질들은, *DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE (DFR)*, *LEUCOANTHOCYANIDIN DIOXYGENASE (LDOX)* 및 *ANTHOCYANIDIN REDUCTASE (ANR)*과 같은 플라보노이드 생합성 유전자의 발현을 유도하기 위해 전사 복합체(transcriptional complex)로서 함께 기능을 한다(Lepiniec et al. 2006; Dubos et al. 2008).
- [0008] 플라보노이드 생합성 경로의 다른 브랜치(branch)에서, 식물은 플라보놀이라는 화합물을 생산할 수 있다. 플라보놀은 플라보노이드 그룹에 속하는 이차 대사산물의 하나의 클래스이다. 플라보놀은 중앙 파이란 고리(central pyran ring)의 산화 정도에 의해 다른 플라보노이드 클래스와 구별된다(Skerget et al. 2005). 동물 세포에서, 플라보놀은 ROS의 발생을 저해하여, 산화적 손상으로부터 세포들을 보호하게 된다(Pollastri and Tattini 2011). 많은 증거는, 오옥신의 극성 이동 경로의 변경(redirecting the polar auxin transport pathway)으로 플라보놀이 식물의 생장 및 발달을 조절할 수 있다는 것을 보여주고 있다(Pollastri and Tattini 2011; Santelia et al. 2008). 이들 화합물은 오옥신 수송체의 조절자로 작용하여, 어린싹 및 뿌리 형성(root branching)의 변경을 유도한다고 알려져 있다(Peer and Murphy 2007).
- [0009] 비록 많은 증거가 Aux/IAA-의존 오옥신 신호 컴포넌트의 변경을 통해 ABA가 측근 생장을 억제한다고 것을 암시하지만, 이들 크로스토크(crosstalk)의 기초를 이루는 분자적 메커니즘은 여전히 정의하기 어렵다. 최근 UV 스트레스에 대항하는 방어 메커니즘을 활성화하기 위해 ABA는 페놀 생합성을 유발하는 것으로 알려졌다(Berli et al., 2010).
- [0010] 뿌리 시스템 구조의 변이(modification)는 자극과 억압 신호 전달의 캐스케이드(stimulatory and repressive signaling cascades)에서의 균형의 결과라는 것은 잘 확립되어 있다. 예를 들면, ABA는 원시세포(primordial)에서 측근의 형성을 억제하기 위해 제안되는 반면, 오옥신 축적은 측근의 개시와 신장에 중요하다(Deak and Malamy 2005).
- [0011] 비록 뿌리 구조는 오옥신과 ABA와 같은 식물호르몬에 의해 일차적으로 결정되지만, 최근 보고서에는 플라보노이드 또한 뿌리구조에 결정적 영향력을 발휘하는 것이 제시되었다. 이전 보고서에 따르면, 플라보노이드 생합성에 작용하는 특정유전자가 결핍된 일부 돌연변이의 뿌리구조는 야생형과 매우 다르다(Buer and Djordjevic 2009). 예를 들어, *tt4* 및 *tt8* 유묘는 야생형에 비해 적은 측근을 보여 주었다(Buer and Djordjevic 2009).

- [0012] 또한, 플라보노이드와 오옥신 극성 이동 (Murphy et al. 2000; Santelia et al. 2008; Peer and Murphy 2007) 사이에 연관이 있다는 것을 확인해 주는 일련의 증거가 있다. *tt4* 유묘를 사용하여, Murphy et al. (2000)은 *tt4*의 뿌리가 배지에 야생형 보다 더 많은 오옥신을 배출(release)하는 것을 제시하였다 (Murphy et al. 2000).
- [0013] 최근, 플라보노이드가 PIN의 위치 (PIN-FORMED)에서 특정 영향을 미쳐 오옥신 스트림의 리디렉션에 영향을 미친다는 것이 제시되었다 (Santelia et al. 2008).
- [0014] 본 발명의 배경이 되는 기술로, 대한민국 특허공보 10-0458137(2004.11.26)에 감소된 수분 유용성에 대해 증가된 내성을 지닌 형질전환 식물체에 대해 기재되어 있으나, 식물체는 재조합 ABF를 발현하는 것이 가능한 앱시스산 반응성 요소 결합 인자(ABF)를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 것을 특징으로 한다. 또한, 대한민국 특허공보 10-0771435(2007.10.30)에는 차나무 어린잎으로부터 분리한 신규한 플라보놀 생합성 유전자, 이에 의해 코딩되는 단백질 및 이를 포함하는 발현벡터에 관해 기재되어 있다. 그러나, *TTG1*을 이용한 식물 생장 촉진, 가뭄 스트레스 내성 및 플라보놀 합성 증가 형질전환 식물체에 대해 알려진 바는 없다.
- [0015] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0016] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공보 10-0458137(2004.11.26)
(특허문헌 0002) 대한민국 특허공보 10-0771435(2007.10.30)

비특허문헌

- [0017] (비특허문헌 0001) 1. Berli FJ, Moreno D, Piccoli P, Hespanhol-Viana L, Silva MF, Bressan-Smith R, Cavagnaro JB, Bottini R (2010) Abscissic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant Cell Environ* 33:1-10
- (비특허문헌 0002) 2. Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA, Lamb C (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* 12:2383-2394
- (비특허문헌 0003) 3. Buer CS and Diordjevic MA (2009) Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 60:751-763
- (비특허문헌 0004) 4. Ceccarelli S and Grando S (1996) Drought as a challenge for the plant breeder. *Plant Growth Regulation* 20:149-155
- (비특허문헌 0005) 5. Clough SJ and Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16:35-43
- (비특허문헌 0006) 6. De Smet I, Signora L, Beeckman T, Inze D, Foyer CH and Zhang H (2003) An abscissic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 33:543-555
- (비특허문헌 0007) 7. Deak KI and Malamy J (2005) Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal* 43:17-28
- (비특허문헌 0008) 8. Dubos C, Le Gourrierec J, Baudry A, Huep G, Lanet E, Debeaujon I, Routaboul JM, Alboresi A, Weisshaar B and Lepiniec L (2008) MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in

Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 55:940-953

(비특허문헌 0009) 9. Francesca Q, Antoine B, Loic L, and Erich G (2006) The regulation of flavonoid biosynthesis. In: Erich G (ed) The science of flavonoids, Springer, New York, pp 97-122

(비특허문헌 0010) 10. Fukaki H and Tasaka M (2009) Hormone interactions during lateral root formation. Plant Mol Biol 69:437-449

(비특허문헌 0011) 11. Gonzalez A, Zhao M, Leavitt JM and Lloyd AM (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings. The Plant Journal 53:814-827

(비특허문헌 0012) 12. Guruprasad KN and Laloraya MM (1980) Effect of pigment precursors on the inhibition of anthocyanin biosynthesis by BA and ABA. Plant Sci Lett 19:73-79

(비특허문헌 0013) 13. Jefferson RA, Kavanagh TA, and Bevan MV (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6:3901-3907

(비특허문헌 0014) 14. Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M (2004) Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. Plant Science 167:247-252

(비특허문헌 0015) 15. Jiang M and Zhang J (2002) Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. Journal of Experimental Botany 53: 2401-2410

(비특허문헌 0016) 16. Jiang Y and Joyce DC (2003) ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. Plant Growth Regulation 39:171-174

(비특허문헌 0017) 17. Kim H, Park PJ, Hwang HJ, Lee SY, Oh MH and Kim SG (2006) Brassinosteroid Signals Control Expression of the AXR3/IAA17 Gene in the Cross-Talk Point with Auxin in Root Development. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70:768-773

(비특허문헌 0018) 18. Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N and Caboche M (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. Annu Rev Plant Biol. 57:405-430

(비특허문헌 0019) 19. Lewis DR, Ramirez MV, Miller ND, Vallabhaneni P, Ray WK, Helm RF, Winkel BS and Muday GK (2011) Auxin and Ethylene Induce Flavonol Accumulation through Distinct Transcriptional Networks. Plant Physiology 156:144-164

(비특허문헌 0020) 20. Ljung K, Bhalarao RP and Sandberg G (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. The Plant Journal 28:465-474

(비특허문헌 0021) 21. Malamy JE (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. Plant, Cell and Environment 28:67-77

(비특허문헌 0022) 22. Mancinelli AL, Hoff AM and Cottrell M (1988) Anthocyanin Production in Chl-Rich and Chl-Poor Seedlings. Plant Physiol 86:652-54

(비특허문헌 0023) 23. Martens S, Knott J, Seitz CA, Janvari L, Yu SN and Forkmann G (2003) Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues. Biochemical Engineering Journal 14:227-235

(비특허문헌 0024) 24. Murphy A, Peer WA and Taiz L (2000) Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. Planta 211:315-324

(비특허문헌 0025) 25. Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M and Lepiniec L (2001) The Arabidopsis TT2 Gene Encodes an R2R3 MYB Domain Protein That Acts as a Key Determinant for Proanthocyanidin Accumulation in Developing Seed. The Plant Cell 13:2099-2114

(비특허문헌 0026) 26. Oh JE, Kim YH, Kim JH, Kwon Y and Lee H (2011b) Enhanced Level of Anthocyanin

- Leads to Increased Salt Tolerance in Arabidopsis PAP1-D Plants upon Sucrose Treatment. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 54:79-88
- (비특허문헌 0027) 27. Oh JE, Kwon Y, Kim JH, Noh H, Hong SW and Lee H (2011a) A dual role for MYB60 in stomatal regulation and root growth of Arabidopsis thaliana under drought stress. Plant Mol Biol 77:91-103
- (비특허문헌 0028) 28. Olsen O, Wang X and von Wettstein D (1993) Sodium azide mutagenesis: preferential generation of A.T→G.C transitions in the barley Ant18 gene. Proc Natl Acad Sci USA 90:8043-8047
- (비특허문헌 0029) 29. Ozeki Y and Komamine A (1986) Effects of growth regulators on the induction of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultures. Plant Cell Physiol 27:1361-1368
- (비특허문헌 0030) 30. Peer WA and Murphy AS (2007) Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators Trends in Plant Science 12:1360-1385
- (비특허문헌 0031) 31. Peer WA, Blakeslee JJ, Yang H and Murphy AS (2011) Seven Things We Think We Know about Auxin Transport. Molecular Plant 4:487-504
- (비특허문헌 0032) 32. Pilet PE (1975) Absciscic Acid as a Root Growth Inhibitor: Physiological Analyses. Planta (Berl.) 122:299-302
- (비특허문헌 0033) 33. Pollastri S and Tattini M (2011) Flavonols: old compounds for old roles. Annals of Botany 108:1225-1233
- (비특허문헌 0034) 34. Sadras VO and Milroy SP (1996) Soil- water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchange: A review. Field Crops Res. 47: 253-266
- (비특허문헌 0035) 35. Santelia D, Henrichs S, Vincenzetti V, Sauer M, Bigler L, Klein M, Bailly A, Lee Y, Friml J, Geisler M and Martinoia E (2008) Flavonoids Redirect PIN-mediated Polar Auxin Fluxes during Root Gravitropic Responses. The Journal Of Biological Chemistry 283:31218-31226
- (비특허문헌 0036) 36. Sheahan JJ and Rechnitz GA (1993) Differential visualization of transparent testa mutants in Arabidopsis thaliana. Anal Chem 65:961-963
- (비특허문헌 0037) 37. Shirley BW, Kubasek WL, Storz G, Bruggemann E, Koornneef M, Ausubel FM and Goodman HM (1995) Analysis of Arabidopsis mutants deficient in flavonoid biosynthesis. Plant J 8:659-671
- (비특허문헌 0038) 38. Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simoncic M and Knez Z (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chemistry 89:191-198
- (비특허문헌 0039) 39. Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A and Perata P (2006) Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis. Plant Physiology 140:637-646
- (비특허문헌 0040) 40. Tian Q and Reed JW (1999) Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene. Development 126:711-721
- (비특허문헌 0041) 41. van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE and Baskin TI (2000) Growth of Arabidopsis thaliana seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. Journal of Experimental Botany 51:1555-1562
- (비특허문헌 0042) 42. Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD and Gray JC (1999) The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 Locus, Which Regulates Trichome Differentiation and Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis, Encodes a WD40 Repeat Protein. The Plant Cell 11:1337-1349
- (비특허문헌 0043) 43. Xiong L, Wang RG, Mao G and Koczan JM (2006) Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. Plant

Physiol. 142:1065-1074

(비특허문헌 0044) 44. Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne CT and Lloyd A (2003) A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. Development 130:4859-4869

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 본 발명의 목적은 *TTG1* 유전자가 과발현되어 식물의 생장이 촉진되고, 가뭄 스트레스에 내성을 가지며 플라보놀 합성이 증가된 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 다른 목적은, *TTG1* 유전자를 이용하여 가뭄 스트레스에 대한 내성을 증가시키거나 플라보놀 합성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0021] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 *TTG1* 유전자가 도입되어 과발현되어, 식물의 생장이 촉진되고 비생물적 스트레스에 대해 내성을 갖는 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *TTG1* 유전자가 도입되어 과발현되어, 플라보놀 생산이 증가된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *TTG1* 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시켜 식물체의 플라보노이드 생합성 경로를 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 뿌리 성장을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *TTG1* 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시켜 식물체의 플라보노이드 생합성 경로를 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *TTG1* 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시켜 식물체의 플라보노이드 생합성 경로를 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 플라보놀 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0026] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.
- [0027] 본 발명자들은 ABA-유도 측근 억제에서 플라보노이드의 역할을 밝혀내는 것을 목적으로 연구를 진행하였다. 이를 위해, 본 발명자들은 플라보노이드 생합성이 저해된 *tgg1* 돌연변이(Walker et al. 1999)와 *TTG1* 과발현 식물(*TTG1* ectopic-expression plant)에 대해 연구를 하였다. 본 발명자들은 플라보노이드 축적 수준의 변경이 ABA에 반응하여 측근 성장을 변경할 수도 있다고 추론하였다. 본 발명에서, 본 발명자들은 ABA에 반응하여 *tgg1* 돌연변이 유묘의 측근 생장이 감소하는 반면, *TTG1* 과발현 식물은 측근 생장이 향상되는 것을 확인하였다. 이런 결과는 플라보노이드 생합성 경로가 물부족 조건하에서 식물 뿌리 생장이 향상되도록 효과적으로 조절될 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0028] 따라서, 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 *TTG1* 유전자가 도입되어 과발현되어, 식물의 생장이 촉진되고 비생물적 스트레스에 대해 내성을 갖는 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0029] 상술한 바와 같이, *TTG1* 유전자의 과발현체는 주뿌리의 생장이 증가하고 측근의 수가 증가되며, 가뭄 등 스트레스에 조건이 부여되어도 뿌리 생장이 저해되지 않는다. 본 발명에 있어서, *TTG1* 유전자는 특별한 제한이 없으나, 본 발명의 실시예에서는 애기장대에서 유래된 *TTG1* 유전자 (*At5g24520*)를 이용하였다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 식물세포로 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) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 재조합 벡터를 이용하여 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.

- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 상기 재조합 벡터는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 *pMDC32* 벡터의 CaMV35S 프로모터와 NOS 터미네이터 사이에 위치할 수 있으며, CaMV35S::TTG1 구조체 형태로 아그로박테리움에 도입될 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 식물체는 특별히 제한이 있는 것은 아니라, 뿌리를 포함한 식물체의 생장 촉진이 필요하고 비생물적 스트레스에 대한 내성이 필요한 어떤 식물에도 도입될 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, 고부가가치 작물이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 유채이다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 비생물적 스트레스는 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게 ABA에 의한 스트레스 또는 가뭄 스트레스이다.
- [0034] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *TTG1* 유전자가 도입되어 과발현되어, 플라보놀 생산이 증가된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0035] *TTG1* 유전자는 종래에 안토시아닌 합성에 기여한다고 알려져 있으나, 본 발명자들에 의해 최초로 단독으로 식물체에서 과발현시킬 경우, 플라보놀의 양이 증가하여 플라보놀 합성에 기여한다는 것이 밝혀졌다. 본 발명에 있어서, 상기 플라보놀은 이에 한정되는 것은 아니나, 캠페롤 또는 케르세틴이다. 플라보놀은 항산화 효과가 널리 알려져 있고, 심장질환으로 인한 사망률을 낮춘다는 보고 등이 있어, 이러한 플라보놀은 건강식품 및 의약품에 이용되고 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, 본 발명에 의한 *TTG1* 유전자가 도입되어 과발현된 형질전환 유채 식물의 경우 항산화능이 향상된 유채유를 제공할 수 있는 이점이 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *TTG1* 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시켜 식물체의 플라보노이드 생합성 경로를 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 뿌리 생장을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0037] 식물체의 옥옥신은 세포 신장 및 세포분열을 조절하여, 뿌리 생장 등에 직접적으로 관여하는데, 옥옥신의 이동이 저해되면 뿌리 생장이 저해된다. 본 발명에 의한 *TTG1* 유전자는 식물체의 플라보노이드 생합성 경로를 변경하여 안토시아닌의 합성을 감소시키고 플라보놀의 합성을 증가시켜 식물체에서 옥옥신 극성 이동 경로를 변경하여 어린싹 및 뿌리의 형성의 변경을 유도한다. 특히 주근의 길이 생장을 촉진하고, 측근의 개수를 증가시킬 수 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *TTG1* 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시켜 식물체의 플라보노이드 생합성 경로를 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명에 의한 *TTG1* 유전자 과발현시 식물체의 플라보노이드 신호전달 경로를 변경하여 안토시아닌의 생성이 억제되고 ABA에 의한 스트레스에 민감도를 낮추어 비생물적 스트레스에 대한 내성을 증가시킬 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *TTG1* 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시켜 식물체의 플라보노이드 생합성 경로를 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 플라보놀 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명에 의한 *TTG1* 유전자 과발현시 식물체의 플라보노이드 신호전달 경로를 변경하여 안토시아닌의 생성이 억제되고 식물체의 플라보놀 생합성 유전자 발현을 유도하여 식물체의 플라보놀 생산이 증가하게 된다.
- [0042] 본 발명자들은 ABA는 식물이 가뭄 스트레스 겪고 있을 때 측근의 생장을 억제할 목적으로 옥옥신 극성 이동의

방향을 변경하기 위해 플라보노이드의 생합성을 조절할 수 있다는 가정을 하였다.

- [0043] TTG1는 플라보노이드 생합성에 관여하는 중요한 전사 인자이다. 또한, 뿌리털 및 트리콤 (trichome) 형성을 포함하여 식물 형태 형성 동안 여러 과정에서 작용한다 (Gonzalez et al. 2008; Walker et al. 1999; Zhang et al. 2003). 따라서, 본 발명자들은 측근 성장과 관련하여 ABA에의 반응을 시험하기 위해서 *ttg1* 돌연변이를 이용하였다 (도 1a 및 도 1b). 0 % 수크로오스 배지에서, 측근 성장에 대한 ABA의 억제에 관찰되지 않는 반면에, ABA와 함께 높은 농도의 수크로오스가 함유된 배지에서는 *ttg1* 돌연변이는 야생종과는 상당히 차이가 있었다.
- [0044] 또한, 측근의 수는 ABA (1 μ M)의 존재에도 불구하고, 수크로오스의 수준 (2 % ~ 4 %) 증가로 증가했다. Deak and Malamy (2005)에 따르면, 배지에 4.5 % 보다 높은 수크로오스가 높은 삼투 스트레스로 인해 식물의 성장에 이상 영향을 발생시킬 수 있다.
- [0045] *ttg1* 돌연변이에서 측근의 수의 현저한 감소는, 이 돌연변이가 ABA에 매우 민감한 것을 보여준다. 그것은 수크로오스 처리로 인해 플라보노이드의 생합성이 증가되면, 야생형과 *ttg1* 식물 모두에서 ABA에 대한 민감도가 감소될 수 있다는 것을 나타낸다 (도 1a 및 도 1b).
- [0046] 이 추론은 또한 우리가 *CHS* 프로모터의 제어 하에서 *GUS* 리포터 유전자를 포함하는 형질전환식물을 이용하여 얻은 *CHS* 유전자의 조절에 관한 본 발명자들의 관찰에 의해서도 확인되었다 (도 2a ~ 도 2c).
- [0047] *CHS* 유전자는 수크로오스에 매우 민감해서, 플라보노이드 생합성 증가를 유도한다 (Solfanelli et al. 2006). 그러나, *GUS* 활성은 4 %의 수크로오스가 첨가된 배지의 ABA 존재에 의해 심각하게 억제되었다 (도 2a ~ 도 2c). 주목할 만한 것은, 4%의 이상의 수크로오스가 함유된 배지에서 유묘가 배양된 경우 *GUS* 활성에 대한 ABA의 억제 효과는 분명하지 않았다. 이런 결과는 수크로오스는 플라보노이드 생합성을 향상시킬 수 있다는 이전 연구의 결과에 부합되게 내생 플라보놀 축적 변경을 유도하여 뿌리 구조에 결과적으로 영향을 미친다는 것이다 (Solfanelli et al. 2006; Peer et al. 2011).
- [0048] *ttg1* 돌연변이는 야생형보다 ABA에 더 민감하다. 따라서, 본 발명자들은 형질전환 *TTG1-OX* 유묘를 이용하여 이를 확인하게 되었다. 처음에는 *TTG1-OX* 유묘에서 안토시아닌의 생합성이 증가될 것으로 기대하였으나, 그렇지 않은 것으로 나타났다 (도 3a ~ 도 3c). 더욱 놀라운 것은, 안토시아닌 수준은 형질전환 유묘에서 감소했다 (도 3c). 이러한 현상은 이미 다른 그룹의 연구자들에 의해 입증되었다 (reviewed in Francesca et al. 2006). 본 발명자들은 *ttg1* 돌연변이의 뿌리에 야생형보다 플라보놀 그룹에 속한 케르세틴이 더 많이 축적된 것을 확인하였다 (Charles et al. 2009). 대조적으로, 캠페롤과 케르세틴의 수준은 *tt4*와 *tt7* 돌연변이 유묘에서 감소되었다 (Lewis et al. 2011). 사실, *TTG1-OX*은 안토시아닌 보다 캠페롤과 케르세틴을 더 축적했다 (도 3c 및 도 5).
- [0049] 따라서, 본 발명자들은 *TTG1-OX*에서 측근 수의 증가는 플라보놀 축적 수준의 변경의 결과라고 가정하였다 (도 4a ~ 도 5). 식물들이 수분 스트레스와 같은 비생물적 스트레스에 노출될 때 ABA는 높은 수준으로 생산된다 (Jiang and Zhang 2002).
- [0050] *TTG1-OX*에서 측근의 수의 증가는 비생물적 스트레스 신호 경로에서 도출된 결과가 아니다. 왜냐하면, *Cor15A*와 *KINI*와 같은 스트레스-반응 마커 유전자의 전사 수준이 정상 조건하에서 *TTG1-OX*에서 변경되지 않았기 때문이다 (도 6c).
- [0051] Dihydroflavonol 4-reductase (DFR, EC 1.1.1.219)는 안토시아닌의 생합성에 관련된 속도-제한 효소 (rate-limiting enzyme)이다 (Martens et al. 2003). DFR 유전자는 보리와 애기장대에서 비활성화되었을 때, 안토시아닌 및 카테킨 (catechins)의 감소가 관찰되었고, 이것은 이 유전자가 안토시아닌 생산에 매우 중요하다는 것을 나타낸다 (Olsen et al. 1993; Shirley et al. 1995). 야생형 유묘에 비해 *TTG1-OX* 유묘의 DFR의 전사 수준의 감소는, 형질전환 유묘에 안토시아닌이 덜 축적된 이유를 설명해 준다 (도 3c 및 도 4a). 유사한 결과는 *TT2* 과발현 (*TT2-OX*) 유묘가 생성되어 *DFR*의 전사 수준이 감소하였다는 다른 연구에서도 확인되었다 (Nesi et al. 2001).
- [0052] 현재 *DFR* 유전자 전사 축적이 야생형에 비해 *TTG1-OX* 또는 *TT2-OX*의 유묘에서 낮은 이유에 대해 명확하게 알려진 바 없다. 본 발명자들은 *TTG1-OX* 또는 *TT2-OX*의 유묘의 TTG1 또는 TT2 단백질의 향상된 수준이 TTG1, TT2 및 TT8을 포함하는 전사 복합체의 구조와 간섭하는 것으로 추측하였다. 단지 이 두 가지 요소로 구성되어 불완전한 복합체가 구성될 수 있다고 볼 수 있다. *TTG1-OX* 식물에서 DFR 전사 수준의 감소에 대조적으로, 이들 형질전환 식물체에서 *FLSI* 전사 수준은 상당히 향상되어, 야생형 유묘와 비교하여 플라보놀 (캠페롤 및 케르세틴)의

수준이 향상된 것을 명확하게 설명해 준다 (도 4a ~ 도 5).

[0053] 발아후 완숙전 단계 (post-emergence step)에 ABA가 LR 성장을 저해하는 것을 보여준 이전 보고서에 따라, 본 발명자들은 ABA에 반응하여 야생형 유묘의 오옥신 민감도를 측정하였다. 본 발명자들은 *IAA3* 및 *IAA17* 과 같은 오옥신 반응 유전자의 전사 수준이, 야생형에 비해 *TTG1-OX*에서 상당히 감소하였다는 것을 발견하였다 (도 7). 다른 한편으로, 본 발명자들은 오옥신 마커 구조체 (*DR5::GUS*)를 함유하며 ABA 및 수크로오스로 처리된 형질전환 유묘도 이용하였다 (도 8). 이들 결과에 따르면, ABA와 수크로오스는 식물 세포의 오옥신 민감도와 관련하여 길항적 관계를 가진다는 것을 알 수 있다 (도 8). 플라보놀 생합성의 변경을 통하여 *TTG1-OX* 유묘에서 발생하는 오옥신 이동 시스템을 간접하여 국부 오옥신 축적을 변경할 수 있어, ABA의 존재하에서 측근 성장의 증가를 유도할 수 있다. 본 발명의 결과는 저농도의 ABA는 안토시아닌 축적을 향상시켜서, 뿌리 시스템에서의 적절한 오옥신 분배를 변경하는 플라보놀 축적을 감소시키는 것을 나타낸다 (도 2c).

[0054] 수분 부족은 흔하게 발생하는 비생물적 스트레스로써, 식물의 성장 및 발달에 결정적인 영향을 미치고 농작물 생산성을 제한한다 (Sadras and Milroy 1996; Ceccarelli and Grando 1996). 종합적으로, 본 발명에 의하면 플라보노이드 생합성 경로에 관련된 전사 인자를 유전공학적으로 조절하여, 포장에서 수분-스트레스 조건하에서 식물 뿌리 성장을 향상시킬 수 있어 생명공학적으로 농작물 생산을 증가시킬 수 있다.

발명의 효과

[0055] 본 발명에서는 플라보노이드가 측근 성장에 대한 ABA의 효과를 억제할 수 있는지 밝혀내었다. 오옥신 이동이 플라보노이드 생합성의 변경에 의해 변동될 수 있어, ABA 처리에 대한 뿌리 구조의 변경을 초래하는지 확인되었다. 또한 형질전환 *TTG1*-과발현 (*TTG1-OX*) 유묘는 정상 또는 스트레스 조건하에서 성장한 야생형 유묘에 비해 뿌리의 길이 및 측근의 수가 향상되는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명에 의하면 플라보노이드 생합성 경로의 유전적 조작에 의해 ABA 및 비생물적 스트레스의 저해를 극복할 수 있는 식물 뿌리 시스템의 향상을 성공적으로 할 수 있게 된다. 따라서, 본 발명은 스트레스 내성 작물의 개발 및 향상화능을 가진 플라보놀의 생산을 촉진할 수 있는 효과를 도모할 수 있어, 분자육종학적으로 중요한 발명이라고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1a 및 도 1b는 ABA 및 수크로오스에 반응한 *ttg1* 및 야생형 (Col-0) 유묘의 성장을 나타내는 도면이다.

도 1a는 종자는 발아되어 normal 1/2 x MS 배지에서 성장되어, 4일 된 유묘는 도면에 표시된 대로 ABA 및 수크로오스가 보충된 1/2 x MS 배지로 옮겨졌다. 도면은 옮겨진 후 7일째에 찍은 사진을 나타낸다. 도 1b는 도 1a의 *ttg1* 및 Col-0 유묘의 측근(LRs)의 수를 그래프로 나타내었다. 데이터는 23°C에서 실시된 3 반복 실험 결과를 나타낸다 (n=20 per experiment).

도 2a ~ 도 2c는 *CYC1pro::GUS*, *CHSpro::GUS* 발현 및 안토시아닌 축적에 대한 수크로오스 및 ABA의 효과를 나타낸다.

도 2a는 *CYC1pro::GUS* 또는 *CHSpro::GUS*을 포함하는 애기장대 T₃ 동형접합적 형질전환 종자는 발아되어 10일 동안 1/2 x MS 배지에서 성장된 후, 도면에 표시된 대로 ABA 및 수크로오스로 보충된 1/2 x MS 배지로 옮겨졌다. 유묘는 6시간 동안 배양된 후, GUS 염색으로 가시화되었다. 보여진 유묘는 23°C에서 실시된 3 반복 실험 결과의 전형을 보여준다 (n=10 per experiment). 도 2b는 MS1/2 배지에서 7일 동안 성장된 야생형 (Col-0) 유묘는 24시간 동안, 표시된 수크로오스 (4 and 8 %) 및 ABA (1 and 10 μ M) 농도로 처리되고, 안토시아닌 수준이 측정되었다. 도 2c는 MS1/2 배지에서 7일 동안 성장된 야생형 (Col-0) 및 *aba3* 유묘는 표시된 수크로오스 (8 %) 및 ABA (10 μ M) 농도로 처리되고, 안토시아닌 수준이 측정되었다

도 3a ~ 도 3c는 *TTG1-OX* 유묘에서 감소된 안토시아닌 수준을 나타내는 도면이다.

전장(full-length) *TTG1* cDNA가 *CaMV 35S* 프로모터 제어하에 클론되어, *TTG1-OX* 종자가 생성되었다. 도 3a는 *TTG1*의 과발현은 RT-PCR을 이용하여 확인되었다. 액틴은 로딩 내적 대조군으로서 나타나 있다. 10일 된 유묘는 normal 1/2 x MS 배지에서 성장된 후, RT-PCR를 위해 전체 RNA가 추출되었다. 도 3b는 야생형, *ttg1* 및 *TTG1-OX* 종자 또는 유묘의 표현형을 나타낸다. 종자 껍질 색 (300 mg seeds of each) 및 안토시아닌 축적이 나타나 있

다 (n=50 per each experiment). 안토시아닌을 가시화하기 위해, 돌연변이 종자는 3일 동안 50 μ M의 노르플루라존 (norflurazon; 클로로필 형성 억제제)을 함유하는 MS1/2 배지에서 성장되었다. 그런 다음 유묘는 관찰되었고, Leica EZ4D microscope을 이용하여 사진이 촬영되었다. 자주색은 안토시아닌 축적을 나타낸다. 도 3c는 normal 1/2 x MS 배지에서 성장된 10일 된 유묘는 갈려서, 안토시아닌이 수용액으로 추출되어 측정되었다. 보여진 종자 또는 유묘는 23°C에서 실시된 3 반복 실험 결과의 전형을 보여준다 (n=10 per experiment). One-way ANOVA Tukey's test ($p < 0.05$)가 실시된 결과, 안토시아닌 축적에 있어 야생형과 돌연변이 사이에 유의적인 차이가 나타났다. 유의적인 차이를 반영하기 위해, Lower-case letters (a, b, c)가 컬럼 위에 표시되었다. 수직 막대는 표준 오차를 나타낸다 (n = 3).

도 4a 및 도 4b는 야생형 및 *TTG1-OX* 유묘에서의 *DFR* 및 *FLS1* 유전자 전사수준을 나타내는 도면이다.

도 4a는 normal MS1/2 배지에서 성장된 야생형 및 *TTG1-OX* #4 및 #5 유묘의 플라보노이드 생합성 유전자 *DFR* 및 *FLS1*의 전사수준이 측정되었다. *RT-PCR*이 수행 실시되었고, 다른 횟수의 사이클을 이용한 2개의 실험의 *PCR* 결과가 나타나 있다. *UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 21 (UBC21)* 가 로딩 내적 대조군으로 사용되었다. 10일 된 유묘는 normal 1/2 x MS 배지에서 성장된 후, *RT-PCR*을 위해 전체 RNA가 추출되었다. 도 4b는 플라보노이드 생합성 경로의 개략적 모델. 먼저, CHS (chalcone synthase)는 4-coumaroyl-CoA 1 분자와 malonyl-CoA 3 분자의 축합(condensation)을 촉진한다. 이 경로의 마지막 단계는 일련의 효소들에 의해 촉매되어, 2 종류의 최종 산물이 생산된다: 안토시아닌 및 플라보놀, 즉, 오옥신 이동 저해제. (CHI, chalcone isomerase; F3H, flavonol 3-hydroxylase; F3'H, flavonol 3'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; DFR, dihydroflavonol-4-reductase; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase).

도 5는 야생형 및 *TTG1-OX* 유묘에서의 플라보놀인 캠페롤 (Kaempferol) 및 케르세틴 (quercetin)의 축적을 나타내는 도면이다.

캠페롤 (Kaempferol) 및 케르세틴 (quercetin)의 축적을 가시화하기 위해, normal MS1/2 배지에서 성장된 7일 된 야생형 (Col-0 and Ler), *TTG1-OX*, *PAP1-D*, *ttg1*, *tt2* 및 *aba3* 유묘가 DPBA 염색되었다 (Bar: 100 μ m). 보여진 뿌리는 23°C에서 실시된 3 반복 실험 결과의 전형을 보여준다 (n=10 seedlings per experiment).

도 6a ~ 도 6c는 10 μ M ABA 또는 300 mM 마니톨이 보충된 normal 1/2 x MS 배지에서 성장된 야생형, *TTG1-OX*, *PAP1-D* 및 *ttg1* 유묘의 성장 표현형 (growth phenotype)을 나타내는 도면이다.

도 6a는 실험 배지로 옮겨진 4일 된 유묘는 10일 동안 성장된 후 사진을 찍었다. 보여진 유묘는 23°C에서 실시된 3 반복 실험 결과의 전형을 보여준다 (n=15 seedlings per experiment). 도 6b는 현미경하에서 이들 유묘의 측근의 수가 측정되었다. 보여진 데이터는 23°C에서 실시된 3 반복 실험 결과를 보여준다 (n=10 per experiment). One-way ANOVA Tukey's test ($p < 0.05$)가 실시된 결과, 처리당 측근의 수에 있어 야생형과 돌연변이 사이에 유의적인 차이가 나타났다. 유의적인 차이를 반영하기 위해, Lower-case letters (a, b, c)가 컬럼 위에 표시되었다. 수직 막대는 표준 오차를 나타낸다 (n = 30). 도 6c는 normal MS1/2 배지에서 성장된 야생형 및 *TTG1-OX* #4 및 #5 유묘의 스트레스 마커 유전자 *Cor15A* 및 *KIN1*의 전사수준이 측정되었다. *RT-PCR*이 수행 실시되었고, 다른 횟수의 사이클을 이용한 2개의 실험의 *PCR* 결과가 나타나 있다. *UBC21*가 로딩 내적 대조군으로 사용되었다. 10일 된 유묘는 normal 1/2 x MS 배지에서 성장된 후, *RT-PCR*을 위해 전체 RNA가 추출되었다.

도 7은 야생형 및 *TTG1-OX* 유묘의 *IAA3* 및 *IAA17* 유전자의 전사 수준을 나타내는 도면이다.

*RT-PCR*이 수행 실시되었고, 다른 횟수의 사이클을 이용한 2개의 실험의 *PCR* 결과가 나타나 있다. *UBC21*가 로딩 내적 대조군으로 사용되었다. 10일 된 유묘는 normal 1/2 x MS 배지에서 성장된 후, *RT-PCR*을 위해 전체 RNA가 추출되었다.

도 8은 *DR5::GUS* 형질전환 유묘의 GUS 발현에 대한 수크로오스 및 ABA의 영향을 나타내는 도면이다. normal MS1/2 배지에서 성장된 5일 된 *DR5::GUS* 형질전환 유묘는, 표시된 대로 ABA 및 수크로오스가 보충된 MS1/2 배지로 옮겨지고, 6시간 동안 배양된 후 GUS 염색되었다. 보여진 유묘는 23°C에서 실시된 3 반복 실험 결과의 전형을 보여준다 (n=10 per experiment).

도 9는 normal MS1/2 배지상의 야생형 (Col-0), *TTG1-OX*, *ttg1* 및 *TTG1-OX/ttg1* 유묘의 성장 표현형에 의한 보충 분석 결과를 나타낸다. 보충 분석을 위해, *35S::TTG1* 플라스미드가 *ttg1* 식물로 도입되었다. 유묘는 2주 동안 normal 1/2 x MS 배지에서 성장된 후, 사진이 촬영되었다. 보여진 유묘는 23°C에서 실시된 3 반복 실험 결과의 전형적인 유묘를 보여준다 (n=15 seedlings per experiment).

도 10은 본 발명에 의한 *TTG1*이 도입된 *pMDC32* 벡터의 개열지도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0058] **재료 및 방법**
- [0059] **식물 재료 및 성장 조건**
- [0060] 야생형 애기장대 (ecotype Colombia and Landsberg), TRANSPARENT TESTA GLABRA 1의 열성 돌연변이 (*ttg1*), *CHSpro::GUS* (Oh et al. 2011b) 및 *DR5::GUS* lines (Oh et al. 2011a), *PAP1-D* (CS3884), *aba3* (CS157), *tt2* (CS83)가 이 실험에 사용되었다. 종자는 소독되고 4℃에서 3일간 저장된 후, 2 % (w/v) 수크로오스 (산도 5.7) 가 함유된 half-strength Murashige와 Skoog (1/2 x MS) 배지에 파종 되었다.
- [0061] 식물 샘플은 다음 조건의 배양실에서 배양되었다: 온도 : 23±1℃; 광도: 50-55 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 명암주기 (light/dark cycle): 16 h/ 8 h; 상대습도: 70%. 4일 된 유묘는 지정된 보충물이 함유된 MS1/2 배지로 옮겨졌다.
- [0062] **형질전환 식물의 구축 및 재생**
- [0063] *TTG1* (*At5g24520*)의 전장 cDNA (full length cDNA)를 발현하는 형질전환 애기장대가 생성되었다. 구체적으로, 전장의 *TTG1* cDNA는 PCR에 의해 증폭되었고 꽃양배추 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터를 포함하는 *pMDC32* 벡터로 클론되었다 (도 10 참조). 이때, PCR 반응 조건은 95도에서 5분 95도에서 40 초, 57도에서 1분, 72도에서 1분 반응을 각각 30 cycle, 40 cycle을 한 후 72도에서 7분을 두었다.
- [0064] *TTG1*를 과발현하는 형질전환 식물을 얻기 위해서, 야생형의 식물은 플로랄 딥 방법 (floral dip method, Clough and Bent 1998)를 이용하여 *CaMV35S::TTG1* 구조체를 포함하는 *Agrobacterium tumefaciens* strain *GV3101*로 형질전환되었다. 동형접합체 T_4 형질전환 종자가 모든 실험에 사용되었다.
- [0065] **RT-PCR**
- [0066] RNA 추출 및 cDNA 준비를 위해, 10일 된 야생형 유묘와 *TTG1-OX* (lines #4 and #5)이 이용되었다. RNA 추출은 제조업체의 지침에 따라 Trizol 시약 (Invitrogen, USA)를 사용하여 수행되었다. 상술한 cDNA를 이용한 PCR 반응은 특정 프라이머 세트 (표 1)로 수행되었고 다른 횟수의 사이클을 반복하여(30, 40 사이클) 수행되었다.

표 1

Gene's name	MIPS code	Sequence (5' – 3')
<i>ACTIN1</i>	<i>AT2G37620</i>	F GTGCTCGACTCTGGAGATGGTGTG R CCGCGAATCCAGGGAACATTGTGG
<i>COR15A</i>	<i>AT2G42540</i>	F ATGGCTTCTTCTTCCACAG R CTACTTGTGGCATCCTTAG
<i>DFR</i>	<i>AT5G42800</i>	F TTACTTCATCTGCCGGAACC R TGAGCGTTGCAIAAGTCGTC
<i>FLS1</i>	<i>AT5G08640</i>	F GAATGGGGGCTATTCCAAGT R TCAACGCATCACGCTTTAAC
<i>IAA17</i>	<i>AT1G04250</i>	F ATGATGGGCAGTGTGCGAGCT R TCAAGCTCTGCTCTTGCACT
<i>IAA3</i>	<i>AT1G04240</i>	F ATGGATGAGTTTGTTAACCTC R TCATACACCACAGCCTAAAC
<i>KIN1</i>	<i>AT5G15960</i>	F ATGTCAGAGACCAACAAGAATG R CTACTTGTTTCAGGCCGGTCT
<i>TTG1</i>	<i>AT5G24520</i>	F ATGGATAATTCAGTCCA R AACTCTAAGGAGCTGCAT
<i>UBC21</i>	<i>AT5G25760</i>	F TTACGAAGGCGGTGTTTTTC R TGAACCCTCTCACATACCA

[0067]

[0068]

안토시아닌 측정

[0069]

안토시아닌의 시각화를 위해, 돌연변이 종자는 50 μ M의 norflurazon (chlorophyll inhibitor)가 함유된 MS1/2 배지에서 3일 동안 성장되었다. 그런 다음 유묘는 관찰되었고 Leica EZ4D 현미경으로 촬영되었다.

[0070]

안토시아닌 수준을 정량화(quantify)하기 위해서, MS1/2 배지에서 성장된 7일 된 야생형, *TTG1-OX* (lines # 4 and # 5), *ttg1* 그리고 *PAP1-D* 유묘가 안토시아닌 추출을 위해 사용되었다. 조직 샘플의 약 50 mg이 액체 질소로 균질화 하였고. 일부 수정하여 Mancinelli et al. (1998)에서 설명된 대로, 안토시아닌 수준이 측정되었다. 구체적으로, 안토시아닌은 4°C에서 1%의 250 μ l (v/v) HCl이 들어있는 메탄올 용액에서 밤새 추출되었다. 엽록소에서 안토시아닌을 분리하기 위해, 총 250 μ l의 증류수 및 250 μ l 클로로포름이 샘플들에 추가되었다. 다음, 엽록소를 제거하기 위해, 샘플은 3,000 $\times$ g에서 2 분 동안 회전(vortexed)되고 원심분리되었다. 액체상(aqueous phase)의 광학 밀도가 A_{535} 과 A_{650} 에서 측정되었다. 안토시아닌 수준은 간단한 공식 $(A_{535}-A_{650})/\text{fresh weight}$ 를 이용하여 계산되었다.

[0071]

유묘의 플라보노이드 염색

[0072]

일부 수정하여 Sheahan 및 Rehnitz 1993; Murphy et al. 2000; Lewis et al. 2011에서 설명된 대로, 각 돌연변이와 야생형의 6일 된 유묘는 성장되어 염색되었다. 구체적으로, 유묘는 0.02 % (v/v) Triton X-100을 포함하는 포화된 DPBA (0.25 %, w / V) 를 이용하여 7분 동안 염색된 다음, 증류수에 5분 동안 세척되었다.

[0073]

샘플은 GFP를 위한 Ar-laser (458/488/514 nm) 와 YFP를 위한 543 nm HeNe-laser를 가지고 있는 Confocal Laser Scanning Microscope (LSM 5 Exciter, Carl-Zeiss)를 이용하여 시각화되었다.

[0074]

조직화학적 GUS 분석

[0075]

GUS 분석은 1 mM X-gluc, 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide 및 0.1% Triton X-100을 함유하는 GUS 용액을 이용하여 실행되

었다. 유묘들은 37℃에서 6시간 동안 이 용액에서 배양되었고 70% 에탄올에서 탈색된 후, Leica EZ4D microscope로 관찰되었다 (Jefferson et al. 1987).

[0076] 통계분석

[0077] 각 실험은 적어도 각 회당 10 샘플을 사용하여 3회 반복하였다. 통계분석은 95% 신뢰 수준에서 One-way ANOVA Tukey's test에 의해 이루어졌다.

[0078] 실시예 1. ABA 처리에 따른 *tgt1* 유묘의 뿌리 생장 저해

[0079] 플라보노이드의 변형이 ABA 처리에 따른 유묘의 뿌리 생장에 영향을 미치는지를 알아보기 위해, 4일 된 *tgt1* 열성 돌연변이 및 야생형 유묘는 도 1a 및 도 1b에 표시된 농도의 ABA 및 수크로오스가 보충된 1/2 x MS 배지로 옮겨졌다. 배지에 첨가된 기본 수크로오스 수준 (2% w/v)에서, 배지의 ABA 농도가 증가할 때 야생형의 측근 (LR) 수가 감소하였다 (도 1b). 또한, 낮은 농도의 ABA (0.1 μM)는 야생형 및 *tgt1* 돌연변이 모두에서 측근 생장을 촉진하는 것으로 나타났다. 이들 ABA 조건하에서, 야생형 유묘에 비해 *tgt1* 유묘는 ABA에 대해 더 민감한 것으로 나타나, 가장 높은 처리 조건하에서 측근의 수가 감소하고, 주근이 짧아졌다 (도 1a 및 도 1b). ABA 처리에 대한 *tgt1* 돌연변이의 표현형은 *TTG1* 유전자의 과발현에 의해 상쇄되었다. 이 결과로부터, 플라보노이드 생합성의 감소는 ABA에 반응한 뿌리 발달에 부정적으로 작용한다는 것을 알 수 있다.

[0080] 실시예 2. 플라보놀 생합성의 증가로 인한 ABA 처리에 대한 측근 수의 증가

[0081] 수크로오스가 플라보노이드 생합성 경로에서 유전자 발현을 변경하여 식물의 안토시아닌 축적을 촉진하는 인자이다 (Solfanelli et al. 2006). 본 발명에서, 내부 플라보노이드 수준을 향상시키기 위해, 배지의 수크로오스 함량을 변경하였다 (0%에서 8%까지). 이런 수크로오스 함량의 변경으로 ABA에 노출된 뿌리 시스템 발달이 변경될 것을 기대하였다 (도 1a 및 도 1b). 실제로, ABA가 부족한 배지에서 수크로오스 함량이 2%에서 8%로 증가하면 야생형 및 *tgt1* 유묘 모두 그 측근의 수가 명백하게 증가하는 것이 관찰되었다 (도 1b). 또한, 배지의 수크로오스 함량이 증가하면, ABA로 매개된 뿌리 시스템 발달 저해를 극복하는 데 도움이 된다고 할 수 있다. 실제로, ABA의 존재하에서 (1 및 10 μM), 수크로오스의 농도가 높을수록 (2%에서 4%) 측근의 수도 증가하였다 (~8에서 ~10 및 ~4에서 ~6) (도 1b). 그러나, ABA 존재하에 (1 및 10 μM), 수크로오스의 농도가 아주 높으면 (8%) 야생형 및 *tgt1* 유묘 모두의 측근의 수가 감소하였다 (도 1b).

[0082] 상기 결과를 확인하기 위해, 발명자들은 *CHSpro::GUS* 형질전환 유묘를 키워 *CHS* 발현 실험을 하여, ABA 및/또는 수크로오스에 대한 안토시아닌 수준을 측정하였다 (도 2a ~ 도 2c). 이들 결과로부터, 외부에서 추가된 수크로오스의 증가는 특히 배지의 수크로오스 함량이 2%에서 4%로 변화할 때, *CHS*의 발현과 정의 상관관계가 있다는 것을 알 수 있었다. 또한, 안토시아닌 함량은 ABA 농도뿐만 아니라 사용된 수크로오스가 증가하는 한 향상될 수 있다 (도 2b). 종합적으로, 플라보노이드 생합성은 ABA 처리에도 측근 수를 향상할 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0083] 실시예 3. *TTG1-OX* 유묘에서의 플라보놀 축적의 증가

[0084] *CAMV35S* 프로모터 제어하에 *TTG1*의 전장 cDNA가 구축되어 야생형 애기장대를 형질전환되었다. 3세대 선발 후, T₄ 세대에서 2개의 독립적인 계통 (#4 and #5)이 분리되었다. 유전자형 확인으로 이들 계통이 동형접합적이고 (homozygous) 과발현 돌연변이라는 것이 확인되었다 (도 3a). 이들 계통의 T₄ 종자가 이후 실험에서 사용되었다.

[0085] 야생형에 비해 *tgt1*가 안토시아닌 축적 수준이 낮게 나타나는 것으로 알려져 있기 때문에, *TTG1-OX* 형질전환 유묘의 안토시아닌 수준을 측정하였다. *PAP1-D*가 이전에 안토시아닌의 높은 수준의 축적을 보여주었기 때문에, 본 실시예에서는 증가된 플라보노이드 생합성에 대한 양적 대조군으로 *PAP1-D* 돌연변이를 이용하였다 (Borevitz et al. 2000). 도 3b 및 3c에 나타난 바와 같이, *TTG1* 과발현 유묘도 야생형에 비해 낮은 안토시아닌을 함유하는 것으로 나타났다. 이 결과에 따라, *TTG1* 조절의 표적 유전자로 알려진 플라보노이드 생합성 유전자의 전사수준을 확인하게 되었다. 이 실험에서, *DFR* 전사 수준은 야생형에 비해 *TTG1-OX* #4 및 *TTG1-OX* #5 유묘에서 다소 낮

은 것으로 나타난 반면, *FLAVONOL SYNTHASE (FLS1)*의 발현은 이들 돌연변이에서 향상되었다 (도 4a). 따라서 이들 돌연변이 유묘의 플라보놀 축적 수준이 측정되었다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 야생형 및 다른 대조 돌연변이에 비해 *TTG1-OX* 유묘의 캠페롤 (kaempferol, green color) 및 케르세틴 (quercetin, yellow color) 수준이 향상되었다. 도 5에 나타난 바와 같이, 프로안토시아닌 생합성이 부족한 *tt2* 돌연변이는 음성 대조군 (negative control)으로 사용되었다. 대조적으로, ABA 결핍 돌연변이 *aba3*은 예측과 달리 케르세틴이 약간 더 축적되었다 (도 5).

[0086] 실시예 4. ABA 및 건조 처리에 의한 *TTG1-OX* 유묘의 뿌리 발달 향상

[0087] *ttg1*은 ABA가 첨가된 배지에서 뿌리 생장이 저하된 것으로 나타났기 때문에, 본 발명자들은 ABA 처리에 대한 *TTG1-OX* 유묘의 반응을 실험하였다. 예측한 대로, *TTG1-OX* 유묘는 야생형에 비해 ABA 배지에서 뿌리가 더 잘 생장하는 것으로 나타났다 (도 6a 및 도 6b). 또한, 본 발명자들은 *TTG1-OX* 유묘가 야생형에 비해 더 많은 측근 및 더 긴 주근을 생산하는 것을 관찰하였다 (도 6a 및 도 6b). 따라서, 이들 돌연변이가 실제로 스트레스 내성 수준이 증가하였는지를 확인하기 위해, 일부 스트레스-마커 유전자를 측정하였다. 그러나, 도 6c에 나타난 바와 같이, *COLD-REGULATED 15A (Cor15A)* 및 *KIN1*의 전사 수준은 야생형과 *TTG1-OX* 유묘에서 매우 유사한 결과를 보였다. 이런 결과는, 스트레스 또는 ABA 처리에 노출된 *TTG1-OX* 유묘의 뿌리 생장이 향상된 것이 단순히 스트레스-내성 신호전달 경로의 단순 조정 (mediation)에 기인한 것이 아니라는 것을 나타낸다.

[0088] 실시예 5. 오옥신 활성과 관련된 *TTG1-OX* 유묘의 뿌리 구조의 차이

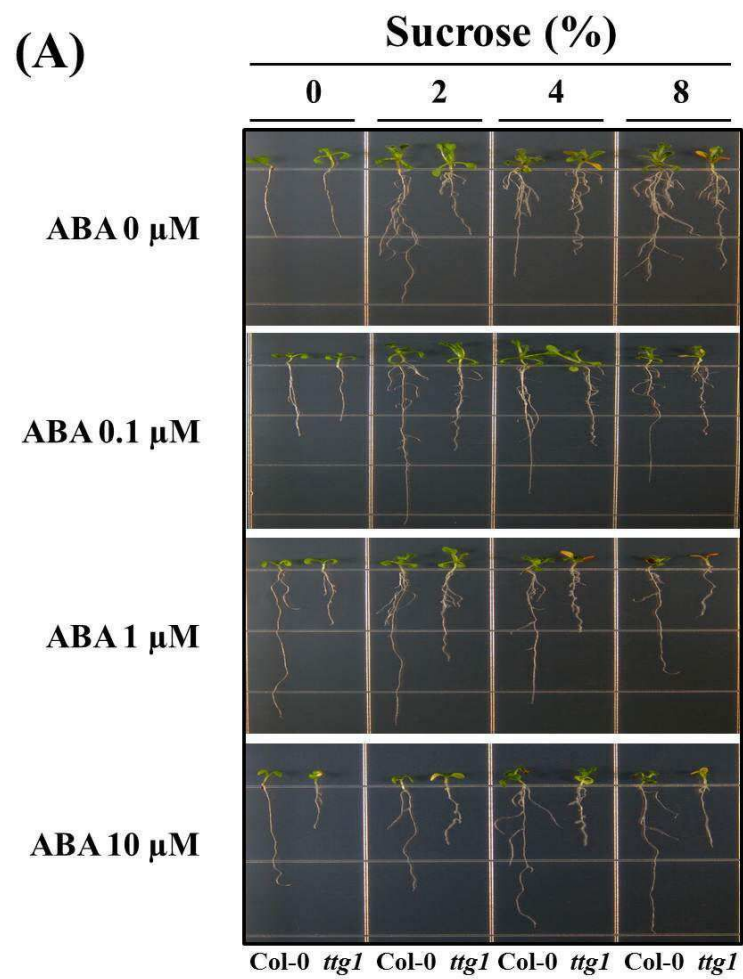
[0089] 오옥신은 뿌리 발달을 위한 가장 중요한 식물호르몬이다. *TTG1-OX* 유묘는 ABA 처리뿐만 아니라 정상 조건에서도 뿌리 구조가 개선되었다 (도 6a 및 도 6b). 또한, 상술한 결과는 이러한 향상된 뿌리 발달이 스트레스-마커 유전자 발현의 향상을 통해 일어난 것이 아니라는 것을 보여주었다 (도 6c). 부가적으로, 오옥신 극성 이동 저해제인 플라보놀은 *TTG1-OX* 유묘에서 축적이 증가한 것으로 나타났다. 이런 이유에 대해, 본 발명자들은 오옥신-관련 유전자 발현이 *TTG1-OX* 유묘에서 변경되었다고 가정하였다. 사실, *IAA3* 및 *IAA17* 전사 수준은 형질전환 유묘에서 낮았다 (도 7). 이들 유전자의 억제가 뿌리 시스템의 발달과 변경에 영향을 미친 것으로 보여진다 (Kim et al. 2006; Tian and Reed 1999). 다음, 본 발명자들은 수크로오스와 함께 처리된 ABA에 대한 오옥신 민감도 측정을 시도하였다 (도 8). 이를 위해, 오옥신 마커 구조체 (*DR5::GUS*)를 함유한 돌연변이 유묘에 ABA 및 수크로오스가 처리되었다 (도 8). 그 결과 ABA 및 수크로오스는 식물 세포의 오옥신 민감도와 관련하여 길항적 관계 (antagonistic relationship)를 가지는 것으로 나타났다 (도 8).

[0090] 본 발명에서, 본 발명자들은 증가한 플라보노이드 생합성에 대한 양적 대조군 (positive control)으로써 *PAP1-D* 돌연변이를 사용하였다. *PAP1-D* 유묘는 *TTG1-OX* 유묘에 적용된 동일한 실험조건하에서 ABA 배지로 옮겨졌다. 그 결과 *PAP1-D* 및 *TTG1-OX* 유묘는 ABA에 노출 시 동일한 뿌리 발달 반응을 나타내는 것을 보여주었다 (도 6a). 종합적으로 살펴보면, 본 발명자들은 플라보노이드 생합성 경로의 유전적 변경이 오옥신 활성화에 영향을 미쳐, 뿌리 구조의 변화를 가져올 수 있다는 것을 확인하였다.

[0091] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

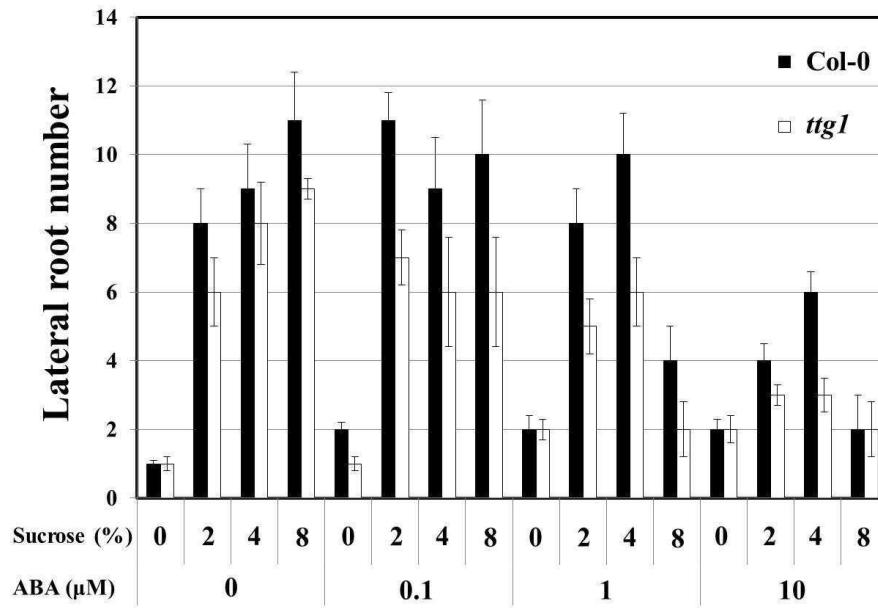
도면

도면1a

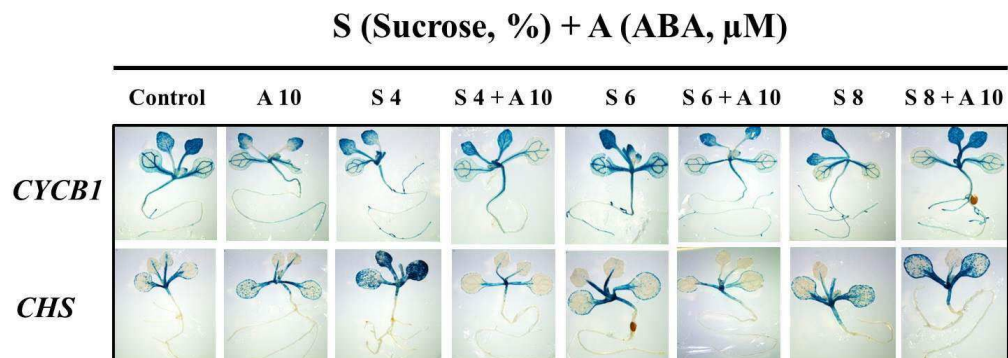


도면1b

(B)

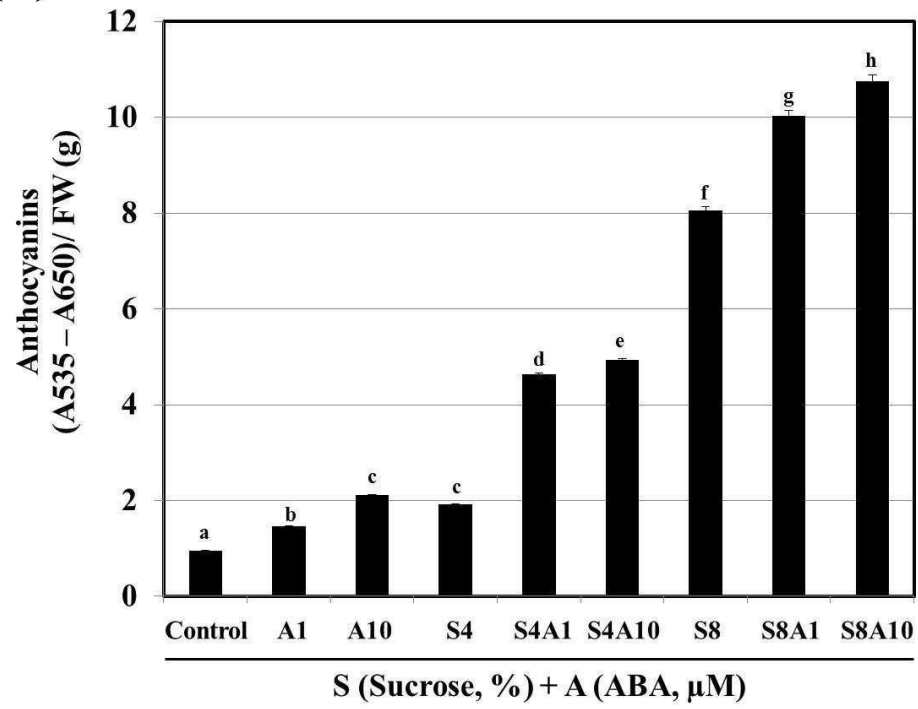


도면2a



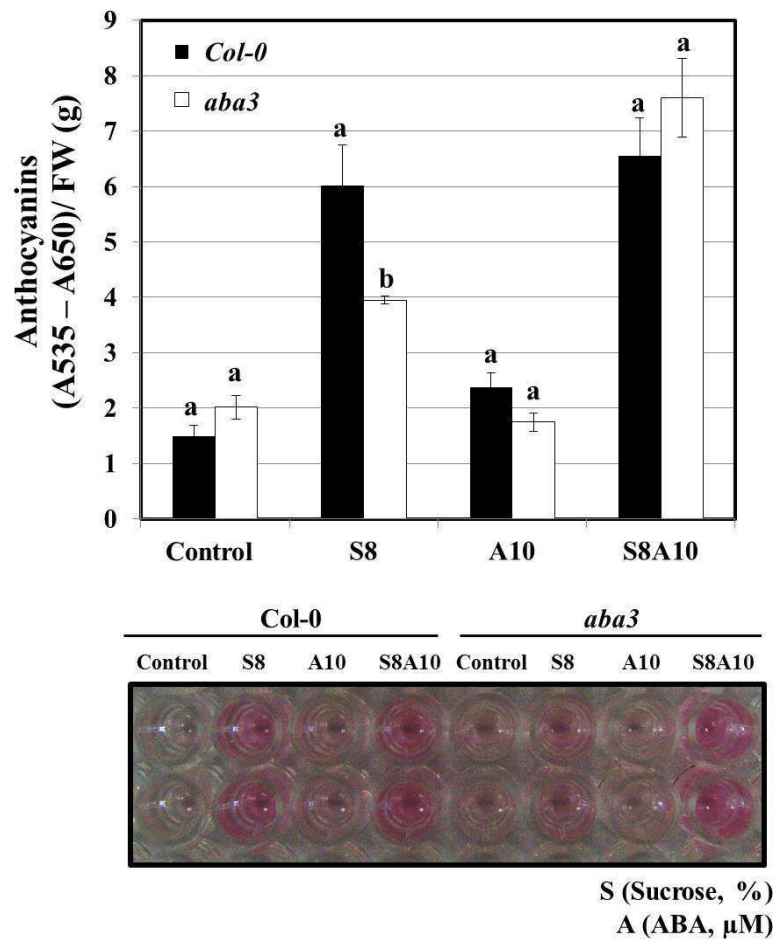
도면2b

(B)



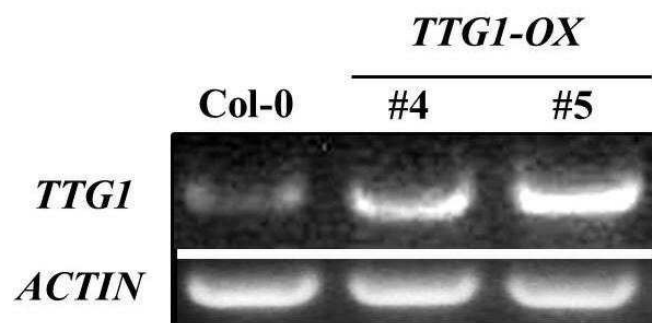
도면2c

(C)



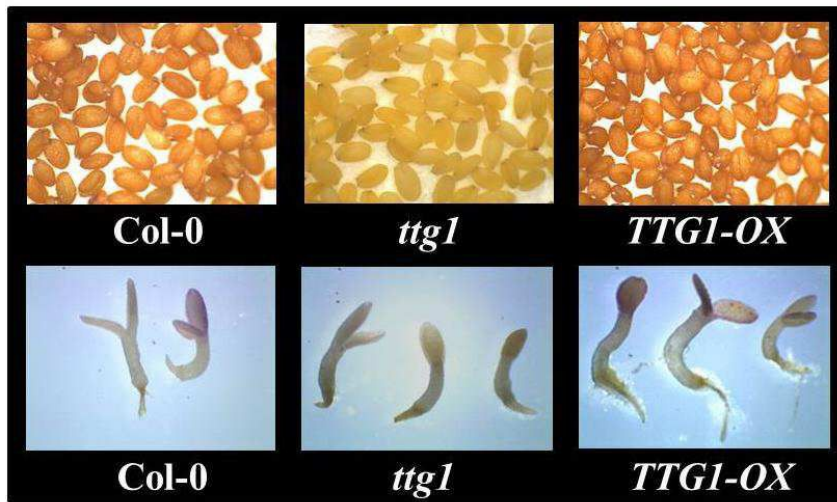
도면3a

(A)



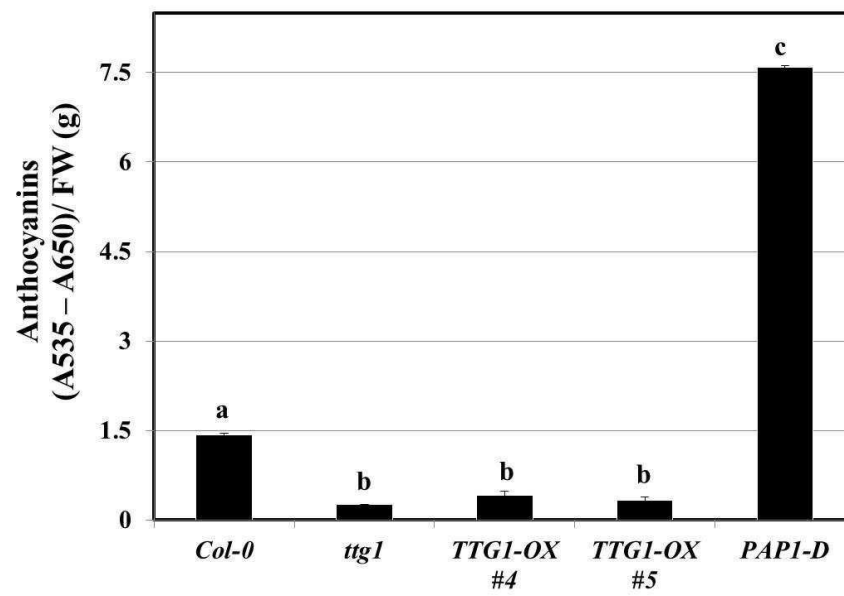
도면3b

(B)

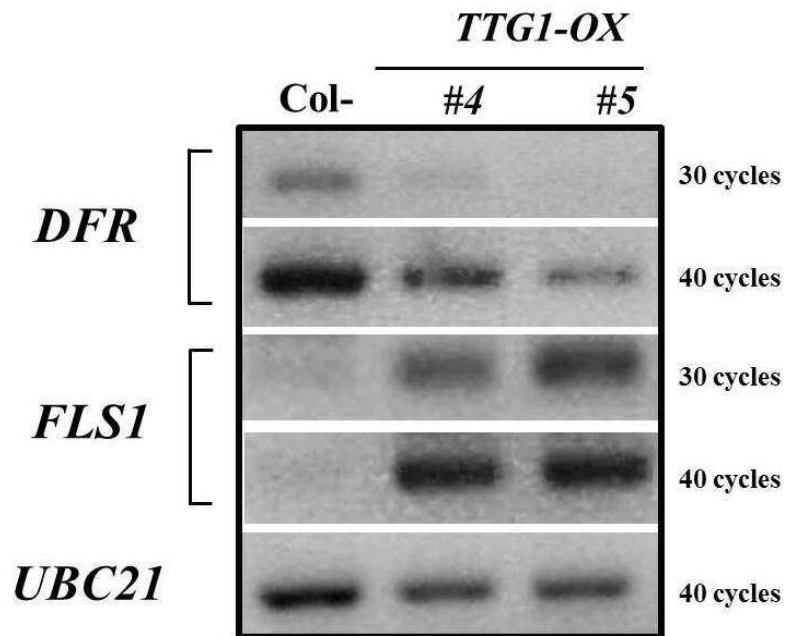


도면3c

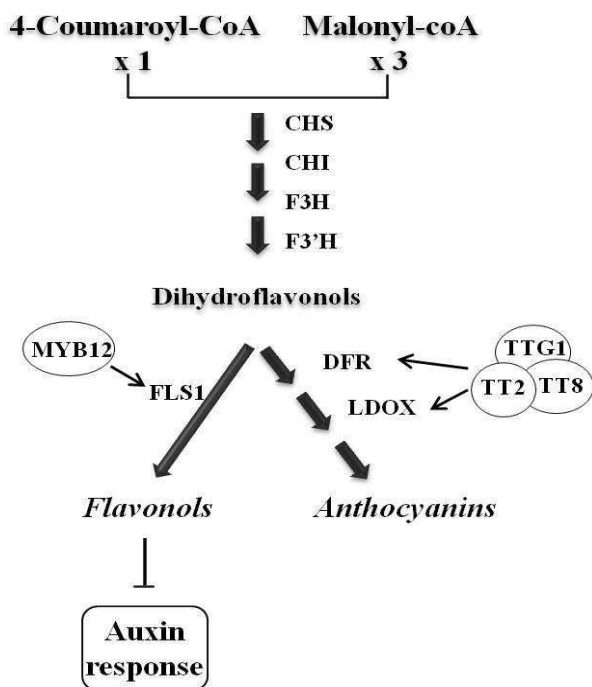
(C)



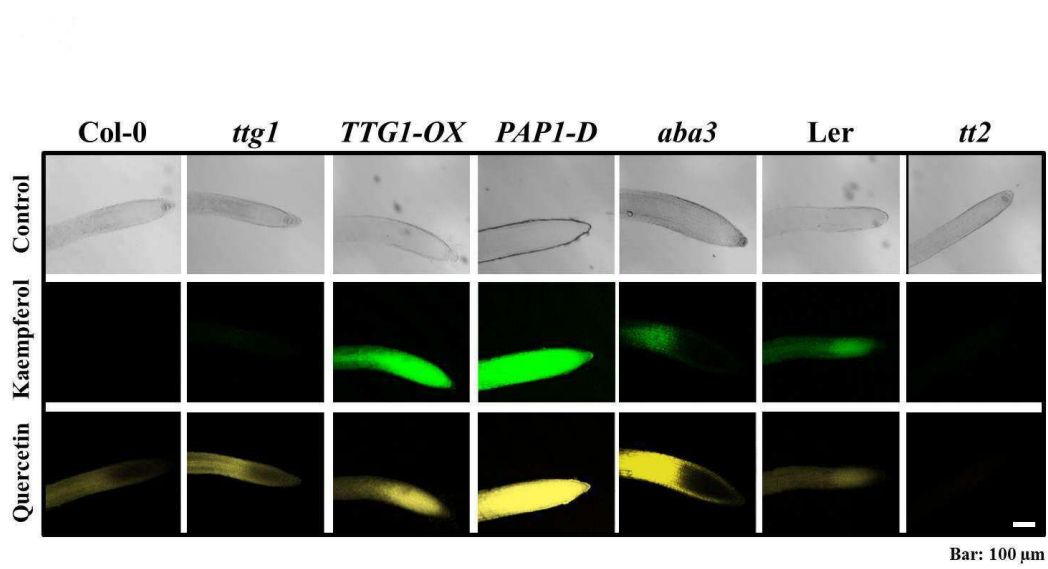
도면4a



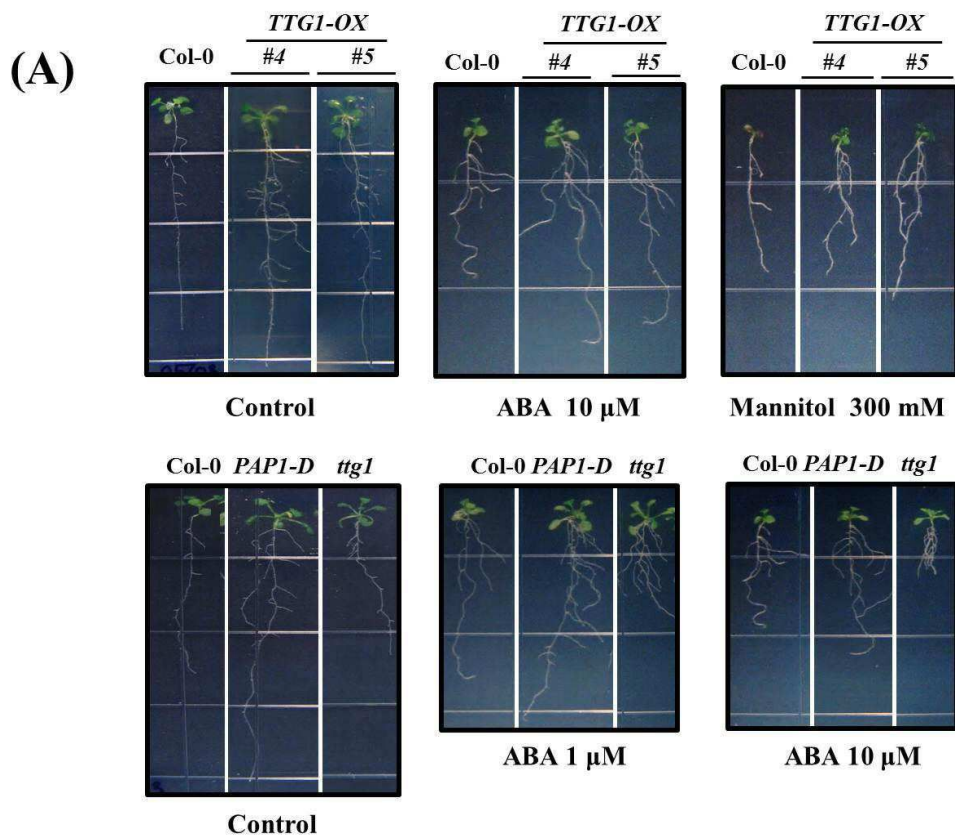
도면4b



도면5

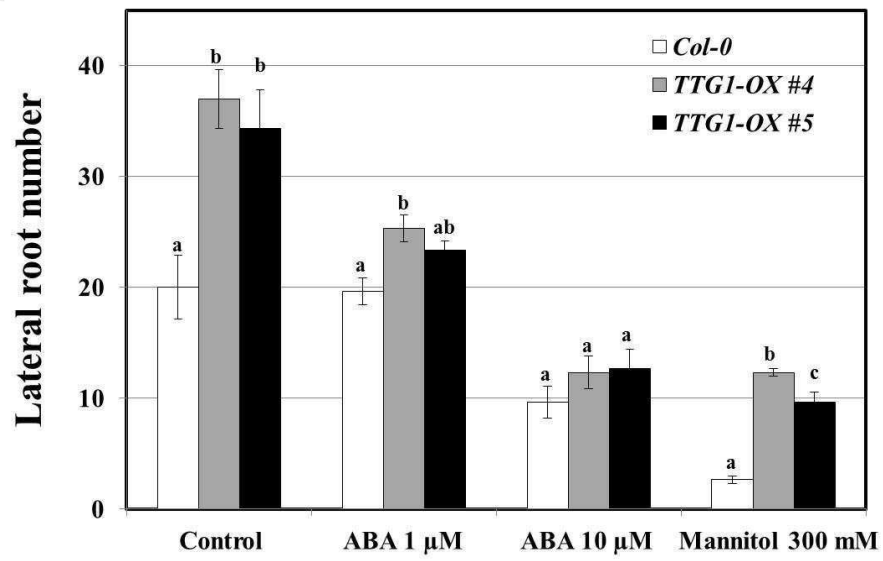


도면6a



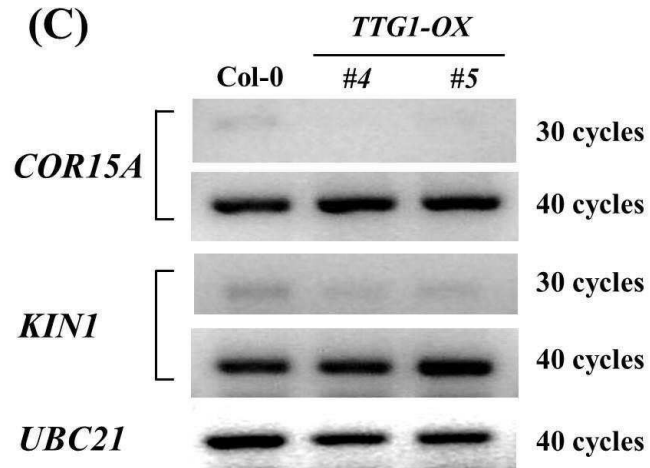
도면6b

(B)

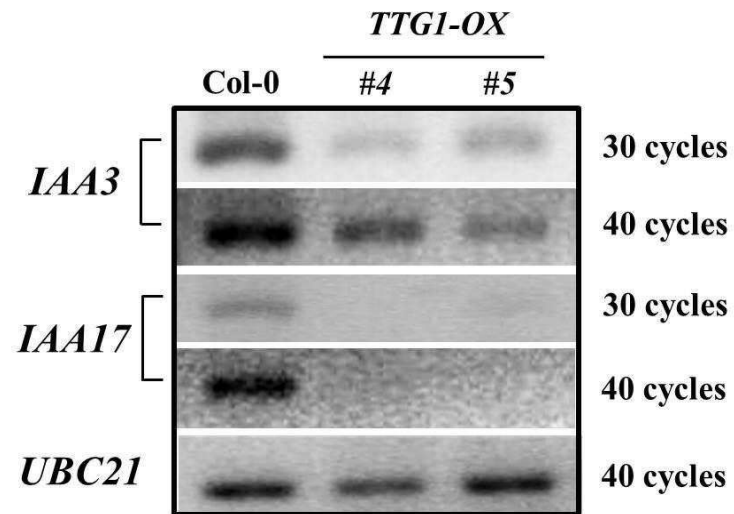


도면6c

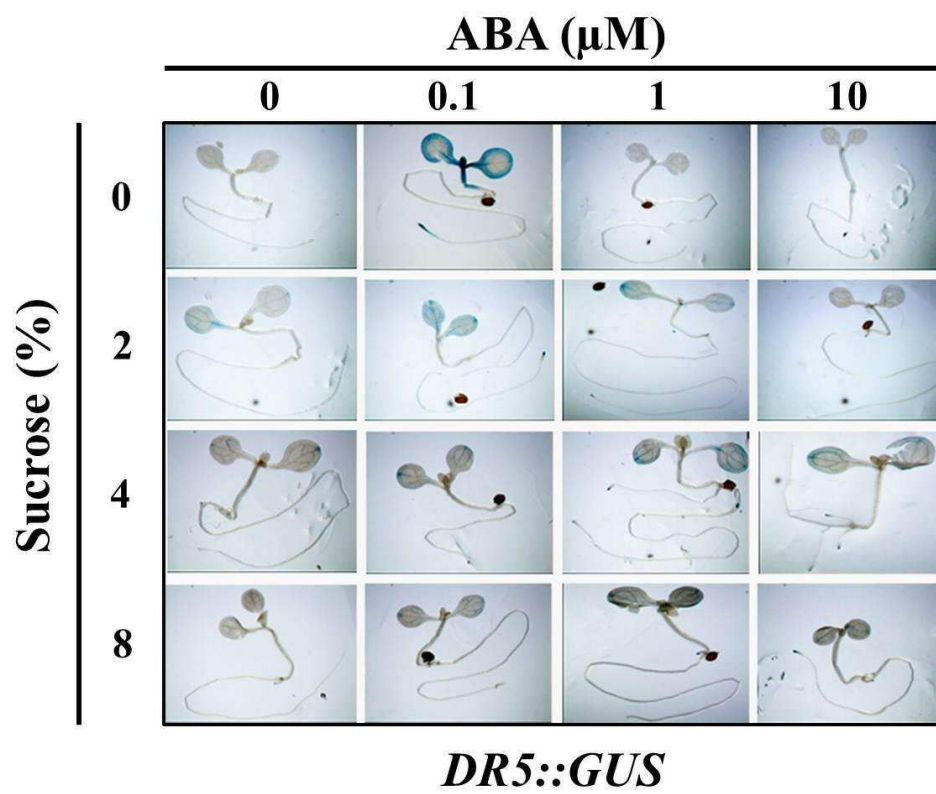
(C)



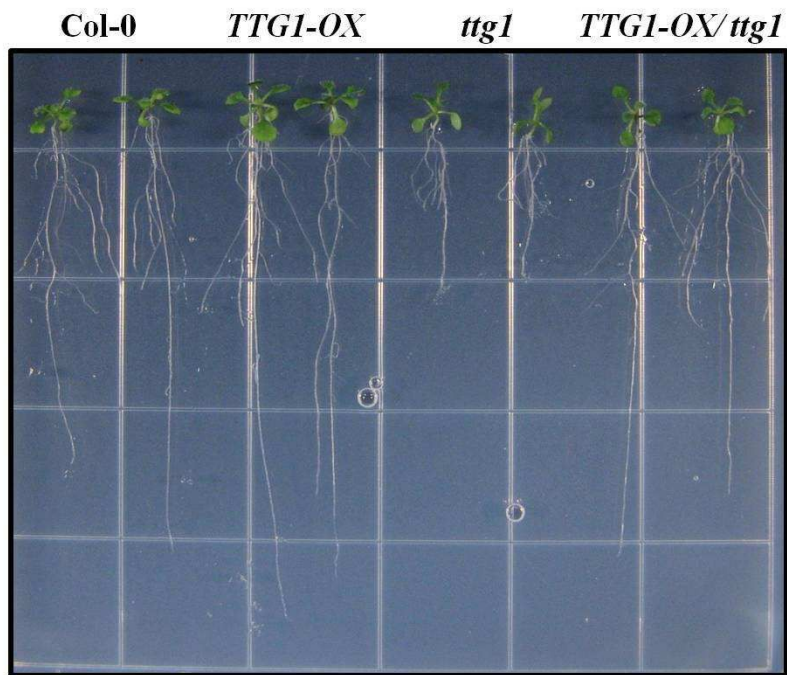
도면7



도면8



도면9



도면10

