



- (51) 국제특허분류:
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/000599
- (22) 국제출원일: 2012년 2월 3일 (03.02.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0010642 2011년 2월 7일 (07.02.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국
생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE
OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806
Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 유장렬 (LIU, Jang
Ryol) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지,
305-806 Daejeon (KR). 민성란 (MIN, Sung Ran)

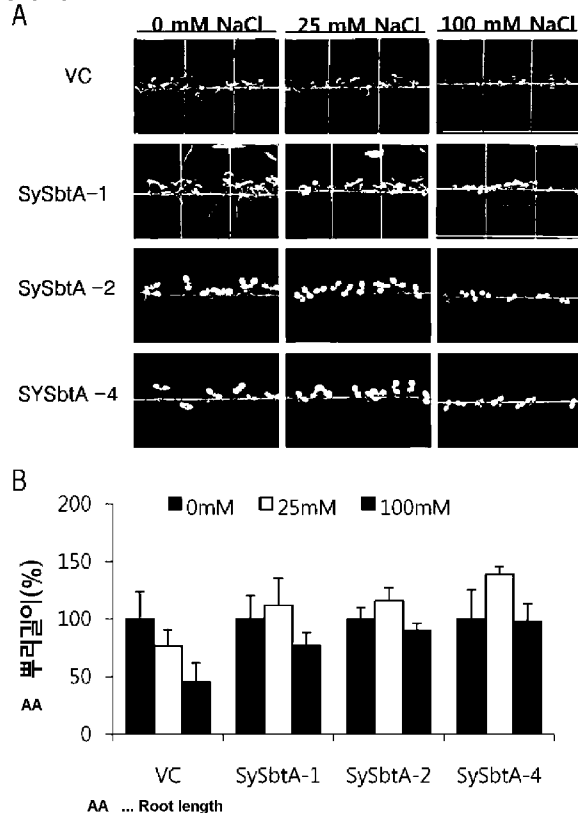
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806
Daejeon (KR). 정원중 (JEONG, Won Joong) [KR/KR];
대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon
(KR). 박연일 (PARK, Youn Il) [KR/KR]; 대전광역시
유성구 지족동 열매마을아파트 705동 401호, 305-770
Daejeon (KR). 정화지 (CHUNG, Hwa Jee) [KR/KR]; 대
전광역시 유성구 하기동 송림마을아파트 503동 404
호, 305-759 Daejeon (KR). 김종현 (KIM, Jong Hyun)
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806
Daejeon (KR). 박지현 (PARK, Ji Hyun) [KR/KR]; 대전
광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR).
유재일 (LYU, Jae Il) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어
은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 이정희 (LEE,
Jeong Hee) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번
지, 305-806 Daejeon (KR).

- (74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 대전광역시 서구
둔산동 949번지 12층 그린국제특허법률사무소, 302-
120 Daejeon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: *SbTA* GENE DERIVED FROM SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803 AND USE THEREOF(54) 발명의 명칭: 시네코시스티스 속 PCC 6803 유래 *SbTA* 유전자 및 이의 용도

[Fig. 4]



(57) Abstract: The present invention relates to: a method for en-
hancing salt tolerance of plants using a *Sbta* (Sodium dependent
bicarbonate transporter) gene derived from *Synechocystis* sp.
PCC6803; a method for preparing transgenic plants with en-
hanced salt tolerance using the *Sbta* gene; transgenic plants with
enhanced salt tolerance prepared by the same method and seeds
thereof; a method for increasing biomass of plants using the *Sbta*
gene; a method for preparing the transgenic plants with increased
biomass using the *Sbta* gene; and transgenic plants with increased
biomass using the *Sbta* gene and seeds thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 시네코시스티스 속
(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래 *Sbta* (Sodium dependent bicar-
bonate transporter) 유전자를 이용하여 식물의 내염성을 증가
시키는 방법, 상기 *Sbta* 유전자를 이용한 내염성이 증가된 형
질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 내염
성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자, 상기 *Sbta* 유전
자를 이용하여 식물의 바이오매스를 증가시키는 방법, 상기
Sbta 유전자를 이용한 바이오매스가 증가된 형질전환 식물
체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 바이오매스가 증
가된 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다.



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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG,

ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 시네코시스티스 속 P C C 6803 유래 S b t A 유전자 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 시네코시스티스 속 PCC6803 유래 *SbtA* 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 이용하여 식물의 내염성을 증가시키는 방법, 상기 *SbtA* 유전자를 이용한 내염성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 내염성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자, 상기 *SbtA* 유전자를 이용하여 식물의 바이오매스를 증가시키는 방법, 상기 *SbtA* 유전자를 이용한 바이오매스가 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 바이오매스가 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 식물은 태양에너지를 이용하여 물을 산화시키며 산소를 방출하고 이산화탄소와 유기물을 주로 당의 형태로 환원시킨다. 광합성은 이러한 에너지를 수확하고 유기물질을 합성하여 생명의 에너지원으로 이용하는 가장 중요한 화학 반응이라고 할 수 있다. 광합성을 하는 대부분의 육상식물은 캘빈회로의 루비스코를 통해 공기중의 CO₂를 바로 고정하는 C3 식물로써 구분된다. C3 식물의 탄소고정은 루비스코 (ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase; Rubisco)에 의하여 촉매되며, 루비스코는 카르복실라제(carboxylase) 활성과 옥시게나제(oxygenase) 활성을 동시에 지니고 있어 경쟁적으로 반응하기 때문에 탄소 고정 효율이 낮다. 또한 루비스코의 산화반응에 의한 광호흡은 탄소고정 능력을 30~50%까지 저하시키며 가뭄, 고조도 및 고온 등의 스트레스 조건에서는 탄소 고정율이 지속적으로 감소된다(Sharkey, 1988, *Physiologia Plantarum* 73:147-152).
- [3] 반면 열대환경에서 나타나는 C4 식물의 CO₂ 고정은 해부학적으로 엽육세포와 유관속초 세포가 협동하여 이루어지며, 상기 식물의 최초의 카르복시화는 루비스코 대신 PEP(phosphoenylpyruvate) 카르복시화 효소에 의하여 촉매되며, C4 산인 말산 및 아스파르트산이 최초의 광합성 중간 산물이 된다(Chollet et al., 1996, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:273-298). PEP 카르복시화 효소는 기질인 중탄산 이온에 대한 친화도가 높아 대기 수준과 비슷한 CO₂ 농도에서도 포화되며, 기질로 중탄산 이온과 반응하기 때문에 O₂와는 반응하지 않는다. 이처럼 PEP 카르복시화 효소의 활성이 높기 때문에 C4 식물은 기공을 부분적으로 닫아도 CO₂를 빠른 속도로 고정하면서도 물을 보존할 수 있다. 이렇듯 C4 식물은 높은 광합성을 외에도 질소와 물 이용 효율이 높아 아열대

지역에서 생산성이 높다.

- [4] 최근에는 이러한 C4 식물과 광합성 조류에서 나타나는 CO₂ 농축 메커니즘을 C3 식물에 도입하기 위한 연구가 진행되고 있다. C4 식물의 광합성 관련 주요 효소들의 유전자를 조작함으로써 C3 식물의 광합성 효율을 높이는 연구가 진행되고 있다(Miyao and Fukayama, 2003, Arch Biochem Biophys 414:197-203). 벼에 옥수수 유전자의 PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase), PPDK (pyruvate orthophosphate dikinase) 및 NADP-ME (NADP-malic enzyme) 유전자를 각각 도입한 결과, 높은 효소활성도를 보였으며(Fukayama et al., 2001, Plant Physiol 127:1136-1146), PEPC와 NADP-ME를 함께 발현시킨 담배의 경우 광호흡율이 감소되었다(Hausler et al., 2002, J Exp Bot 53:591-607).
- [5] 한편 광합성 미세 조류는 루비스코 주변에서 CO₂를 농축하는 메커니즘을 가지고 있어 결점을 보완한다. 미세 조류의 CO₂ 농축기작인 CCM (CO₂-concentrating mechanism)은 광합성 미세 조류가 낮은 CO₂ 환경에서 무기 탄소를 농축할 수 있는 능력을 발달시키는데, 원형질막의 중탄산 이온펌프로 작용하는 트랜스포터(transporter)를 사용하여 세포내 무기 탄소의 농도를 높여준다. 농축된 중탄산 이온은 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)에 의하여 CO₂로 전환되며, CO₂는 캘빈회로로 들어가 루비스코와 결합하여 카르복시화가 진행된다. 루비스코의 활성은 활성부위 근처에서의 CO₂와 O₂의 농도에 따라서 서로 경쟁적으로 나타나는데, 루비스코의 CO₂ 친화도는 원래 낮지만 세포내 CO₂ 농도를 높여 줌으로써 높은 광합성 속도를 나타낼 수 있다. 엽록체 내에 CO₂ 농도가 적은 양이 증가하더라도 CO₂ 고정효율은 매우 높게 향상될 수 있다(Price et al., 2008, J Exp Bot 59:1441-1461).
- [6] 이러한 미세 조류의 CO₂ 농축기작인 CCM 메커니즘을 C3식물에 도입하기 위한 연구로 시아노박테리움(*Cyanobacterium*) 시네코코커스(*Synechococcus*) PCC 7942 유래 중탄산 이온 트랜스포터인 *IctB* 유전자를 C3 식물인 애기장대와 담배에 도입시킨 결과, 광합성 효율과 생장율이 증가되었으며(Lieman-Hurwitz et al., 2003, Plant Biotechnol J 1:43-50), *IctB* 유전자를 벼에서 발현 시켰을 때 광합성 효율과 효소 활성이 증가되고 CO₂ 보상점이 낮아졌으며 바이오매스가 증가된 결과가 보고되었다(Yang et al., 2008, Energy from the Sun 20:1244-1246). 상기 연구결과는 CO₂ 농축 메커니즘에 관련된 유전자를 C3 식물에 발현시킴으로써 CO₂ 고정효율을 증가시키고, 물과 질소 이용 효율을 높이는 등 C3식물의 결점을 보완할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. C4 효소를 C3 식물에서 발현시킴과 동시에 미세 조류의 CO₂ 농축 메커니즘을 적용한다면 CO₂ 고정을 극대화함은 물론, 단세포 C4-주기(single-cell C4-cycle) 시스템을 C3 식물에서 실현시킬 수 있는 원동력이 될 것이다.
- [7] 한편 시아노박테리아에는 여러 가지 CO₂ 농축기작에 사용되는 중탄산 이온 트랜스포터(bicarbonate transporter)가 존재한다. 그 중 *SbtA*는 중탄산 이온과 높은 친화력을 가지고 있어 낮은 CO₂ 농도의 환경에서도 CO₂를 세포내로 효율적으로

- 흡수시킴으로써 세포내 CO₂ 농도를 높일 수 있으며, 나트륨 이온/중탄산 이온 심포터(symporter)로써 *SbtA*를 통한 중탄산 이온의 흡수가 나트륨 이온에 의존적인 것으로 보고되었다(Shibata et al., 2002, J Biol Chem 227:18658-18664). 또한 *SbtA*는 시네코시스티스(*Synechocystis*) PCC6803에 단일-서브유닛 중탄산 이온 트랜스포터(Single-subunit bicarbonate transporter)로 존재하며, 다중-서브유닛 트랜스포터(multi-subunit transporter)에 비하여 조작이 용이하므로 고등식물로의 형질전환이 유리하다(Price et al., 2008, J Exp Bot 59:1441-1461).
- [8] 시아노박테리아는 엽록체의 원시적인 형태로 외막 및 엽록소 a를 함유하며, 식물처럼 광합성을 하는 광합성세균으로 엽록체와 유전적, 구조적 유사성이 크다. 특히 시아노박테리움 시네코시스티스 PCC6803은 광합성 원핵생물로는 최초로 게놈 분석이 완성되어 모델생물로서 이용되고 있다(Tabei et al., 2007, Biochem Biophys Res Commun 355:1045-1050). 상기 특성과 게놈 시퀀싱에 의한 정보로 인해 최근에는 시아노박테리아가 광합성 및 광합성의 유전적 조절 등의 연구에 많이 이용되고 있다. 본 발명에서는 이러한 점을 고려하여 시네코시스티스 PCC6803으로부터 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 분리하였으며, C3 식물인 담배에 도입함으로써 CO₂ 이용 효율과 바이오매스 생산이 증가된 식물체를 개발하고자 하였다. 이를 위하여 엽록체 형질전환 시스템을 통하여 *SbtA* 유전자가 도입된 담배 식물체를 제작하고, 확보된 T2 세대를 대상으로 효소활성과 광합성 효율, 탄수화물 함량, 생장량 및 바이오매스 생산 등을 조사하였다.
- [9] 한국등록특허 제10-0895611호에는 시네코시스티스PCC6803 유래 SyFBP/SBPase 유전자를 이용하여 식물체의 내염성을 증가시키는 방법이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제10-0990333호에는 보리 유래 NHX 유전자를 이용하여 식물체의 내염성을 증가시키는 방법이 개시되어 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 시네코시스티스 PCC6803 유래 *SbtA* 유전자를 도입시킨 형질전환 담배 식물체에서 염 스트레스에 대한 내성이 증가하고, 바이오매스가 증가한 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결 수단

- [11] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 이용하여 식물의 내염성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 시네코시스티스 속PCC6803 유래 *SbtA* 유전자를 이용한 내염성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 내염성이 증가된 형질전환 식물체 및

이의 종자를 제공한다.

- [14] 또한, 본 발명은 시네코시스티스 속PCC6803 유래의 *SbtA* 유전자를 포함하는, 식물체의 내염성 증가용 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 시네코시스티스 속PCC6803 유래 *SbtA* 유전자를 이용하여 식물의 바이오매스를 증가시키는 방법을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 시네코시스티스 속PCC6803 유래 *SbtA* 유전자를 이용한 바이오매스가 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 바이오매스가 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 시네코시스티스 속PCC6803 유래의 *SbtA* 유전자를 포함하는, 식물체의 바이오매스 증가용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [19] 본 발명의 시네코시스티스 속PCC6803 유래 *SbtA* 유전자를 식물체의 엽록체에 형질전환시키면 염 스트레스에 대한 내성이 증가할 뿐만 아니라 바이오매스 또한 증가한다. 따라서 *SbtA* 유전자를 이용하면 염 스트레스 환경에 대해 저항성이 강한 형질전환 식물체를 개발하는데 유용할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 시네코시스티스 *SbtA* 유전자의 엽록체 형질전환 벡터를 나타낸다. 상기 벡터는 *Rclp* 프로모터, *SbtA* 표적 유전자, 2개의 마커 유전자(*aadA* 및 *GFP*), *rrnB1/B2* 터미네이터 및 엽록체 게놈 내의 삽입 영역(*trnI* 및 *trnA*)으로 이루어진다.
- [21] 도 2는 담배 엽록체에 도입된 시네코시스티스 *SbtA* 유전자의 도입과 발현 결과를 나타낸다. (A) *trnA* 프로브를 이용한 벡터 대조군 및 Sy*SbtA*형질전환 식물의 서던 블롯 분석. (B) *SbtA* 프로브를 이용한 노던 블롯 분석.
- [22] 도 3은 엽록체 형질전환 담배 식물체의 잎으로부터 분리된 원형질체의 GFP 발현을 나타낸 것이다. GFP의 발현은 형광현미경으로 관찰하였다.
- [23] 도 4는 대조군 식물 및 Sy*SbtA* 형질전환 식물의 생장 및 뿌리 발달에 대한 염의 효과를 나타낸 것이다. (A) 0 mM, 25 mM 및 100 mM의 NaCl을 포함하는 배지에서 9일 동안 대조군 및 형질전환 식물을 직접 발아시킨 결과. (B) 뿌리 발달에 대한 다양한 염 농도의 효과.
- [24] 도 5는 형질전환 담배 식물 및 대조군 식물의 표현형을 나타낸 것이다. (A) 7주 동안 키운 담배 식물의 표현형. (B) 14주 동안 키운 개화 개시기의 담배 식물의 표현형. (C) 9주 동안 키운 담배 식물의 꼭대기로부터 7번째 잎의 모양. 식물은 25°C 및 60% 상대습도로 16시간 광 및 8시간 암의 주기하의 피토티론(Phytotron) 조건에서 성장되었다.
- [25] 도 6은 대조군 식물 및 Sy*SbtA* 형질전환 담배 식물의 생장율, 생중량 및 건중량을 나타낸 것이다. (A) 토양에 이식 후 피토티론 조건하의 초장. (B)

- 생중량. (C) 건조중량. 결과는 평균±표준편차로 나타내었다(n=10).
- [26] 도 7은 대조군 식물 및 SySbtA 형질전환 식물체의 잎 수와 줄기 직경을 비교한 것이다. (A) 잎의 수. (B) 줄기 직경. 결과는 평균±표준편차로 나타내었다(n=10).
- [27] 도 8은 엽록소 함량을 측정한 결과를 나타낸 것이다. (A) 엽록소 a, b 및 총 엽록소의 양. (B) 엽록소 a/b 비. 담배 식물은 10주 동안 키웠다. 결과는 평균±표준편차로 나타내었다(n=3).
- [28] 도 9는 대조군 식물 및 SySbtA 형질전환 식물에서 세포내 CO₂ 농도에 따른 광합성율을 나타낸 것이다. 담배 식물은 9주 동안 키웠다. 700 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광도에서 증가하는 세포내 CO₂ 농도(Ci)에 대한 CO₂ 동화율의 반응(n=7).
- [29] 도 10은 벡터 대조군 및 형질전환 담배 식물에서의 CO₂ 보상점을 나타낸 것이다. 보상점은 0~400 mL/L 범위의 CO₂ 농도에서 CO₂ 교환율을 측정하여 추정되었다. 담배 식물은 9주 동안 키웠다. 결과는 평균±표준편차로 나타내었다(n=4).
- [30] 도 11은 수용성 당 및 전분 함량의 측정 결과를 나타낸 것이다. (A) 프룩토오스, 글루코오스 및 수크로오스의 양. (B) 전분의 양. 당 및 전분은 식물 꼭대기로부터 5번째에 해당하는 잎 추출물에서 측정되었다. 담배 식물은 10주 동안 키웠다. 결과는 평균±표준편차로 나타내었다(n=4).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *SbtA* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 내염성을 증가시키는 방법을 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 엽록체 형질전환 벡터이며, 더욱 바람직하게는 도 1에 기재된 RclpGAH::*SbtA* 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 재조합 벡터를 식물세포, 바람직하게는 식물세포의 엽록체에 형질전환시킨다.
- [32] 상기 *SbtA* 유전자는 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [33] 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는

세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

- [34] 본 발명에서, 상기 *SbtA* 유전자 서열은 재조합 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다.
- [35] *SbtA* 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [36] 본 발명의 재조합 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.
- [37] 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 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자, aadA 유전자 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [38] 본 발명의 재조합 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS, 히스톤 프로모터, Clp 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.
- [39] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타 α -아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 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 바람직하다.
- [40] 본 발명의 벡터를 원핵세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [41] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다.
- [42] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법, 하나한 방법 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.
- [43] 또한, 본 발명은 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 내염성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법을

제공한다. 바람직하게는, 상기 *SbtA* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다.

- [44] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 튜메피aciens(*Agrobacterium tumefaciens*)에 의해 매개될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

- [45] 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지되어 있다(*Handbook of Plant Cell Culture*, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

- [46] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 내염성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다. 바람직하게는, 상기 식물체는 쌍자엽 식물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 상기 쌍자엽 식물은 담배이다.

- [47] 상기 쌍자엽 식물은 암매과(돌매화나무과, *Diapensiaceae*), 매화오리나무과(*Clethraceae*), 노루발과(*Pyrolaceae*), 진달래과(*Ericaceae*), 자금우과(*Myrsinaceae*), 앵초과(*Primulaceae*), 갯질경이과 (*Plumbaginaceae*), 감나무과(*Ebenaceae*), 때죽나무과(*Styracaceae*), 노린재나무과, 회목과(*Symplocaceae*), 물푸레나무과(목서과, *Oleaceae*), 마전과(*Loganiaceae*), 용담과(*Gentianaceae*), 조름나물과(*Menyanthaceae*), 협죽도과(마삭나무과, *Apocynaceae*), 박주가리과(*Asclepiadaceae*), 꼭두서니과(*Rubiaceae*), 꽃고비과(*Polemoniaceae*), 메꽃과(*Convolvulaceae*), 지치과(*Boraginaceae*), 마편초과(*Verbenaceae*), 꿀풀과(*Labiatae*), 가지과(*Solanaceae*), 현삼과(*Scrophulariaceae*), 능소화과(*Bignoniaceae*), 쥐꼬리망초과(*Acanthaceae*), 참깨과(*Pedaliaceae*), 열당과 (*Orobanchaceae*), 제스네리아과(*Gesneriaceae*), 통발과(*Lentibulariaceae*), 파리풀과(*Phrymaceae*), 질경이과(*Plantaginaceae*), 인동과(*Caprifoliaceae*), (연복초과 *Adoxaceae*), 마타리과(*Valerianaceae*), 산토끼꽃과(*Dipsacaceae*), 초롱꽃과 (*Campanulaceae*), 국화과(*Compositae*), 소귀나무과(*Myricaceae*), 가래나무과 (*Juglandaceae*), 버드나무과(*Salicaceae*), 자작나무과(*Betulaceae*), 너도 밤나무과(참나무과, *Fagaceae*), 느릅나무과(*Ulmaceae*), 뽕나무과(*Moraceae*), 켄치풀과 (*Urticaceae*), 단향과(*Santalaceae*), 겨우살이과(*Loranthaceae*), 마디풀과(여뀌과, *Polygonaceae*), 자리공과(상륙과, *Phytolaccaceae*), 분꽃과(*Nyctaginaceae*), 석류풀과(*Aizoaceae*), 쇠비름과(*Portulacaceae*), 석죽과(*Caryophyllaceae*), 명아주과 (*Chenopodiaceae*), 비름과(*Amaranthaceae*), 선인장과(*Cactaceae*), 목련과(*Magnoliaceae*), 붓순나무과(*Illiciaceae*), 녹나무과(*Lauraceae*), 계수나무과 (*Cercidiphyllaceae*), 미나리아재비과(*Ranunculaceae*), 매자나무과(*Berberidaceae*),

으름덩굴과(Lardizabalaceae), 새모래덩굴과(망기과, Menispermaceae), 수련과(Nymphaeaceae), 붕어마름과(Ceratophyllaceae), 어항마름과(Cabombaceae), 삼백초과(Saururaceae), 후추과(Piperaceae), 홀아비꽃대과(Chloranthaceae), 쥐방울덩굴과(Aristolochiaceae), 다래나무과(Actinidiaceae), 차나무과(동백나무과, Theaceae), 물레나물과(Guttiferae), 끈끈이주걱과(Droseraceae), 양귀비과(Papaveraceae), 풍접초과(Capparidaceae), 십자화과(겨자과, Cruciferae), 플라타너스과(버즘나무과, Platanaceae), 조록나무과(금루매과, Hamamelidaceae), 꿩의비름과(돌나물과, Crassulaceae), 범의귀과(Saxifragaceae), 두충과(Eucommiaceae), 돈나무과(Pittosporaceae), 장미과(Rosaceae), 콩과(Leguminosae), 팽이밥과(Oxalidaceae), 쥐손이풀과(Geraniaceae), 한련과(Tropaeolaceae), 남가새과(Zygophyllaceae), 아마과(Linaceae), 대극과(Euphorbiaceae), 별이끼과(Callitrichaceae), 운향과(Rutaceae), 소테나무과(Simaroubaceae), 멀구슬나무과(Meliaceae), 원지과(Polygalaceae), 옷나무과(Anacardiaceae), 단풍나무과(단풍과, Aceraceae), 무환자나무과(Sapindaceae), 칠엽수과(Hippocastanaceae), 나도밤나무과(Sabiaceae), 봉선화과(물봉선과, Balsaminaceae), 감탕나무과(Aquifoliaceae), 노박덩굴과(화살나무과, Celastraceae), 고추나무과(Staphyleaceae), 회양목과 (Buxaceae), 시로미과(Empetraceae), 갈매나무과(Rhamnaceae), 포도과(Vitaceae), 담팔수과(Elaeocarpaceae), 피나무과(Tiliaceae), 아욱과(Malvaceae), 벽오동과 (Sterculiaceae), 팔꽃나무과(서향나무과, Thymelaeaceae), 보리수나무과 (Elaeagnaceae), 이나무과(Flacourtiaceae), 제비꽃과(Violaceae), 시계꽃과 (Passifloraceae), 위성류과(Tamaricaceae), 물별과(Elatinaceae), 베고니아과 (Begoniaceae), 박과(Cucurbitaceae), 부처꽃과(배롱나무과, Lythraceae), 석류나무과(Punicaceae), 바늘꽃과(Onagraceae), 개미탐과(Haloragaceae), 박쥐나무과 (Alangiaceae), 층층나무과(산수유나무과, Cornaceae), 두릅나무과(오갈피나무과, Araliaceae) 또는 산형과(미나리과)(Umbelliferae(Apiaceae))일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[48]

[49] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 시네코시스티스 속(Synechocystis)PCC6803 유래의 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는, 식물체의 내염성 증가용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 *SbtA* 유전자를 포함하며, 상기 유전자를 식물체의 엽록체에 형질전환시킴으로써 식물체의 내염성을 증가시킬 수 있는 것이다.

[50]

또한, 본 발명은 시네코시스티스 속(Synechocystis)PCC6803 유래 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *SbtA* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의

바이오매스를 증가시키는 방법을 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 엽록체 형질전환 벡터이며, 더욱 바람직하게는 도 1에 기재된 RclpGAH::SbtA 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 재조합 벡터를 식물세포, 바람직하게는 식물세포의 엽록체에 형질전환시킨다. 바람직하게는, 상기 *SbtA* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다.

- [51] 또한, 본 발명은 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 바이오매스가 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 *SbtA* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [52] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 바이오매스가 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다. 바람직하게는, 상기 식물체는 쌍자엽 식물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 쌍자엽 식물은 전술한 바와 같다. 바람직하게는, 상기 쌍자엽 식물은 담배이다.
- [53] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래의 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는, 식물체의 바이오매스 증가용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 *SbtA* 유전자를 포함하며, 상기 유전자를 식물체의 엽록체에 형질전환시킴으로써 식물체의 바이오매스를 증가시킬 수 있는 것이다.
- [54]
- [55] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [56]
- [57] 재료 및 방법
- [58] 식물 재료
- [59] 본 실험에서 담배는 *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun 품종을 사용하였으며, 10%(v/v) 소듐 하이포글로라이트(유효 염소 함유량 5%) 용액에 15분간 표면 살균 후 멸균수로 3회 세척하고 3% 수크로오스가 첨가된 MS 배지에 치상하여 25°C, 16시간 광조건, 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 유지되는 배양실에서 약 5주 동안 배양된 잎을 엽록체 형질전환 재료로 사용하였다.
- [60]
- [61] 시네코시스티스(*Synechocystis*) *SbtA* 유전자의 클로닝 및 색소체 형질전환용 벡터 제작
- [62] 시네코시스티스 PCC6803의 게놈 DNA를 주형으로 하여 SbtAF (5'- ATG GAT TTT TTG TCC AAT TTC TTG -3'; 서열번호 2) 및 SbtA R (5'- TTA ACC TGC ACC AAG GGT CTG GGC -3'; 서열번호 3) 프라이머를 사용하여 PCR 증폭(1.1

kb)하였으며, 염기서열을 시퀀싱하여 확인하였다. 증폭한 단편을 EcoRV으로 절단한 후 RclpGAH 벡터로 서브클로닝하고, Rclp-SbtA를 XhoI/SpeI으로 절단하여 블런팅(blunting)한 후 담배 색소체 형질전환 벡터인 TIA (PvuII)로 도입시켰다(도 1).

[63]

[64] 엽록체 형질전환과 형질전환체의 선발

[65] 입자 밤바드먼트를 위한 식물 재료 준비는 밤바드먼트 수행 하루 전에 1 mg/L 벤질아데닌(BA) 및 0.1 mg/L 나프탈렌아세트산(NAA)이 첨가된 MS 배지에 멸균된 필터 페이퍼(직경 70 mm ; Advantec Toyo, Tokyo Japan)에 올려놓고, 그 위에 3 cm 크기의 담배 잎을 취하여 잎 뒷면이 위를 향하게 하여 올려놓았다. DNA는 금 입자(gold particle, 0.6 μ m)에 코팅하여 particle delivery system (PDS 1000/He, Bio-Rad, USA)과 1,100 psi (7,580 MPa) rupture disk를 사용하여 9 cm 높이에서 밤바드먼트를 시행하였다. 밤바드먼트 후 담배 잎을 48시간 동안 딤 라이트(dim light) 조건에 둔 다음 5×5 mm로 잘라서 1 mg/L 벤질아데닌(BA) 및 0.1 mg/L 나프탈렌아세트산(NAA), 500 mg/L 스펙티노마이신(spectinomycin)이 포함된 MS 배지(신초 선발 배지)에 치상하였다. 약 4-6주 후 형질전환된 세포로부터 발생된 신초의 잎을 잘게 잘라 동일 배지에 치상 한 후 3번의 반복 선발과정(라운딩 과정)을 거쳐 재분화된 식물체는, 호르몬이 첨가되지 않은 MS 선발 배지에 옮겨 뿌리를 발생시킨 후 순화과정을 거쳐 피토틨론(Phytotron)의 25°C, 16시간 일장 조건하에서 생육시켰다.

[66]

[67] 서던 및 노던 블롯 분석

[68] 담배 잎에서 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 총 게놈 DNA를 분리하였으며, 게놈 DNA 4 μ g을 BamHI 및 BglII로 잘라 0.8 % 아가로스 겔에서 전기영동한 후, Zeta-프로브 GT Blotting Membrane (Bio-Rad, Hercules, CA)에 10×SSC를 이용하여 옮겼다. 색소체 게놈안의 trnI을 포함하는 BamHI-BglII DNA 절편에 PCR 증폭한 trnA 프로브(P1, 150 bp)를 방사선 동위원소 [α -³²P]dCTP로 라벨링 하여 도입 유전자의 삽입을 확인하였다. 전혼성화(prehybridization) 및 혼성화는 7% (w/v) SDS가 들어가 있는 0.25 M 인산 나트륨 완충액(pH 7.2)을 이용하여 65°C에서 밤새 수행하였으며, 세척 완충액 I(20 mM 인산 나트륨 완충액(pH 7.2) 및 5% SDS)과 세척 완충액 II(20 mM 인산 나트륨 완충액(pH 7.2) 및 1% SDS)로 65°C에서 각각 15분씩 씻어낸 다음, 막(membrane)을 이미지 플레이트(Image plate, Fuji Film)에 3시간 노출시킨 뒤 밴드를 확인하였다.

[69]

총 RNA는 Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 형질전환된 잎으로부터 추출하였다. 총 RNA(2 μ g)를 5.1% (v/v) 포름알데히드가 들어간 1% 아가로스 겔에 전기영동 후, Zeta-probe GT blotting Membrane(Bio-Rad, Hercules, CA)에 RNA를 옮기고 PCR로 증폭한 SbtA 유전자 절편(P2 프로브)에 [α -³²

P]dCTP로 라벨링 하였으며, 혼성화 및 세척 과정은 서던 블롯팅 방법과 동일하였다.

[70]

[71] GFP 발현 관찰

[72] GFP 형광을 관찰하기 위하여 원형질체를 분리하였다. 2주간 흡에서 키운 담배의 잎을 채취하여 표피를 벗겨낸 뒤, 효소 용액(1~1.5% Cellulase R10, 0.2~0.4% Mecerozyme R10, 0.4 M 만니톨, 20 mM MES, pH 5.7 및 0.1% BSA)에 넣고 암 상태로 3~4시간 처리하였다. 분리한 원형질체는 형광현미경을 통해 관찰하였다.

[73]

[74] 내염성 검정 및 형태적 관찰

[75] SySbtA 엽록체 형질전환 담배의 염에 대한 반응을 보기 위하여 T2 종자를 NaCl 0 mM, 25 mM 및 100 mM이 첨가된 MS 배지에 각각 치상한 후, 25°C, 16 시간 광조건으로 배양하여 발아 9일 후 식물체의 뿌리 길이를 조사하였다.

[76]

[77] 식물 생육조건과 생장량 조사

[78] 모든 분석법은 형질전환 T2 식물로 수행하였으며, 대조군 식물체와 형질전환체는 MS 기본배지에 스펙티노마이신 500 mg/L가 들어있는 배지에서 25°C, 16시간 광조건으로 발아시키고 5주 후 흡으로 옮겼으며, 피토틨론 환경(25°C, 16시간 일장)에서 생육하였다. 생장률 분석을 위해 10개의 독립 개체를 일주일 간격으로 초장을 측정하였고, 개화기 때의 식물체를 수확하여 지상부의 생중량 및 건중량을 측정하였으며, 줄기의 직경과 잎의 개수를 조사하였다. 건중량은 70°C에서 10일간 건조시킨 후 측정하였다.

[79]

[80] 엽록소 함량 측정

[81] 엽록소 a 및 b의 함량 측정은 10주 된 담배 잎 100 mg을 채취하여 액체 질소로 얼린 뒤 분쇄하고, 80% 아세톤 1 mL을 첨가하여 암 상태로 20분간 교반하여 상등액을 취하였다. 상기 과정을 3번 반복하여 엽록소를 완전히 분리하였으며, 측정은 spectrophotometer (UV-2450, SHIMADZU Inc., Japan)를 이용하여 645 nm 및 663 nm의 파장에서 실시하였다(Jeong et al., 2002, Plant Physiol 129:112-121).

[82]

[83] 수용성 당 및 전분 함량 측정

[84] 수용성 당 및 전분의 함량을 측정하기 위하여 효소 분석법을 이용하였다 (Stitt et al., 1989, Method Enzymol 174:518-522). 6시간 광적응 된 식물의 잎 0.1 g (FW)을 채취하여 액체 질소로 동결시켜 마쇄한 뒤, 0.5 mL의 킬링(Killing) 용액(2 : 8 = 포름산 : 100% 에탄올)을 넣고 80°C에서 20분간 처리하고, 80% 에탄올 0.5 mL을 첨가한 뒤 다시 80°C에서 20분간 처리하여 추출하였다. 증발기를 이용하여 완전히 건조시킨 뒤, 펠렛을 500 μ L의 증류수에 녹여 풀어준 다음 원심 분리하여

상등액을 취하여 수용성 당을 측정하였다. 전분의 측정은 남아 있는 펠렛을 아밀라제(amylase)와 아밀로글루코시다제(amyloglucosidase)로 가수분해시켜 글루코오스를 측정하였다. 당 및 전분은 UV-Spectrophotometer (UV-2450, SHIMADZU Inc., Japan)를 이용하여 340 nm에서 NADPH의 흡광도를 측정하였다.

[85]

[86] CO₂ 교환 및 CO₂ 보상점 측정

[87] 식물의 잎에서의 기체 교환과 CO₂ 보상점의 측정은 fluorescence chamber head (Li-6400-40 leaf chamber fluorometer; Li-Cor Inc., USA)가 장착된 LI-6400 (Li-Cor Inc., USA)을 이용하였다. 비슷한 시기의 식물체의 성숙한 잎을 선정하였고 IRGA (infra red gas analyzer) leaf chamber의 온도는 25°C, 상대습도는 50±2%로 하였다. CO₂ 농도는 400 µmol CO₂/mol, 광도는 700 µmol/m²/s로 하였다. 광원은 적색 및 푸른색 LED 광원이며, 이산화탄소는 Li-6400 CO₂ 혼합기체를 사용하였다. CO₂ 보상점 조사는 CO₂ 농도를 400 µmol CO₂/mol에서 0 µmol CO₂/mol로 변화시키면서 CO₂ 교환값을 측정하여 값이 0이 되는 지점을 CO₂ 보상점으로 하였다.

[88]

[89] 실시예 1: 엽록체 형질전환 벡터와 형질전환 식물체 확인

[90] 엽록체 형질전환 벡터에는 동형 재조합을 위한 삽입 염기서열 부위인 *trnI*와 *trnA*가 있으며, RclpGAH를 백본(backbone)으로 하여 시네코시스티스 속 PCC 6803에서 찾아낸 표적 유전자인 *SbtA* 유전자와 함께 스펙티노마이신 저항성 선발 마커인 *aadA* 유전자 및 GFP 리포터 유전자를 사용하였으며, 벼에서 찾아낸 *clp* 프로모터 및 대장균의 *rrnB1/B2* 터미네이터를 사용하였다(도 1).

[91]

형질전환된 3개의 T0 독립 라인을 얻었으며, T0 식물체에서 받은 T1 종자를 스펙티노마이신 배지에 발아시켜 선발하였고, 서던 및 노던 블롯 분석 결과 T1 식물체에서도 도입된 유전자가 발현됨을 확인하였으며, 동형(homoplasmic) 라인을 얻기 위하여 다시 한 번 세대 진전시켜 T2 세대를 대상으로 이후 실험을 진행하였다. T2 식물체를 대상으로 *trnA* probe를 이용하여 서던 블롯 분석을 수행한 결과 3개의 독립적인 엽록체 형질전환체 모두 약 4.5 kb 크기의 밴드가 검출되었고, 벡터 대조군에서는 약 3.3 kb 크기의 밴드가 검출되었으며 야생형에서는 0.88 kb의 밴드가 검출되었다(도 2). 상기 결과는 형질전환 식물체의 엽록체 게놈에 목적 유전자인 *SbtA* 유전자가 동형(homoplasmic) 상태로 도입되고 다음 세대로 유전되었음을 의미한다(도 2A). 또한 노던 블롯 분석을 위하여 *SbtA* 프로브 (P2)를 사용하였으며, 벡터 대조구를 제외한 모든 라인에서 *SbtA* 유전자가 발현하는 것을 확인하였다(도 2B).

[92]

[93] 실시예 2: 담배 형질전환 식물체의 GFP 발현

[94] 도입된 GFP 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 야생형, 벡터 대조군 및

SySbtA 4번 라인을 대상으로 식물체 잎으로부터 원형질체를 분리하여 세포수준에서 관찰한 결과, 표지 유전자인 GFP가 식물 엽록체 내에서 발현하는 것을 UV 형광으로 확인하였다(도 3).

[95]

[96] 실시예 3: SySbtA 식물체의 내염성 검정 및 표현형 분석

[97] SySbtA형질전환 식물체의 내염성을 알아보기 위하여, 염에 대한 반응을 조사하였다. T2 종자를 각각 NaCl 0 mM, 25 mM 및 100 mM이 첨가된 배지에 치상하여 9일 후 뿌리 발달을 관찰하였다. NaCl을 첨가하지 않은 배지 즉, 일반 조건에서 SySbtA 식물체는 원뿌리의 뿌리생장이 빨랐으며, 반면 벡터 대조군은 뿌리생장이 느리고 측뿌리가 발달한 것을 볼 수 있었다(도 4A). 일반 조건인 NaCl이 첨가되지 않은 상태에서의 뿌리의 형태가 서로 다르기 때문에, 이를 보정하기 위해서 이때의 뿌리의 길이를 100으로 하여 NaCl을 첨가하였을 때의 뿌리생장을 상대적인 수치로 표현하였다. 그 결과 벡터 대조군에서는 NaCl의 농도가 증가할수록 뿌리생장이 감소하였고, SySbtA 식물체에서는 NaCl 25 mM일 때 오히려 뿌리생장이 11~38% 증가하였으며, NaCl 100 mM일 때에는 뿌리길이가 감소하였지만 SySbtA 식물체가 벡터 대조구에 비하여 내성이 증가된 것을 알 수 있었다(도 4B).

[98]

[99] 실시예 4: SySbtA 식물체의 생리적 특징과 성장량

[100] 파종된 SySbtA T2 식물체들은 피토틨 환경에서 키웠으며, 식물체의 초장, 엽수, 줄기의 직경, 생중량 및 건중량을 측정하였다. SySbtA는 대조군에 비해 흙으로 옮긴 후부터 빠르게 성장하였으며 13주부터 개화가 시작되었다(도 5). 개화기 때의 초장을 비교해 본 결과 SySbtA 식물체가 50% 정도 성장률이 높게 조사되었다(도 6A). 개화기 때의 생중량과 건중량을 비교해 본 결과, 생중량은 SySbtA가 36~50% 높았고, 특히 건중량은 50% 이상 높아졌으며 1번 라인의 경우 두 배 이상 높아진 것을 볼 수 있었다(도 6B 및 6C). 엽수 또한 SySbtA 식물체가 14~24% 많은 것으로 조사되었고(도 7A), 줄기의 직경도 6~9% 증가한 것을 볼 수 있었다(도 7B).

[101] 엽록소 함량에 있어서 SySbtA 식물체는 벡터 대조군에 비하여 총 엽록소 함량이 45-84% 증가하였으며, 엽록소 a/b 비율에는 별다른 변화를 보이지 않았다(도 8).

[102]

[103] 실시예 5: SySbtA 형질전환 식물체의 광합성 효율과 CO₂ 보상점

[104] 담배의 엽록체에 직접적으로 *SbtA*를 도입시켰을 때 식물의 성장과 바이오매스가 증가되었으므로 광합성 효율에는 어떠한 변화가 있는지를 확인하기 위해 Phytotron에서 9주 생육된 T2 형질전환 식물체의 손상되지 않은 성숙된 잎을 사용하여 CO₂ 동화율을 측정하였다. 엽육세포 내의 CO₂ 농도(Ci)에 따른 CO₂ 동화율(A/Ci response curve)을 측정하기 위하여 광도를 700 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 로

고정하고 CO₂ 농도를 0-2100 $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol}$ 까지 변화시키면서 측정하였다. 측정 결과 벡터 대조군에 비하여 SySbtA 식물체가 광합성 효율이 높게 나타났다(도 9).

- [105] 한편 CO₂ 보상점은 CO₂ 교환이 0이 되는 시점, 즉 식물이 살아갈 수 있는데 필요한 최소한의 CO₂ 환경이므로 CO₂ 보상점이 낮을수록 저농도의 CO₂ 환경에서도 식물이 CO₂를 효율적으로 이용하여 적응할 수 있는 능력이 커진 것을 의미한다. CO₂ 보상점을 조사한 결과 SySbtA 1번 라인 및 4번 라인이 벡터 대조군에 비하여 각각 12-16% 낮았다(도 10). 이 결과는 상기 Ci-곡선(Ci-curve)과 상응하는 결과이며 SySbtA 식물체가 CO₂ 이용 효율이 증가된 것을 알 수 있었다.

[106]

- [107] 실시예 6: SySbtA 형질전환 식물체의 수용성 당 및 전분 함량의 변화

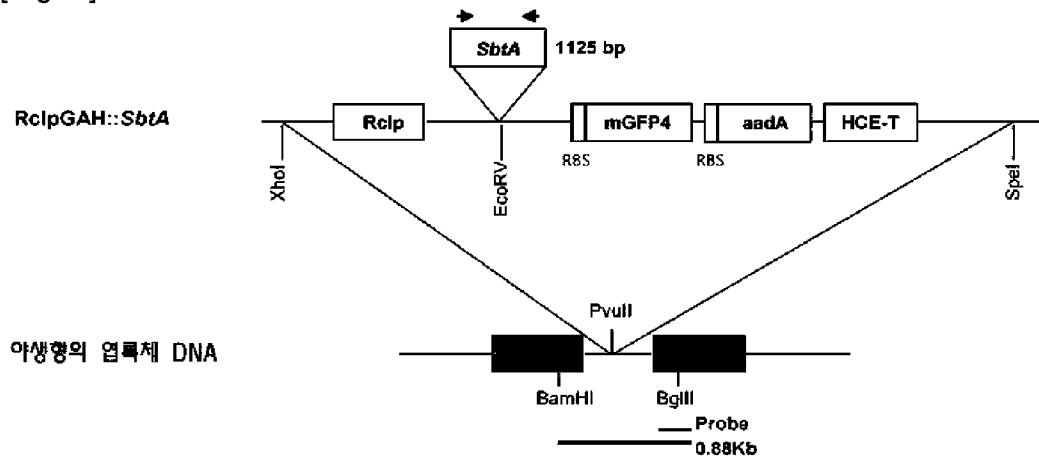
- [108] SySbtA 식물체의 증가된 CO₂ 동화율이 탄수화물의 생합성에 영향을 주는지 알아보기 위해 SySbtA 식물체의 탄수화물 함량 분석을 위해 정오에 채취한 담배 잎에서의 수용성 당 및 전분의 함량을 측정하였다. 그 결과 수용성 당의 경우 프룩토오스는 벡터 대조군과 SySbtA 형질전환 식물체가 유사한 수준이었으나 글루코오스는 소폭 증가하였으며, 수크로오스의 경우에는 함량이 124-189%로 대폭 증가하였다(도 11). 상기 수용성 당 함량의 증가는 CO₂ 동화작용이 증가됨으로써 탄소대사 산물인 글루코오스 및 수크로오스 합성을 증가시켰을 것으로 생각된다.

청구범위

- [청구항 1] 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *SbtA* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 내염성을 증가시키는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 *SbtA* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및
상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 내염성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 *SbtA* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제3항의 방법에 의해 제조된 내염성이 증가된 형질전환 식물체.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 쌍자엽 식물은 담배인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.
- [청구항 8] 제5항에 따른 식물체의 종자.
- [청구항 9] 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래의 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는, 식물체의 내염성 증가용 조성물.
- [청구항 10] 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *SbtA* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 바이오매스를 증가시키는 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 *SbtA* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및
상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 바이오매스가 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 *SbtA* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

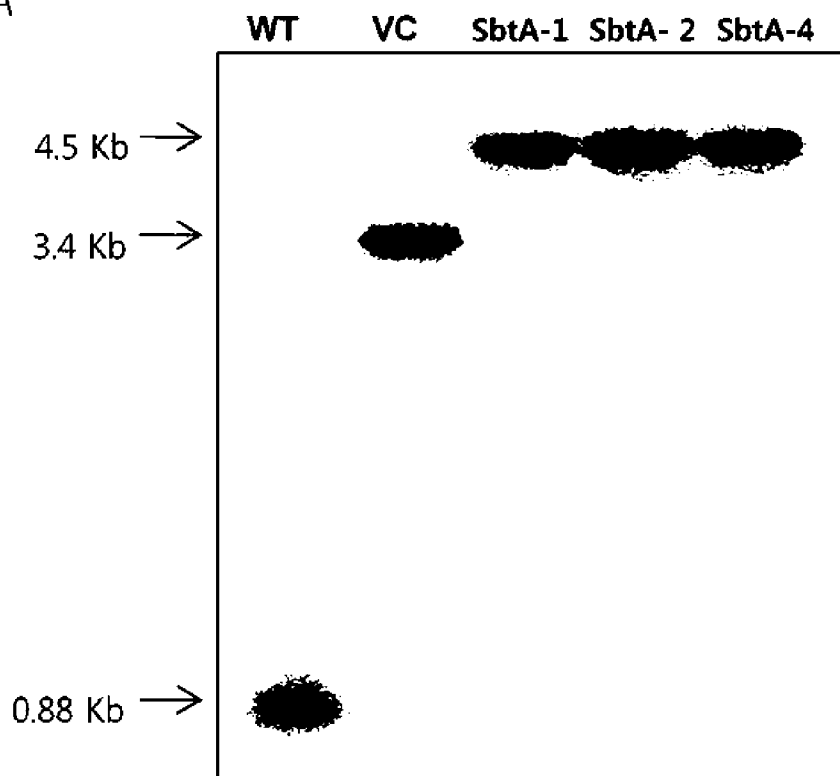
- [청구항 14] 제12항의 방법에 의해 제조된 바이오매스가 증가된 형질전환 식물체.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 쌍자엽 식물은 담배인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.
- [청구항 17] 제14항에 따른 식물체의 종자.
- [청구항 18] 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.) PCC6803 유래의 *SbtA* (Sodium dependent bicarbonate transporter) 유전자를 포함하는, 식물체의 바이오매스 증가용 조성물.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

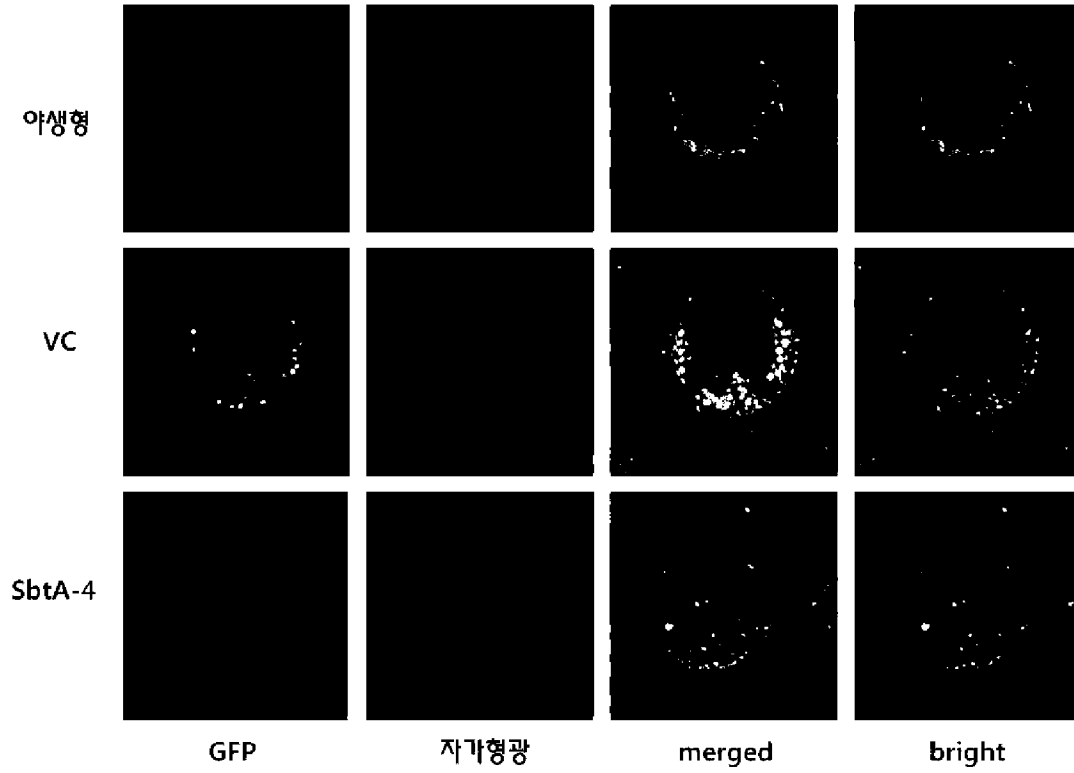
A



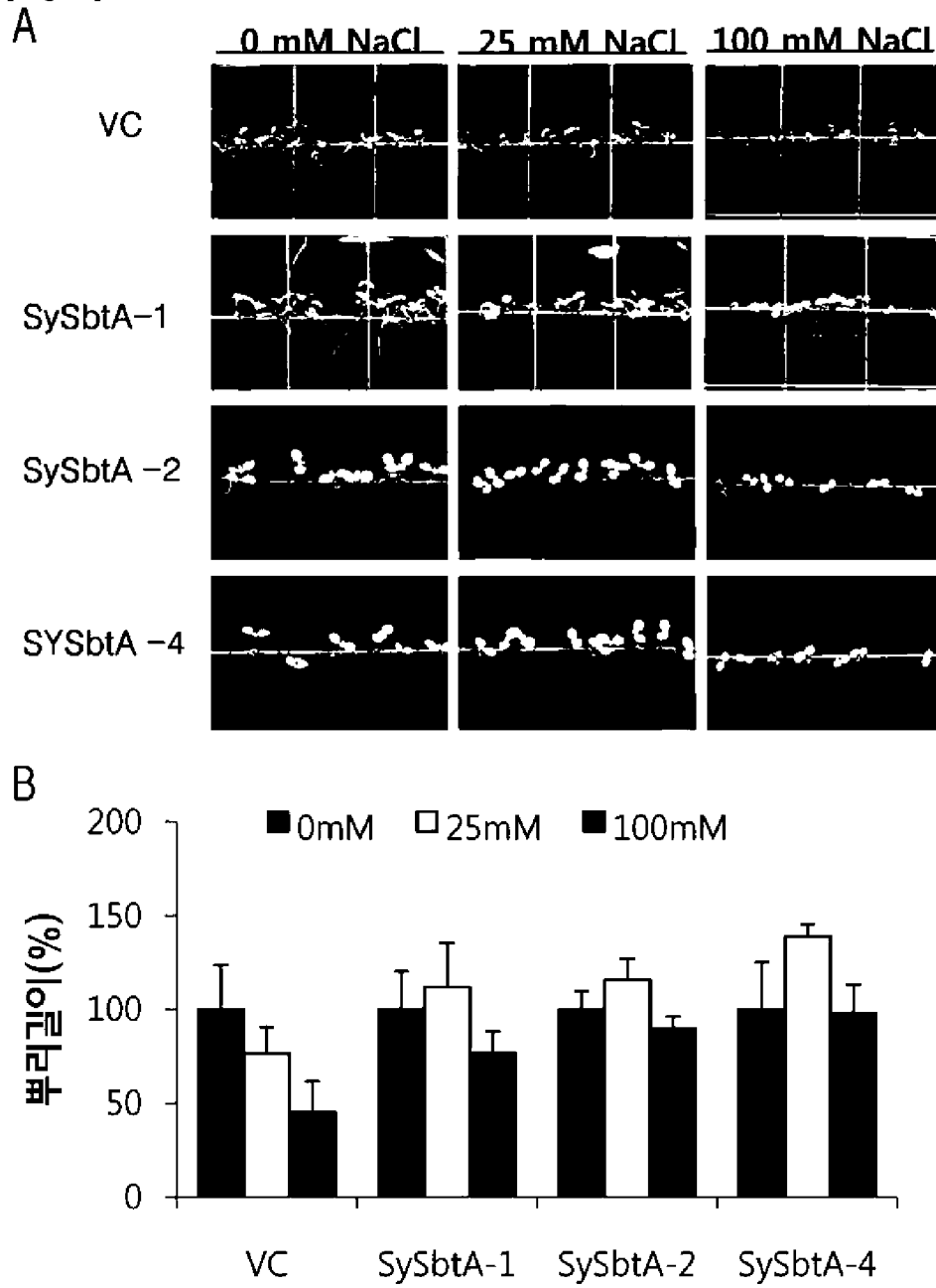
B



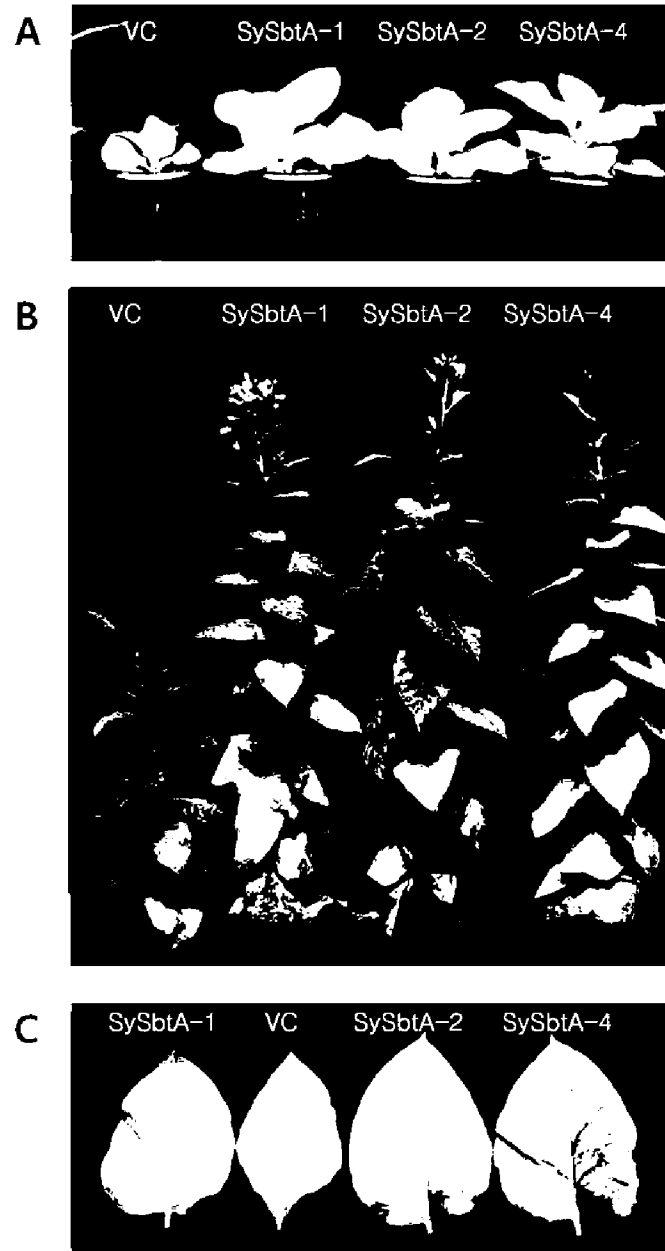
[Fig. 3]



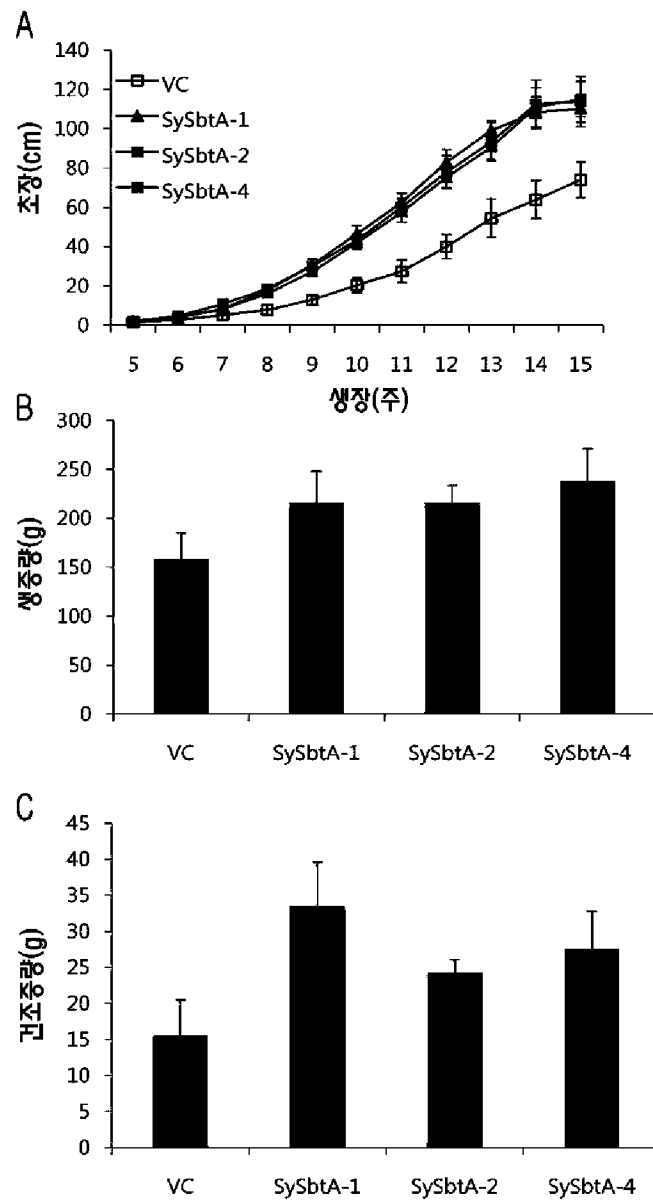
[Fig. 4]



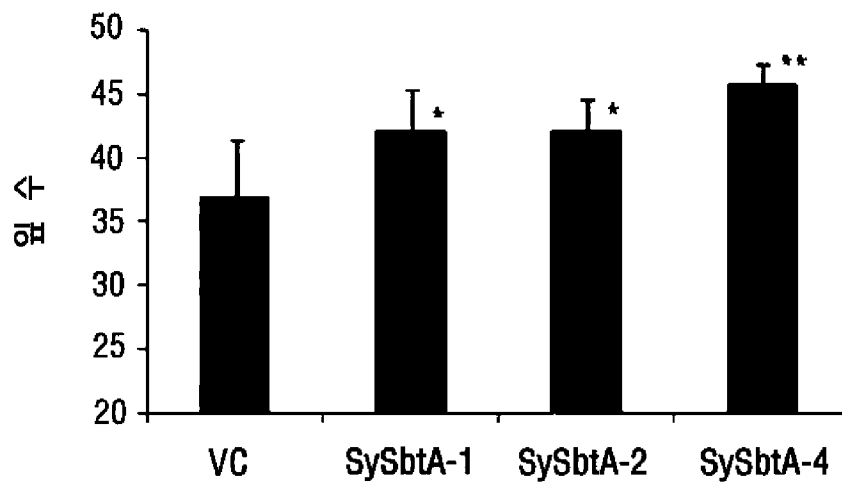
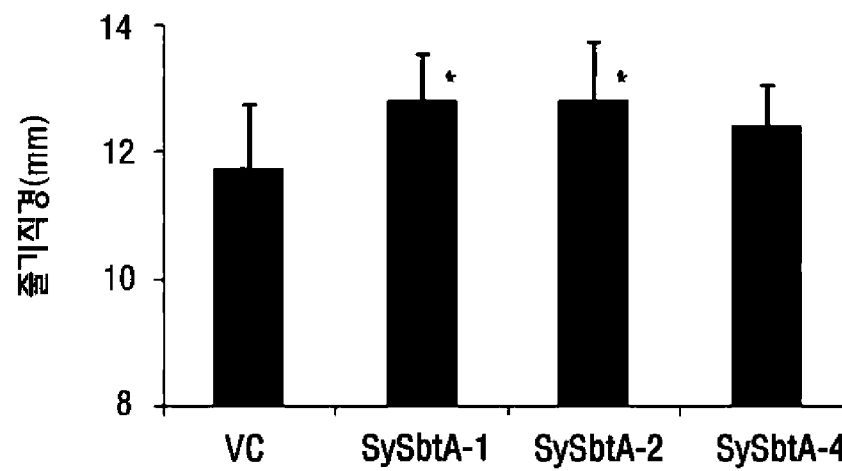
[Fig. 5]



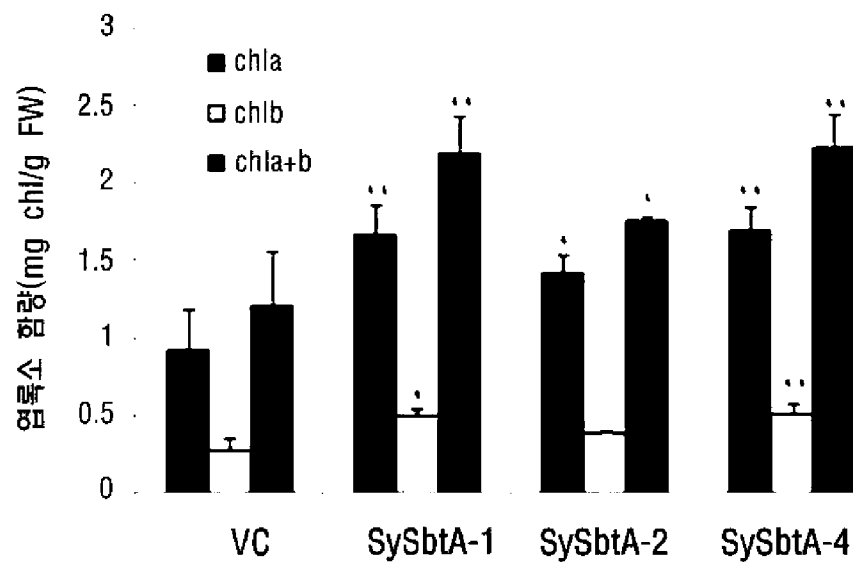
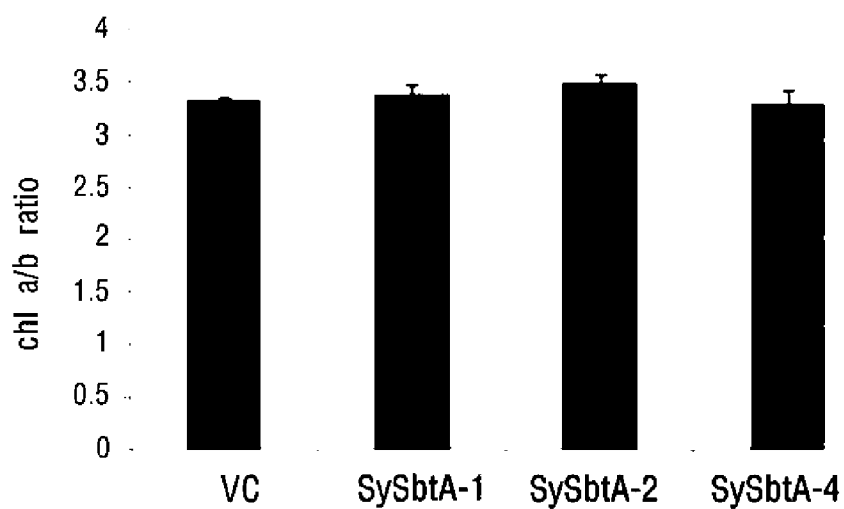
[Fig. 6]



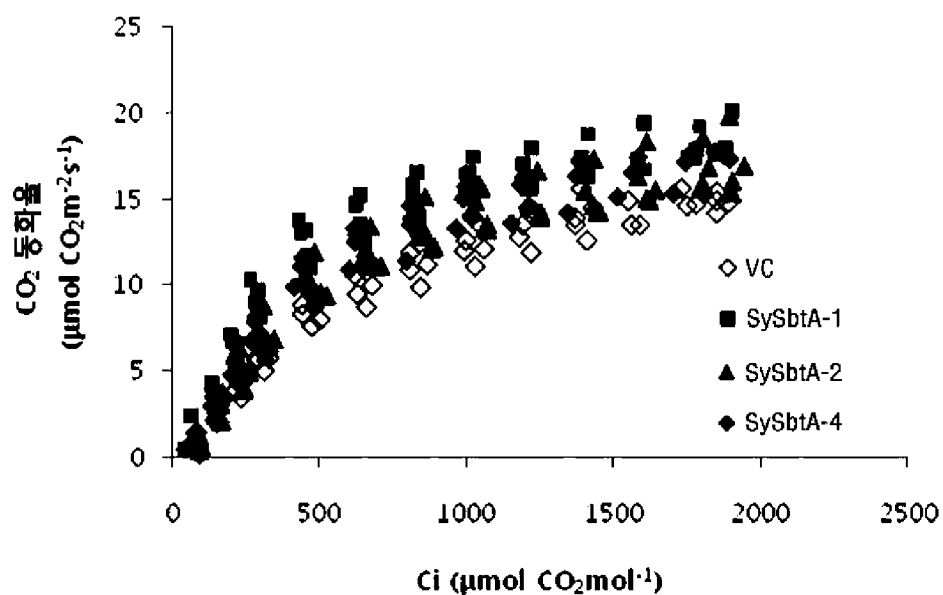
[Fig. 7]

A**B**

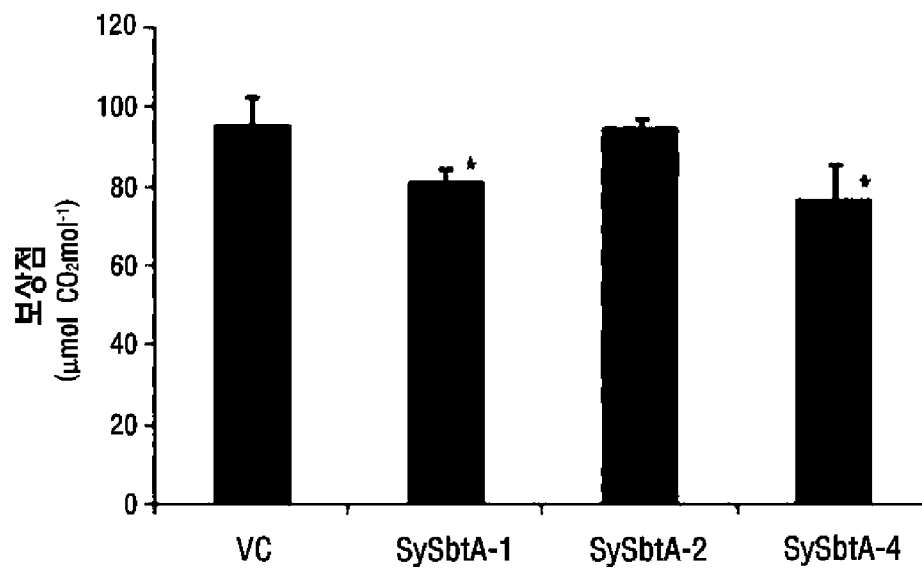
[Fig. 8]

A**B**

[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

