



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0087489
(43) 공개일자 2016년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8257 (2013.01)
A01H 5/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0006404
(22) 출원일자 2015년01월13일
심사청구일자 2016년01월12일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
고재홍
경기도 수원시 영통구 영통로154번길 51-16 306동 702호 (망포동, 센트럴하이츠아파트)
원반팜
경기도 용인시 기흥구 서그대로16번길 17 (서천동)
최영임
경기도 수원시 영통구 청명로 132 324동 601호 (영통동, 청명마을3단지아파트)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 15 항

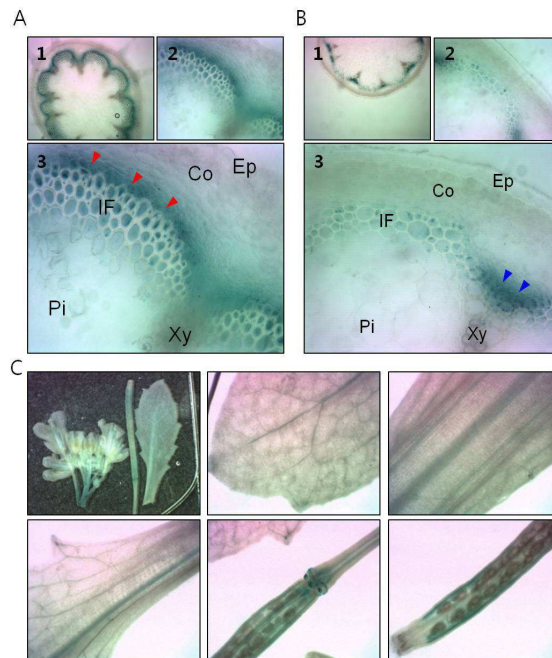
(54) 발명의 명칭 **형성층 특이적 프로모터 및 이의 활용**

(57) 요약

본 발명은 식물체의 형성층 특이적 프로모터, 상기 프로모터 및 이에 작동 가능하게 연결된 목적 유전자를 포함하는, 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 카세트, 상기 발현 카세트를 포함하는 재조합 발현 벡터, 상기 발현 벡터를 포함하는 세균 및 상기 발현벡터에 의해 형질전환된 식물체에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 재

(뒷면에 계속)

대표도 - 도7



조합 발현 벡터를 이용한, 형성층 특이적으로 목적 유전자를 발현하는 형질전환 식물체의 제조방법, 상기 형질전환 식물체에서 목적 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 프로모터 및 게이트웨이(gateway) 카세트를 포함하는, 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 카세트 제조를 위한 목적 유전자 도입용 카세트, 상기 도입용 카세트를 포함하는 목적 유전자 도입용 벡터, 및 상기 도입용 벡터를 이용하여 목적 유전자의 형성층 특이적 발현 벡터를 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 식물체 형성층 특이적 프로모터는 식물의 발달단계와 외적 및 내적인 환경 스트레스에 좌우되지 않고 일정한 형성층 조직-특이성 및 강력한 발현을 유도할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/8205 (2013.01)

C12N 2830/008 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S111214L080110

부처명 산림청

연구관리전문기관 산림청

연구사업명 산림과학기술개발사업

연구과제명 포플러 슈퍼클론 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2014.04.15 ~ 2015.04.14

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 식물체의 형성층 특이적 프로모터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 이에 작동 가능하게 연결된 목적 유전자를 형성층(cambium) 특이적으로 발현시키는 것인 프로모터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 식물체는 포플러 또는 애기장대인 것인 프로모터.

청구항 4

제1항의 프로모터 및 이에 작동 가능하게 연결된 목적 유전자를 포함하는, 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 카세트.

청구항 5

제1항의 프로모터 및 게이트웨이(gateway) 카세트를 포함하는, 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 카세트 제조를 위한 목적 유전자 도입용 카세트.

청구항 6

제4항의 발현 카세트를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 7

제5항의 목적 유전자 도입용 카세트를 포함하는 목적 유전자 도입용 벡터.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 벡터는 pK2GW7,0, pB2GW7,0, pKGWFS7,0 또는 pBGWFS7,0을 기본 골격(backbone)으로 하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 9

제6항의 재조합 발현 벡터를 포함하는 세균.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 세균은 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)인 것을 특징으로 하는 세균.

청구항 11

제6항의 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 12

제11항에 있어서 상기 식물체는 포플러 또는 애기장대인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 13

제7항의 목적 유전자 도입용 벡터의 게이트웨이 카세트에, 위치 특이적 재조합(site specific recombination)을 이용하여 목적 유전자를 도입하는 단계를 포함하는, 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 벡터의 제조방법.

청구항 14

제6항의 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 형성층 특이적으로 목적 유전자를 발현하는 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 15

- 1) 제6항의 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및
- 2) 상기 형질전환된 식물체의 형성층(cambium) 조직 내에서 목적 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 식물체의 형성층 특이적 프로모터, 상기 프로모터 및 이에 작동 가능하게 연결된 목적 유전자를 포함하는, 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 카세트, 상기 발현 카세트를 포함하는 재조합 발현 벡터, 상기 발현 벡터를 포함하는 세균, 및 상기 발현벡터에 의해 형질전환된 식물체에 관한 것이다.
- [0002] 또한 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터를 이용한, 형성층 특이적으로 목적 유전자를 발현하는 형질전환 식물체의 제조방법, 및 상기 형질전환 식물체에서 목적 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [0003] 또한 본 발명은 상기 프로모터 및 게이트웨이(gateway) 카세트를 포함하는, 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 카세트 제조를 위한 목적 유전자 도입용 카세트, 상기 도입용 카세트를 포함하는 목적 유전자 도입용 벡터, 및 상기 도입용 벡터를 이용하여 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 벡터를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0004] 관다발 형성층(vascular cambium)은 줄기세포(stem cell)로 이루어진 분열조직(meristem)으로 세포 사이의 위치신호를 인지해서 줄기 바깥쪽 방향은 체관부로 분화하고 안쪽은 도관부(목질부)로 분화한다. 초본식물과 달리 목본식물은 관다발 형성층의 발달로 인해 이차목부(secondary xylem, wood)가 만들어지며 성숙 목질부(mature xylem)가 형성되게 된다. 이렇게 형성된 목질부는 지구상에 생성되는 전체 바이오매스의 90% 이상을 차지한다. 따라서 형성층은 지구상에 존재하는 바이오매스의 근원이라고 할 수 있다.
- [0005] 한편, 생명공학을 이용한 형질전환 식물체 개발 기술은 작물에 유용한 형질을 새롭게 도입할 수 있어서 매우 중요하며, 이때 유용 형질을 결정하는 유전자의 발현 양상은 특정 프로모터에 의해 조절된다. 유전자의 전사 개시점(transcription initiation point)의 상류(upstream)에 위치하고, 해당 유전자의 전사 개시와 빈도 등 발현 정도와 패턴을 결정하는 DNA 영역을 일반적으로 프로모터라 하며, 프로모터에 의한 전사 개시는, RNA 중합효소, RNA 중합효소를 활성화하는 특정 전사조절 인자(transcription factor)들과 기본적인 전사 복합체(basal transcription complex)가 함께 프로모터 뉴클레오티드 서열에 결합함으로써 이루어진다.
- [0006] 콜리플라워(Cauliflower) 모자이크 바이러스에서 유래한 35S 프로모터는 식물의 모든 조직에서 항상적으로 유전자를 발현시키는 프로모터로서, 식물 형질전환에서 가장 많이 사용되고 있다. 그러나 이 35S 프로모터를 사용하여 외래 유용 유전자를 모든 조직에서 항상적으로 발현시키는 경우, 종종 식물의 비정상적인 생장을 유발할 수 있음이 잘 알려져 있다. 따라서 외래 유용 유전자를 목적에 따라 발현을 조절할 수 있는 즉, 조직, 발달단계, 또는 환경 특이적으로 유전자를 발현시킬 수 있는 기술이 절실하다.
- [0007] 본 발명은 식물 바이오매스 증가에 결정적인 역할을 하는 형성층 분열조직 특이적으로 원하는 단백질(세포분열 증가, 도관형성 관련 등)을 발현시킬 수 있는 도구로 사용될 것이며, 이를 통해 바이오매스 증가, 바이오매스의 질적 변환을 달성할 수 있는 형질전환 식물체 개발에 사용될 수 있어, 바이오연료(에탄올, 목재펠릿) 제조 산업 뿐 아니라 펄프 및 제지 산업, 원료 목재 산업 등에 사업화가 전망된다(Plant Molecular Biology, 52: 317-329, 2003; 미국공개특허 제2009-0229016호).
- [0008] 이에 본 발명자들은 형성층에서 특이적으로 발현할 수 있는 발현 시스템을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 포플러에서 형성층 특이적으로 발현되는 PtrCam1 유전자의 프로모터를 동정하였으며, 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 애기장대에 도입하여 형질전환 식물체에서 형성층 특이적 유전자 발현을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다. 이에 따라, 본 발명의 PtrCam1 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 이용하여 원하는 유전자를 식물체의 형성층에 특이적으로 발현시킬 수 있으므로, 본 발명은 도입되는 목적 유전자에 따라 다양한 목적으로 바이오연료 제조산업, 펄프 및 제지 산업 및 원료 목재 산업 등에 광범위하게 이용될 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 하나의 목적은 식물체의 형성층 특이적 프로모터를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 프로모터 및 이에 작동 가능하게 연결된 목적 유전자를 포함하는, 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 카세트를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프로모터 및 게이트웨이 카세트를 포함하는, 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 카세트 제조를 위한 목적 유전자 도입용 카세트를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현 카세트를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 도입용 카세트를 포함하는 목적 유전자 도입용 벡터를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 발현 벡터를 포함하는 세균을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 목적 유전자 도입용 벡터를 이용하여, 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 벡터를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 발현 벡터를 이용한, 형성층 특이적으로 목적 유전자를 발현하는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 식물체에서 목적 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서, 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 식물체의 형성층 특이적 프로모터를 제공한다.

[0020] 본 발명에서 용어, "형성층"이란, 물관부와 체관부 사이에 있는 한 층의 살아있는 세포층으로 이루어져 있는 조직을 말하며, 부피생장이 일어나는 곳으로 부름켜라고도 한다. 외떡잎식물은 관다발 내에 형성층이 존재하지 않는데, 우리가 풀이라고 알고 있는 초본류는 대체로 외떡잎식물에 속하는 것들로 이들은 관다발 내 형성층이 없어 가늘고 잘 휘어지는 성질을 갖는다. 이에 비해 겉씨식물과 속씨식물 중 쌍떡잎 식물에 속하는 목본류는 물관과 체관 사이에 형성층이 있어서 세포분열이 활발히 일어나 굵어지고 비대해진다. 형성층에서는 봄부터 여름까지 세포분열이 활발하게 이루어져서 크기가 크고 연한 세포들이 생성된다. 반면에 가을부터는 갑자기 분열속도가 느려져 크기가 작고 단단한 세포들이 생성된다. 이 두가지 세포들이 줄기 내에 겹겹이 교차되면서 나이트를 형성한다.

[0021] 본 발명에서 용어, "형성층 특이적"이란, 다른 조직에 비해 형성층에서 유전자 발현 수준이 높은 것을 의미하며, 유전자가 다른 조직에서는 발현 수준이 낮으나 형성층에서는 상대적으로 높게 발현되는 것일 수 있고, 바람직하게는 다른 조직에서는 유전자가 발현되지 않고 형성층에서만 발현되는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명에서의 용어, "프로모터(promoter)"란, 일반적으로 전사를 개시하는 지점을 포함하는 암호화 부위의 상류 쪽에 위치하는 유전자 부위로, 흔히 유전자 발현을 조절하는 TATA 박스, CAAT 박스 부위, 외부 자극에 반응하여 유전자 발현에 영향을 주는 부위 및 위치와 방향에 상관없이 거의 모든 유전자 발현을 촉진하는 인핸서 등으로 이루어져 있다. 또한, 이러한 프로모터 중에는 모든 조직에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터 및 시간 또는 위치 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터가 있으며, 구체적으로 본 발명에 따른 프로모터는 식물에서 형성층 특이적으로 발현하는 PtrCam1 프로모터이다.

[0023] 상기 PtrCam1 프로모터는 본 발명자들이 포플러에서 동정한 프로모터로서, 형성층 조직에 특이적임과 동시에 형성층에서 특이적으로 발현되기를 원하는 목적 유전자의 발현을 크게 증가시킬 수 있다. 구체적으로 상기 PtrCam1 프로모터는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드일 수 있으며, 서열번호 3으로 기재한 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 98% 이상의 유사성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명에서는 먼저 식물체의 형성층에서 특이적으로 발현되는 유전자를 발견하여, 상기 유전자의 프로모터를 동정하였으며, 상기 프로모터 서열 및 프로모터 하류(downstream)에 작동 가능하도록 연결된 목적 유전자의 서열이 포함된 재조합 발현 벡터를 제작하고, 이를 통해 형질전환된 식물 형질전환체에서 형성층 특이적으로 목적 유전자가 발현되는 것을 확인함으로써 발명을 완성하였다.

[0025] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 포플러 유래의 Potri.T098800.1 유전자(도 5, 서열번호 1 및 서열번호 2)가 포플러의 형성층 특이적으로 발현되는 것을 확인하고(도 1 내지 도 4), 상기 유전자의 상류에 위치하는 형성층 특이적 프로모터(PtrCam1 promoter)의 서열(서열번호 3)을 동정하였다. 상기 PtrCam1 프로모터는 하류(downstream)에 위치한 목적 유전자를 식물체의 형성층 특이적으로 발현시킬 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 구체적인 일 실시예에서는 상기 PtrCam1 프로모터 서열(서열번호 3) 및 GUS 리포터 유전자를 포함하는 PtrCam1::GUS 발현 벡터를 이용하여 형질전환 애기장대를 제조하였고, 상기 형질전환 애기장대의 모든 기관에서 형성층 특이적으로 GUS가 발현되는 것을 확인하였으며(도 7 및 도 8), 이러한 형성층 특이적인 유전자 발현은 식물체의 발달 단계(도 9) 또는 식물체의 내·외부 스트레스(도 10 및 도 11)에 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 식물체 형성층 특이적 프로모터는 목적에 따라 원하는 유전자를 식물체의 형성층 특이적으로 발현시키는데 유용하게 이용될 수 있다.

[0027] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 프로모터 및 이에 작동 가능하게 연결된 목적 유전자를 포함하는, 목적 유

전자의 식물체 형성층 특이적 발현 카세트(cassette)를 제공한다.

- [0028] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 프로모터 및 게이트웨이(gateway) 카세트를 포함하는 목적 유전자의 식물체 형성층 특이적 발현 카세트 제조를 위한 목적 유전자 도입용 카세트를 제공한다.
- [0029] 프로모터 및 식물체의 형성층 특이적 유전자 발현에 대하여는 상기 설명한 바와 같다.
- [0030] 본 발명에서 "작동 가능하게 연결된"이라는 용어는 숙주 세포 내에서 숙주 세포의 작용에 의해 조절 요소들이 인코딩 서열의 발현을 지시할 수 있도록 하는 배치(들)로 코딩 서열에 대한 전사 및 임의의 번역 조절 요소들이 인코딩 서열에 공유 부착된 임의 구조를 나타낸다.
- [0031] 본 발명에서 용어, "카세트"는 특정 유전자가 뉴클레오티드 서열에 존재하는 하나 이상의 조절 서열들에 작동 가능하게 연결되도록 삽입되는 경우 삽입된 유전자를 발현할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 따라서, "발현 카세트"는 목적 유전자를 포함할 수 있으며 본 발명의 발현 카세트들은 형성층 특이적으로 목적 유전자들의 발현을 촉진하는데 유용하다. 또한, 본 발명의 카세트는 목적 유전자를 용이하게 도입할 수 있도록 게이트웨이(gateway) 카세트 서열을 포함할 수 있다. 이러한 카세트는 본 발명에 따르면 "도입용 카세트"를 나타낸다.
- [0032] 본 발명에 따르면, 상기 카세트는 PtrCam1 프로모터 및 이에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 단백질을 인코딩하는 목적 유전자를 포함할 수 있다. 또한 하나의 프로모터 또는 동일한 수 개의 프로모터가 세포 내에서 단백질을 인코딩하는 둘 이상의(즉, 상이한) 유전자들에 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서, 용어 "목적 유전자"는 세포 내에서 목적 단백질을 생산하기 위하여 도입될 수 있으며 상기 목적 단백질을 인코딩하는 유전자를 의미한다. 상기 목적 유전자 또는 목적 단백질은 형질전환 식물체에서 활용하고자 하는 목적에 따라 달라질 수 있으며, 식물체 내에서 발현될 수 있는 유전자 또는 단백질이라면 어떠한 것이라도 무방하다. 즉, 본 발명의 특징은 식물체의 형성층 특이적 발현 프로모터에 있으므로 목적 유전자 또는 목적 단백질은 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 목적 단백질은 기준 세포(야생형 세포)에 비해 더 많은 정도로 발현되며, 바람직하게는 형성층에서 특이적으로 발현될 수 있다.
- [0034] 한편, 상기 게이트웨이 발현 시스템은 엔트리벡터와 목적벡터로 구성되며, 구체적으로 상기 엔트리벡터는 목적 유전자의 양말단에 attL1, attL2를 갖는 벡터이며, 목적벡터는 attR1, attR2를 포함하는 벡터이다. 상기 엔트리벡터와 상기 목적 벡터는 재조합효소에 의해 LR 반응을 일으키며, 목적벡터의 attR1과 attR2를 엔트리벡터의 attL1과 attL2로 치환하게 된다. 이 과정에서 엔트리벡터에 포함되어 있던 목적 유전자가 목적벡터로 전달되게 된다.
- [0035] 본 발명에 있어서, "게이트웨이 카세트"는 목적 유전자 도입용 벡터를 제조할 수 있는 카세트로서, 제조하거나 시판되는 것을 이용할 수 있다. 특히 attR1, ccdB 및 attR2 서열을 포함하는 카세트일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 게이트웨이 카세트 중 시판되는 "attR1-CmR-ccdB-attR2" 카세트는 재조합(recombination)되는 25bp의 서열(attR1, attR2), 클로람페니콜 저항 유전자(CmR), 독소유전자(ccdB; clever gene, F plasmid의 유전자로서 독소로서 작용하는 유전자이다. 따라서 ccdB에 의해 죽지 않는 특수한 박테리아를 사용하여 증폭하고 필요없을시 일반 박테리아로 ccdB를 가지는 박테리아를 죽일 수 있게 만든다)로 이루어진다.
- [0037] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 도 6에서 보이는 바와 같이, PtrCam1 프로모터의 형성층 특이적 유전자 발현을 확인하기 위하여 카나마이신(kanamycin) 또는 바스타(basta) 저항성 유전자, PtrCam1 프로모터, EGFP 및 GUS 리포터 유전자를 포함하는 발현 카세트를 제조하였다. 또한 도 12에서 보이는 바와 같이 목적유전자를 쉽게 도입할 수 있도록 카나마이신 또는 바스타 저항성 유전자, PtrCam1 프로모터 및 게이트웨이 카세트를 포함하는 목적 유전자 도입용 카세트를 제조하였다.
- [0038] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 발현 카세트를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0039] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 도입용 카세트를 포함하는 목적 유전자 도입용 벡터를 제공한다.
- [0040] 발현 카세트 및 도입용 카세트는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0041] 상기 재조합 발현 벡터는 상기 발현 카세트를 포함하여 식물체에 도입되어 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 생산할 수 있는 벡터이며, 구체적으로는 형질전환 식물체의 형성층 특이적으로 목적 유전자가 코딩하는 단백질을

생산할 수 있는 벡터이다. 또한 상기 목적 유전자 도입용 벡터는 상기 도입용 카세트를 포함하여 위치 특이적 재조합(site-specific recombination)을 통해 목적 유전자를 도입하기 용이하게 함으로써 재조합 발현 벡터를 제조할 수 있도록 하는 벡터이다.

- [0042] 상기 발현 벡터 또는 도입용 벡터는 목적 유전자를 도입하여 식물체 내에서 발현시키기 위해 당업계에서 평균적인 기술을 가진 자가 이용할 수 있는 것이라면 어떠한 벡터를 기본 골격(backbone)으로 사용하더라도 무방하며, 이에 제한되지는 않으나 특히 pK2GW7,0, pB2GW7,0, pKGWFS7,0 또는 pBGWFS7,0을 기본 골격으로 하는 것일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 pKGWFS7,0 또는 pBGWFS7,0 벡터에 SacI 및 SpeI 제한효소를 이용하여 PtrCam1 프로모터를 도입함으로써 재조합 발현 벡터인 PtrCam1-pKGWFS7,0 및 PtrCam1-pBGWFS7,0을 제조하였다(도 6). 또한 pK2GW7,0 또는 pB2GW7,0 벡터에 SacI 및 SpeI 제한효소를 이용하여 목적 유전자 도입용 벡터인 PtrCam1-pK2GW7,0 및 PtrCam1-pB2GW7,0을 제조하였다(도 12).
- [0044] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터를 포함하는 세균을 제공한다.
- [0045] 재조합 발현 벡터에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.
- [0046] 상기 세균은 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 형질전환 식물체를 제조할 수 있는 것이라면 모두 사용 가능하며, 바람직하게는 아그로박테리움일 수 있고, 더욱 바람직하게는 아그로박테리움 투메파시언스(*Agrobacterium tumefaciens*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명에서 용어, "아그로박테리움"은 그람양성의 세균으로 식물의 뿌리나 줄기의 상처를 통해 식물세포에 감염되어, 자신이 가지고 있는 유전자를 식물 세포의 유전체에 삽입하여 식물세포의 형질전환을 일으키는 암종 세균의 일종이다.
- [0048] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0049] 재조합 발현 벡터에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0050] 본 발명에서 용어, "형질전환"이란, DNA를 숙주에 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 구체적으로 본 발명에서는 상기 재조합 발현 벡터를 숙주에 도입하는 것을 의미할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 용어, "식물체"는 형성층 특이적으로 목적 유전자를 발현시키기 위해 선택되는 것으로 세포벽이 있고 엽록소가 있어 독립영양으로 광합성을 하는 생물이라면 식물체의 종에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, "형질전환 식물체"는 숙주로서 상기 식물체를 사용하여 형질전환시킨 식물체를 의미한다.
- [0052] 본 발명에서 숙주세포로의 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떠한 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 식물에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이러한 방법에는 전기충격 핵산분자 전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘 침전, 염화칼슘 침전, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반, 아그로박테리아로 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트 리포벡터 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나, 이로 제한되지 않으며, 아그로박테리아로 매개된 형질전환법이 바람직하다.
- [0053] 또한, 구체적으로 본 발명에 따른 형질전환 식물은 상기 PtrCam1 프로모터 및 목적 유전자가 도입되어 발현될 수 있는 식물이라면, 초본 및 목본 식물 모두 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0054] 또한, 구체적으로 초본 식물은 오리자 사티바(*Oryza Sativa*; 벼), 제아 메이즈(*Zea mays*; 옥수수), 미스칸투스(*Miscanthus*) 종 또는 페니세툼 폴푸레움(*Pennisetum purpureum*) 등일 수 있으며, 목본 식물은 유칼립투스(*Eucalyptus*) 종(예를 들면 *E. alba*, *E. albens*, *E. amygdalina*, *E. aromaphloia*, *E. baileyana*, *E. balladoniensis*, *E. bicostata*, *E. botryoides*, *E. brachyandra*, *E. brassiana*, *E. brevistylis*, *E. brockwayi*, *E. camaldulensis*, *E. ceracea*, *E. cloeziana*, *E. coccifera*, *E. cordata*, *E. cornuta*, *E. corticosa*, *E. crebra*, *E. croajingoleisis*, *E. curtisii*, *E. dalrympleana*, *E. deglupta*, *E. delegatensis*, *E. delicata*, *E. diversicolor*, *E. diversifolia*, *E. dives*, *E. dolichocarpa*, *E. dundasii*, *E. dunnii*, *E. elata*, *E. erythrociys*, *E. erythrophloia*, *E. eudesmoides*, *E. falcata*, *E. gamophylla*, *E. glaucina*, *E.*

globulus, E. globulus subsp. bicostata, E. globulus subsp. globulus, E. gongylocarpa, E. grandis, E. grandis×urophylla, E. guilfoylei, E. gunnii, E. hallii, E. houseana, E. jacksonii, E. lansdowneana, E. latisinensis, E. leucophloia, E. leucoxydon, E. lockyeri, E. lucasii, E. maidenii, E. marginata, E. megacarpa, E. melliodora, E. michaeliana, E. microcorys, E. microtheca, E. muelleriana, E. nitens, E. nitida, E. obliqua, E. obtusiflora, E. occidentalis, E. optima, E. ovata, E. pachyphylla, E. pauciflora, E. pellita, E. perriniana, E. petiolaris, E. pilularis, E. piperita, E. platyphylla, E. polyanthemos, E. populnea, E. preissiana, E. pseudoglobulus, E. pulchella, E. radiata, E. radiata subsp. radiata, E. regnans, E. risdoni, E. robertsonii, E. rodwayi, E. rubida, E. rubiginosa, E. saligna, E. salmonophloia, E. scoparia, E. sieberi, E. spathulata, E. staeri, E. stoatei, E. tenuipes, E. tenuiramis, E. tereticornis, E. tetragona, E. tetrodonta, E. tindaliae, E. torquata, E. umbra, E. urophylla, E. vernicosa, E. viminalis, E. wandoo, E. wetarensis, E. willisii, E. willisii subsp. falciformis, E. willisii subsp. willisii, E. woodwardii), 포플러스(populus) 종 (예를 들면, P. alba, P. alba×P. grandidentata, P. alba×P. tremula, P. alba×P. tremula var. glandulosa, P. alba×P. tremuloides, P. balsamifera, P. balsamifera subsp. trichocarpa, P. balsamifera subsp. trichocarpa×P. deltoides, P. ciliata, P. deltoides, P. euphratica, P. euramericana, P. kitakamiensis, P. lasiocarpa, P. laurifolia, P. maximowiczii, P. maximowiczii×P. balsamifera subsp. trichocarpa, P. nigra, P. sieboldii×P. grandideixata, P. suaveolens, P. szechuanica, P. tomentosa, P. tremula, P. tremula×P. tremuloides, P. tremuloides, P. wilsonii, P. canadensis, P. yunnanensis), 침엽수(예를 들면, loblolly pine(Pinus taeda), slash pine(Pinus elliotii), ponderosa pine(Pinus ponderosa), lodgepole pine(Pinus contorta), Monterey pine(Pinus radiata); Douglas-fir(Pseudotsuga menziesii); Western hemlock(Tsuga canadensis); Sitka spruce(Picea glauca); redwood(Sequoia sempervirens); silver fir(Abies amabilis); balsam fir(Abies balsamea)) 및 삼나무(예를 들면 Western red cedar(Thuja plicata), Alaska yellow-cedar(Chamecyparis nootkatensis)) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 더욱 구체적으로는 초본 식물중에서 애기장대일 수 있으며, 목본 식물 중에서 포플러일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 본 발명에서의 용어, "애기장대(Arabidopsis thaliana)란, 개화식물로서 십자화과(Bressicaceae)에 속하며 농업적인 중요성은 가지고 있지 않으나 현대 식물학에 있어 모델 식물로 널리 사용되고 있는 유전학과 분자생물학적 연구에 매우 중요한 식물이다. 본 발명에 따른 애기장대는 초본 식물의 대표 식물로서 사용될 수 있으며, 구체적으로 Arabidopsis thaliana, ecotype Columbia(Col-0)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명에서 용어, "포플러(poplar)"란, 쌍떡잎식물 버드나무목 버드나무과 사시나무속에 속하는 식물의 총칭이다. 구체적으로 본 발명에서 포플러는 목본 식물의 대표 식물로서 사용될 수 있으며, Populus alba×P. tremula var. glandulosa일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명의 일 실시예에서는 형성층 특이적으로 목적 유전자의 발현을 유도할 수 있는 벡터(vector)를 설계하기 위해, 도 6의 모식도처럼 pKGWFS7,0 벡터 또는 pBGWFS7,0 벡터에서 35S 프로모터를 SacI 및 SpeI 제한효소를 사용하여 PtrCam1 프로모터(서열번호 3)로 교체하여 PtrCam1::GUS 구조체를 제작하였다. 이후 상기 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) 균주 C58에 도입하였고, 상기 균주를 이용하여 floral-dip method(Clough and Bent, 1998)에 따라 애기장대(Arabidopsis thaliana, ecotype Columbia(Col-0))를 형질전환시켰다.

[0059] 구체적으로 본 발명에 따른 형질전환 식물은 목적 유전자의 과발현으로 식물체에서 원하는 단백질을 생산할 수 있도록 상기 PtrCam1 프로모터 및 이에 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 도입될 수 있다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에서는 도입된 유전자가 식물의 형성층 특이적으로 발현되는지 확인하기 위해, 본 발명의 PtrCam1::GUS로 형질전환된 애기장대의 각 기관을 분석하였다(도 7 내지 도 9). 본 발명의 다른 일 실시예에서는 상기 유전자 발현이 식물의 내부 및 외부 스트레스에 따라 달라지는지 확인하기 위해, 각각의 스트레스에 따른 발현정도를 확인하였다(도 10 및 도 11). 그 결과 본 발명에 따른 형질전환 애기장대에서 GUS 단백질은 모든 기관에서 형성층 특이적으로 발현되었으며, 식물의 발달 단계, 식물의 내부 및 외부스트레스와 관계없이 GUS를 발현하는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 PtrCam1 프로모터를 이용하여 목적 유전자를 식물의 형성층 특이적으로 발현시킬 수 있어, 다양한 목적으로 바이오연료 제조산업, 펄프 및 제지 산업 및 원료 목재 산업 등에

광범위하게 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

- [0061] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 목적 유전자 도입용 벡터의 게이트웨이 카세트에 위치 특이적 재조합 (site specific recombination)을 이용하여 목적 유전자를 도입하는 단계를 포함하는, 목적유전자의 형성층 특이적 발현 벡터의 제조방법을 제공한다.
- [0062] 상기 위치 특이적 재조합은 엔트리벡터와 목적벡터가 재조합효소에 의해 LR 반응을 일으킴으로써, 목적벡터의 attR1과 attR2가 엔트리벡터의 attL1과 attL2로 치환되는 것을 의미한다. LR 반응에 의해 엔트리벡터의 목적 유전자가 상기 도입용 벡터로 도입되고 목적벡터의 게이트웨이 카세트는 제거되어 목적 유전자를 포함하는 발현 벡터가 만들어 질 수 있다.
- [0063] 상기 재조합 효소는 DNA 이중나선에 특별히 상보성이 있는 작은 DNA 조각을 대체시켜 재조합하는 과정을 이루게 하는 효소로서 일반적으로 Recombinase(Excisionase, Integrase 라고도 한다)라고 하며, 예를 들어 Invitrogen사의 LR clonase일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 상기 방법에 의해 목적 유전자를 상기 도입용 벡터의 게이트웨이 카세트로 도입하여 목적 유전자를 형성층 특이적으로 발현하는 발현 벡터를 용이하게 제조할 수 있다.
- [0065] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 형성층 특이적으로 목적 유전자를 발현하는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [0066] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 1) 상기 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및 2) 상기 형질전환된 식물체 형성층(cambium) 조직 내에서 목적 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는, 목적 단백질 생산 방법을 제공한다.
- [0067] 상기 PtrCam1 프로모터, 목적 단백질 및 형질전환 식물에 대해서는 전술한 바와 같으며, 상기 방법에 의해 본 발명의 형질전환 식물을 제조할 수 있고, 그에 따라 형질전환 식물체에서 목적 단백질을 생산할 수 있다.
- [0068] 구체적으로 상기 제조방법은 상기 형질전환 식물을 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 형질전환식물의 재배는 널리 공지된 방법에 따라서 수행될 수 있고, 재배 온도, 재배 시간 및 배지의 pH 등의 조건은 적절하게 조절될 수 있다.
- [0069] 사용되는 배지는 특정한 형질전환식물의 요구 조건을 적절하게 충족시켜야 한다. 배지의 형태로는 고체배지 (solid medium), 액체배지(liquid medium), 이중배지(double layer medium)가 있으며, 이에 대한 성분으로는 물, 교질재료로서, 한천, 아가로스(agarose), 젤라이트(gelite) 등이 사용될 수 있다.
- [0070] 무기 영양소로는 15개의 원소, 즉 C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, B 및 Mo 등이 형태에 구애받지 않고 첨가되며, 유기 영양소로는 탄수화물, 식물생장 조절물질, 비타민 등이 첨가되고, 아미노산류로는 미오-이노시톨, 글라이신, L-글루타민 등이 첨가될 수 있다.
- [0071] 탄소원으로는 글루코스, 프럭토스, 만노스, 리보오스, 자일로스, 수크로스, 멜리비오스, 셀로비오스, 락토오스, 아밀로스, 탄수화물, 라피노스, 소르비톨, 만니톨, 글리세롤1 등이 첨가될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 애기장대(Arabidopsis thaliana, ecotype Columbia (Col-0)) 및 잡종 포플러 클론인 BH1(Populus alba × P. tremula var. glandulosa BH1)를 23℃의 생장실(16시간 빛/8시간 어둠)에서 토양에 재배하거나 또는 스크리닝을 위한 적당한 항생제 및 2% 수크로스를 포함한 half-strength MS-아가 배지(Murashige and skoog, Sigma)에서 재배하였다.
- [0073] 상기 제조방법에 의해 제조된 형질전환 식물은 목적 유전자를 형성층 특이적으로 발현하여 목적 단백질을 생산할 수 있다.

발명의 효과

- [0074] 본 발명의 식물체 형성층 특이적 프로모터는 식물의 발달단계와 외적 및 내적인 환경 스트레스에 좌우되지 않고 월등한 형성층 조직-특이성 및 강력한 발현을 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0075]

도 1은 포플러에서 조직별 유전자 발현 분석을 위한 샘플링 모식도이다. A. 각 조직을 분리, 사용하기 위해 1년 동안 자란 포플러 줄기를 이용하였다. BP는 수피; Ca는 체관조직; Ca는 형성층; DX는 도관형성조직; MX는 목질 부조직이며, WS는 줄기 전체로 대조군으로 사용하였다. B. SL은 정단분열조직이다. C. ML은 잎맥을 제거한 성숙 잎이다. B와 C는 목부를 형성하지 않는 대조군으로 사용하였다.

도 2는 형성층(Ca)를 중심으로한 포플러 조직별 전사체 발현 비교를 나타낸 것이다. 총 10종류의 포플러 조직 전사체를 비교 분석하여 의미있게 발현이 변화하는 총 17,179개의 유전자들을 동정하였고, 이들을 형성층(Ca)를 중심으로 도식화하였다. 즉, 형성층에서 발현이 증가되는 유전자는 빨간색, 반면 감소되는 유전자는 파란색으로 나타내었다. SM은 여름 줄기, WN은 겨울 줄기를 의미한다.

도 3은 형성층(Ca)에 특이적으로 발현되는 유전자의 발현을 나타낸다. 총 10종류의 포플러 조직 전사체를 비교 분석하여 의미있게 발현이 변화하는 총 17,179개의 유전자들 중에서, 형성층(Ca)에서 특이적으로 발현이 증가하는 유전자 총 536개를 생명정보학 방법을 이용하여 동정하였다. 하단의 그래프는 각 조직별 유전자들의 발현량을 비교한 것이고, 상단의 그래프는 유전자 발현량을 표준화시킨 값을 로그 스케일로 나타낸 것이다.

도 4는 형성층(Ca) 특이적인 Potri.T098800.1 유전자의 조직별 발현 양상을 나타낸 것이다. 포플러 조직별 총 전사체 분석을 한 결과로부터 Potri.T098800.1 유전자의 발현을 도식화하였다. Ca는 형성층(cambium) 조직을 의미하며, 6DL, 6L, 6D는 각 상이한 빛 조건에서 키운 6일된 포플러 유식물, SL은 정단열분열조직(shoot apical meristem & young leaf), YL은 어린잎(young leaf), ML은 성숙잎(mature leaf), BP는 피층(bark & phloem), Ca는 체관(developing phloem), DX는 도관모세포(developing xylem), MX는 목질부(mature xylem), SM은 여름시기의 줄기조직(summer), WN은 겨울시기의 줄기조직(winter)을 각각 의미한다.

도 5는 형성층(Ca) 특이적인 PtrCam1(Potri.T098800.1) 유전자의 유전정보로서, Phytozome(www.phytozome.net)에서 얻은 PtrCa(Potri.T098800.1) 유전자 정보이다. 상기 유전자는 기능이 알려져 있지 않은 유전자이며, 총 1개의 인트론이 존재함을 알 수 있다.

도 6은 본 발명에서 사용한 재조합 유전자 벡터 지도를 나타낸 것이다. PtrCam1 프로모터가 GUS 유전자의 위쪽에 위치하여 GUS 유전자 발현을 조절할 수 있도록 설계하였다. 벡터 골격(backbone)으로는 pKGWFS7,0과 pBGWFS7,0을 이용하였다. 이때 A는 카나마이신 선별용으로 포플러 형질전환체 개발에 사용하였고, B는 바스타(basta) 선별용으로 애기장대 형질전환체 개발에 사용하였다.

도 7은 형질전환 애기장대(PtrCam1::GUS) 식물체에서 형성층 조직 특이적인 PtrCam1 프로모터의 활성을 확인한 것이다. A, B. PtrCam1::GUS 형질전환 애기장대 식물의 줄기 단면이다. 50일 동안 토양에서 자란 식물을 이용하였으며, A는 아래쪽 줄기의 단면이고, B는 중간 줄기의 단면이다. A(아래쪽 줄기 단면); 빨간색 화살표가 형성층 조직을 가리킨다. B(중간 줄기 단면); 파란색 표시는 전형성층 조직을 가리킨다. C. 식물체의 다른 부위: 꽃, 잎, 열매. Ep는 표피세포(epidermis); Co는 피층세포(cortex); IF는 관다발 사이의 섬유세포(interfascicular fiber); Xy는 도관세포(xylem); Pi는 수세포(pith cells)를 가리킨다.

도 8은 형질전환 애기장대(PtrCam1::GUS) 식물체에서 미세절편(microtome section)을 이용해 관찰한 형성층 세포-특이적인 PtrCam1 프로모터의 활성을 나타낸 것이다. A는 20일 된 PtrCam1::GUS 형질전환 애기장대 식물의 하배측 단면, B는 50일 된 PtrCam1::GUS 형질전환 애기장대 식물의 아래쪽 줄기 단면이며, 빨간색 화살표는 형성층 조직을 가리키고, 파란색 화살표는 전형성층을 가리킨다. Ep는 표피세포(epidermis); Co는 피층세포(cortex); IF는 관다발 사이의 섬유세포(interfascicular fiber); Xy는 목관세포(xylem); Ph는 체관세포(phloem); Pi는 수세포(pith cells)를 의미한다.

도 9는 형질전환 애기장대(PtrCam1::GUS) 유식물체의 발달 단계에 따른 PtrCam1 프로모터의 도관 특이적 활성을 확인한 것이다. A. 3일된 유식물. 1번 사진은 전체 유식물 모양, 2번은 떡잎 확대 사진, 3번은 하배측 확대 사진, 4번은 뿌리이다. B. 5일된 유식물. 1번 사진은 전체 유식물 모양, 2번은 정단조직과 떡잎 확대 사진, 3번은 하배측, 4번은 뿌리이다. C. 7일된 유식물. 1번 사진은 전체 유식물 모양, 2번은 하배측과 떡잎 확대 사진, 3번은 하배측, 4번은 뿌리이다. D. 10일된 유식물. 1번 사진은 전체 유식물 모양, 2번은 잎 사진, 3번은 하배측 확대 사진, 4번은 뿌리이다.

도 10은 형질전환 애기장대(PtrCam1::GUS)에서 다양한 환경 스트레스에 따른 PtrCam1 프로모터의 도관 특이적

활성 변화를 확인한 것이다. 10일 자란 형질전환 애기장대(PtrCam1::GUS)에 저온, 건조, 염분, 삼투압 스트레스를 각각 처리한 후, PtrCam1 프로모터의 도관 특이적 활성의 변화를 조사하였다. Mock은 아무런 스트레스를 처리하지 않은 대조군이다.

도 11은 형질전환 애기장대(PtrCam1::GUS)에서 다양한 식물 호르몬 처리에 따른 PtrCam1 프로모터의 도관 특이적 활성 변화를 확인한 것이다. 10일 자란 형질전환 애기장대(PtrCam1::GUS)에 여러 종류의 식물 호르몬(IAA, Kinetin 또는 ABA)을 12시간 동안 각각 처리한 후, PtrCam1 프로모터의 도관 특이적 활성 변화를 조사하였다. Mock은 아무런 호르몬을 처리하지 않은 대조군이다.

도 12는 PtrCam1 프로모터를 이용한 재조합 유전자 벡터 지도이다. 기존의 pK2GW7,0(카나마이신 선별용)과 pB2GW7,0(바스타 선별용) 벡터의 35S 프로모터를 PtrCam1 프로모터로 치환하여 PtrCam1-pK2GW7,0과 PtrCam1-pB2GW7,0 벡터를 각각 개발하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0077] 실시예 1 : 형성층 특이적 발현 프로모터 스크리닝 및 형질전환 식물체 제조

[0078] 1.1 형성층 특이적 프로모터의 동정

[0079] 본 발명자들은 식물체의 형성층에서 특이적으로 발현하는 유전자를 탐색하기 위해, 포플러 나무의 여러 조직(정단분열조직, 잎, 수피, 체관조직, 형성층, 도관형성조직, 목질부조직 및 줄기전체조직)을 분리한 후 각 조직에서 mRNA를 추출하였다(도 1).

[0080] 이후 Affymetrix사의 GeneChip Poplar Genome Array를 사용하여 각 조직 별 유전자 발현을 분석하였다. Poplar Genome Array에는 총 61,251개의 프로브셋이 있으며 이들은 총 57,423개의 유전자를 표지하는데, 이들 중에서 반복 존재하는 유전자를 제외하면, Poplar Genome Array로 총 41,558개의 포플러 유전자들의 발현 변화를 연구할 수 있다. 생명정보학 기법을 이용하여 포플러의 8개 조직(정단분열조직, 잎, 수피, 체관조직, 형성층, 도관형성조직, 목질부조직 및 줄기전체조직)과 여름과 겨울의 줄기 조직을 포함한 총 10개 조직의 전사체 분석을 수행하였고, 이 때 각 조직 별로 비교해서 발현이 의미있게 변화하는 총 17,179개의 유전자들을 동정하였다(도 2). 이러한 발현 변화 유전자 17,179개 중에서 형성층에 특이적인 발현을 보이는 유전자 총 536개를 동정하였고(도 3), 이 중에서 가장 강한 발현을 보이는 상위 5개 유전자를 선별하여 해당 프로모터를 각각 클로닝하였다.

[0081] 상기 프로모터는 각 유전자의 번역개시 코돈인 ATG 서열 앞쪽의 약 1.5 kb의 서열을 사용하였다. 각 프로모터의 식물체 내에서의 실질적인 형성층 특이적인 활성을 조사하기 위해, GUS 유전자를 리포터로 하여 프로모터::GUS 유전자 재조합 발현벡터를 제조하였고, 이를 애기장대 식물에 도입하여 형질전환 식물체를 확보하였다.

[0082] 상기 5개의 유전자 중에서도 특히, 포플러 Potri.T098800.1 유전자의 프로모터는 형성층 조직 특이적이며 매우 강한 유전자 발현을 보였다(도 4). 포플러의 각 조직에서의 Potri.T098800.1 유전자의 발현을 살펴보면, 형성층 세포에서 특이적이고 강력한 발현 피크를 보이며, 여름시기에 발현이 높고 겨울에는 발현이 낮음을 볼 수 있어서 활발한 생장시기에 이 유전자의 발현이 강함을 보여준다. 이 Potri.T098800.1 유전자를 PtrCam1라 명명하였다.

[0083] 상기 PtrCam1 유전자는 현재까지 기능이 잘 알려지지 않은 단백질을 코딩하는 유전자로서(도 5, 서열번호 1 및 서열번호 2), 본 발명에서는 상기 프로모터의 활성을 집중적으로 조사하였다.

[0084] 이를 위해 본 발명에서는 PtrCam1 프로모터에 GUS 리포터 유전자를 퓨전하여 제조한 벡터를 도입하여 형질전환 애기장대를 제조하고, 상기 제조된 형질전환 식물체에서 GUS 유전자의 발현을 확인함으로써 PtrCam1 프로모터의 조직에 따른 활성 여부를 확인하였으며, 본 발명에 사용된 식물 표본 및 PtrCam1::GUS 형질전환 식물체의 구체적인 제조 방법은 하기와 같다.

[0085] **1.2 식물 표본**

[0086] 애기장대(*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia (Col-0))를 형질전환 실험에 사용하였다. 23℃, 16시간 명/8시간 암 조건으로 MS-아가 배지 또는 토양에서 상기 식물을 배양하였다.

[0087] **1.3 PtrCam1 프로모터::GUS 형질전환 식물체의 제조**

[0088] Potri.T098800.1을 암호화하는 유전자의 5' 말단의 게놈 단편(1549bp)을 PCR로 분리하고, PtrCam1::GUS 구조체를 생산하기 위해 pBGWFS7,0(애기장대 형질전환용) 또는 pKGWFS7,0(포플러 형질전환용)의 GUS 리포터 유전자 앞의 35S 프로모터를 PtrCam1 프로모터와 교체하는 방식으로 상기 게놈 단편을 삽입하였다. 교체한 PtrCam1 프로모터의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 3과 같다.

[0089] 제조한 각 벡터 구조체를 식물체 형질전환을 위하여 먼저 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 C58에 도입하였으며, 이를 통해 PtrCam1 프로모터::GUS 형질전환 식물체를 성공적으로 제조하였다.

[0090] **실시예 2 : PtrCam1 프로모터의 형성층 특이적 발현 확인**

[0091] **2.1 GUS 활성 분석**

[0092] 상기 제조된 형질전환식물의 조직에 따른 GUS(beta-glucuronidase) 활성을 확인하기 위하여 조직화학 염색을 수행하였다. 1 mM 5-브로모-4-클로로-3-인돌일 베타-D-글루쿠로나이드(glucuronide), 100 mM 인산 완충액, 5 mM K₃[Fe(CN)₆], 5 mM K₄[Fe(CN)₆] 및 pH 7.0의 10 mM EDTA를 포함하는 GUS 반응 완충액에 37℃에서 18 내지 24시간 동안 표본을 배양하였다. 염색된 조직을 더 잘 볼 수 있도록, 염색소를 제거하기 위해 상온에서 최소 한 시간 동안 조직 표본을 에탄올로 행궜다. 그 후 상기 형질전환 식물체의 각 조직에서 GUS 단백질의 발현을 관찰하였다.

[0093] **2.2 형성층 특이적 활성 확인**

[0094] 상기 PtrCam1::GUS 유전자 재조합 발현벡터(도 6)를 이용하여 제조한 형질전환 식물체의 각 조직에서 GUS 단백질의 발현을 관찰하였다. GUS 리포터 단백질은 X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide)이라는 기질을 분해하여 파란색 침전물을 만들게 되고, 따라서 프로모터의 활성위치를 파란색으로 표시하게 되는데, 도 7 및 도 8에서 보이는 바와 같이 상기 형질전환 식물체에서는 전체적으로 형성층 조직에서 GUS 활성(파란색)이 특이적이며 매우 강함을 확인할 수 있었다.

[0095] 구체적으로, 토양에서 50일 자란 애기장대 형질전환 식물체의 경우, 줄기 단면에서 관다발 형성층과 전형성층 특이적이고 매우 강한 GUS 활성을 보였으며, 다른 조직에서는 전혀 활성을 보이지 않았다(도 7의 A, B). 또한 동일 식물체의 다른 기관 즉, 잎, 꽃, 열매 등에서도 물관이 존재하는 관다발 조직의 일부를 제외하면 전혀 활성을 나타내지 않았다(도 7의 C). 미세절편을 통한 세포 수준에서의 발현 조사 결과도 마찬가지로, 형성층에 특이적인 GUS의 활성(빨간색 화살표로 표시)을 확인할 수 있었다(도 8).

[0096] 이를 통해 본 발명의 PtrCam1 프로모터는 형성층 특이적으로 활성을 가짐을 확인하였으며, 따라서 상기 프로모터를 포함하는 유전자 발현 벡터를 이용하여 목적 유전자를 형성층 특이적으로 발현시킬 수 있다.

[0097] **실시예 3 : 식물의 발달 단계에 따른 PtrCam1 프로모터의 활성 확인**

[0098] 다음으로 PtrCam1 프로모터에 의한 형성층 특이적 발현 양상이 식물의 발달단계에 따라 달라지는 것은 아닌지를 확인하기 위해, 식물의 발달 단계에 따른 PtrCam1 프로모터의 활성 변화를 알아보았다.

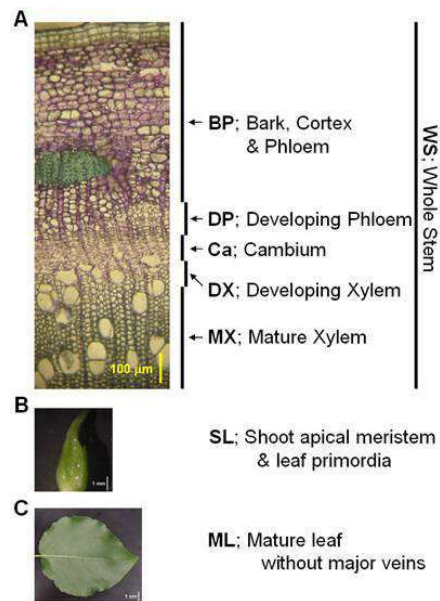
[0099] 그 결과, 발아 후 어린 식물, 즉 발아 3일째부터 관다발 조직 특이적으로 GUS 활성이 보이기 시작했으며 이는 5일, 7일, 10일째로 가면서 변함없이 같은 부위에서 활성이 관찰되었다(도 9). 이러한 사실은 PtrCam1 프로모터의 형성층 특이적 활성이 매우 어린 식물에서부터 나타나며, 발달단계에 따라 변화되지 않음을 알려준다.

- [0100] 결과적으로 본 발명의 PtrCam1 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 이용하여 목적 유전자를 형성층 특이적으로 발현시키고자 하는 경우 대상 식물체의 발달단계는 영향을 미치지 않으며, 식물체의 발달단계에 관계없이 목적 유전자를 형성층 특이적으로 발현시킬 수 있다.
- [0101] **실시예 4 : 스트레스에 따른 프로모터 활성 변화 확인**
- [0102] 한편, 식물은 생장 과정에서 필연적으로 다양한 내적 및 외적인 스트레스를 받게 되는데 이러한 스트레스에 따라 PtrCam1 프로모터의 활성이 변하는지를 확인하기 위해 비생물적 스트레스를 주거나 또는 식물 호르몬을 처리하면서 PtrCam1 프로모터 활성 변화를 확인하였다.
- [0103] 구체적으로 MS-아가 배지에서 키운 열흘 된 형질전환 애기장대(PtrCam1::GUS) 묘목을 사용하였으며, MS 액체 배지에서 상기 묘목을 12시간 동안 전배양한 뒤, 식물 호르몬($1\mu\text{M}$ IAA, kinetin 또는 ABA), 150mM NaCl(염 스트레스) 또는 30mM 마니톨(삼투압 스트레스)을 포함하는 MS 액체 배지에 옮기거나 또는 4°C (저온 스트레스)에 두었다. 또한 가뭄 스트레스를 위해 상기 묘목을 증류수 15분 동안 건조시킨 후 표준 MS 액체 배지로 옮기고 12시간 배양하였으며, 상기 각각의 스트레스에 따른 GUS 활성 분석을 수행하였다.
- [0104] 먼저 외적인 환경 스트레스에 처하였을 때 PtrCam1 프로모터 활성 변화를 알아보기 위해, 10일째의 유식물에 저온, 건조, 고염분, 그리고 고삼투압 스트레스를 각각 처리한 결과 관다발의 형성층 조직에서만 관찰되는 PtrCam1 프로모터 활성이 각각의 스트레스 상황에서 의미 있는 변화를 발견할 수 없었다(도 10).
- [0105] 한편, 식물에는 5 종류의 주요 호르몬(옥신, 사이토키닌, 지베렐린, 앱시스산, 에틸렌)이 존재하며, 이러한 식물 호르몬들은 식물 생리의 거의 모든 부분에 있어서 중요한 조절 작용을 한다. 이에 식물의 내적인 스트레스, 즉 생리적 변화를 흉내내기 위해 여러 식물 호르몬(IAA, kinetin, ABA)를 10일째의 유식물에 각각 처리하고 이에 대한 PtrCam1 프로모터의 활성 변화를 살펴보았다. 그 결과 외부 환경 스트레스와 마찬가지로 관다발의 형성층 조직에서만 관찰되는 PtrCam1 프로모터 활성이 각각의 식물 호르몬 처리에도 불구하고 의미있는 변화를 발견할 수 없었다(도 11).
- [0106] 상기 결과들을 종합하면 PtrCam1 프로모터의 활성은 식물의 발달단계 또는, 다양한 내적 및 외적 스트레스에 따라 변화되지 않고, 지속적으로 형성층 조직 특이적이며 강한 활성을 가짐을 알 수 있다. 따라서 본 발명의 PtrCam1 프로모터를 포함하는 발현 벡터는 식물의 발달단계 또는 다양한 내적 및 외적 스트레스와 관계 없이 도입된 식물 형질전환체에서 형성층 특이적으로 목적 유전자를 강하게 발현시킬 수 있는 우수한 효과가 있다.
- [0107] **실시예 5 : 유틸리티 벡터 제조**
- [0108] 본 발명에서 개발한 PtrCam1 프로모터를 이용하여 외래 유용 유전자를 형성층 특이적으로 발현시키기 위해서는 재조합 유전자 벡터(예컨대 PtrCam1::GENE)의 제조가 필요하다. 이에 상기 재조합 유전자 벡터 제조를 쉽게 할 수 있도록, PtrCam1 프로모터를 포함하는 유틸리티 벡터를 제조하였다.
- [0109] 일반적인 제한효소와 리가아제를 사용하는 클로닝 방법은 시간이 많이 소요되고 종종 여러 가지 문제가 있을 수 있으나, 게이트웨이(Gateway) 클로닝 방법은 뉴클레오티드 서열 특이적인 재조합 방법을 이용한 것으로 클로닝하고자 하는 유전자의 뉴클레오티드 서열과 상관없이 매우 효율적인 방법으로 알려져 있다. 기존의 게이트웨이 용 벡터는 35S 프로모터와 게이트웨이 카세트(cassette)가 연결되어 있고, 이 게이트웨이 카세트에 목적 유전자를 클로닝하게 된다.
- [0110] 본 발명에서는 35S 프로모터를 PtrCam1 프로모터로 대체시킨 PtrCam1-pK2GW7,0 (kanamycin 선별용) 및 PtrCam1-pB2GW7,0 (basta 선별용) 벡터를 제조하였다(도 12). 이에 상기 벡터들을 활용하여 식물체의 형성층에 특이적으로 목적 유전자를 발현하는 형질전환체를 용이하게 제조할 수 있다.
- [0111] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모

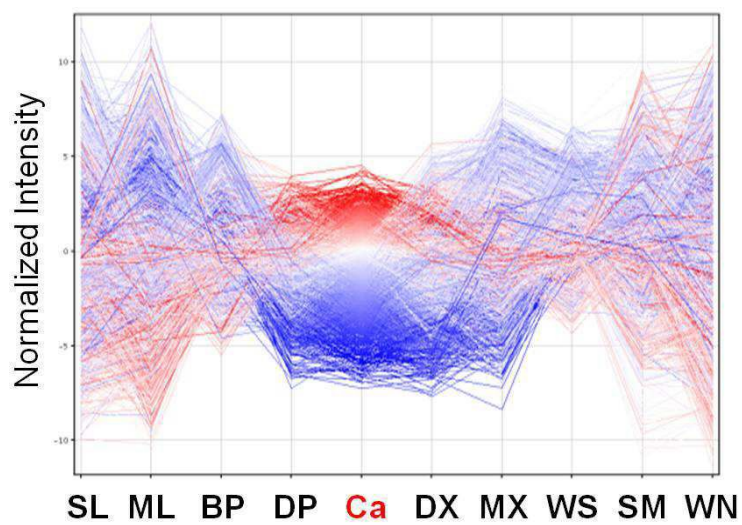
든 변경 또는 변경된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

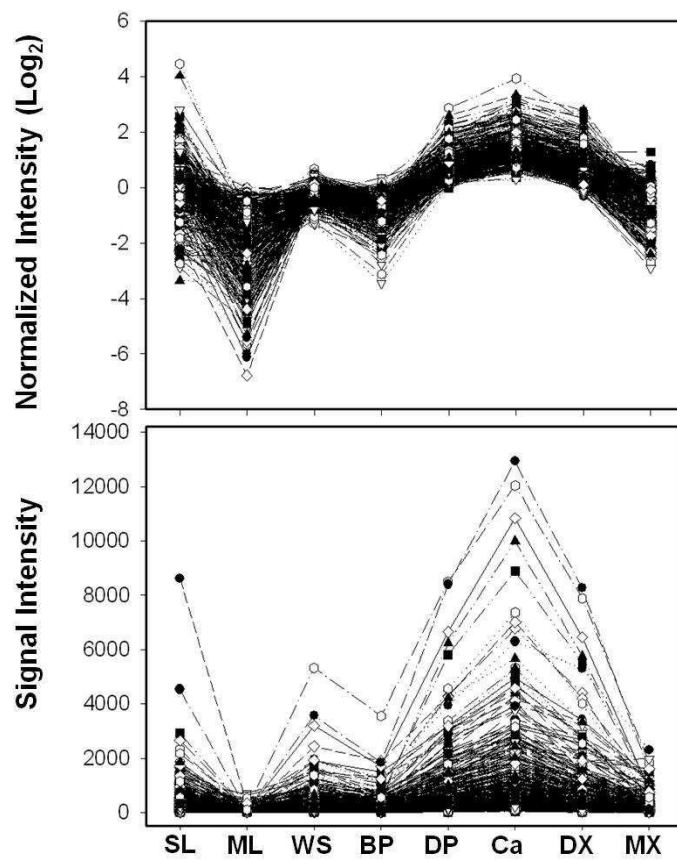
도면1



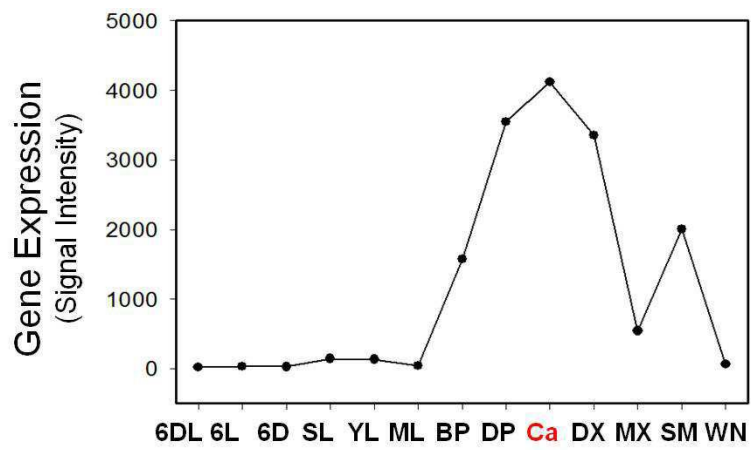
도면2



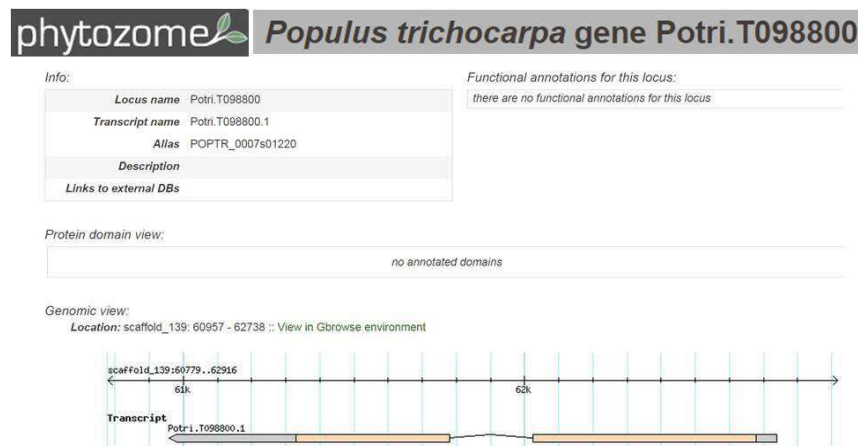
도면3



도면4

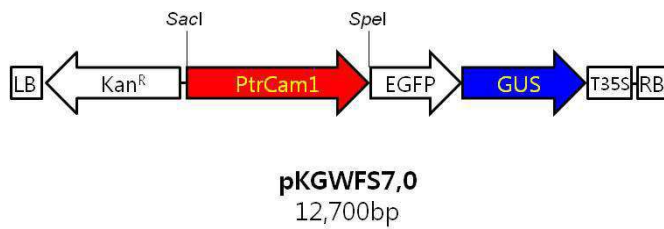


도면5

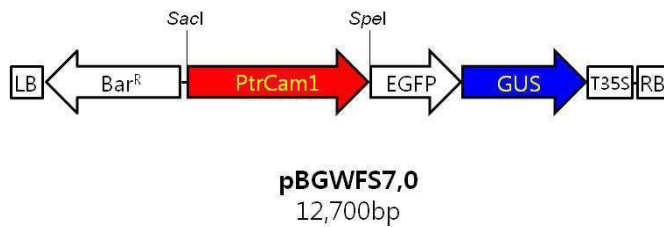


도면6

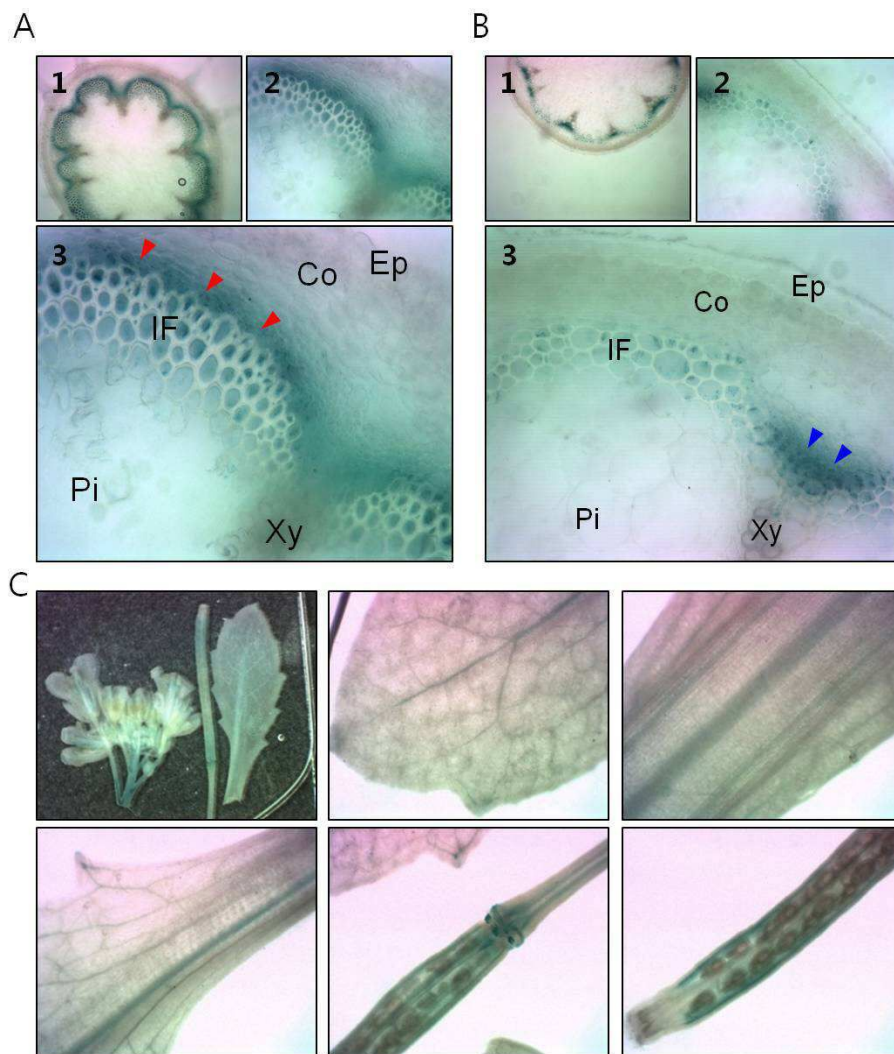
A



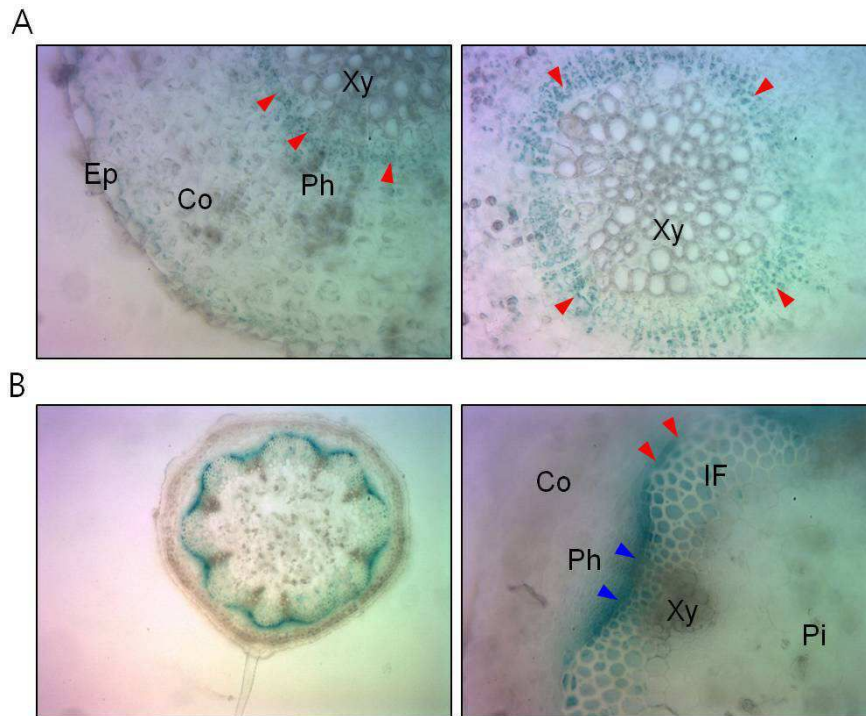
B



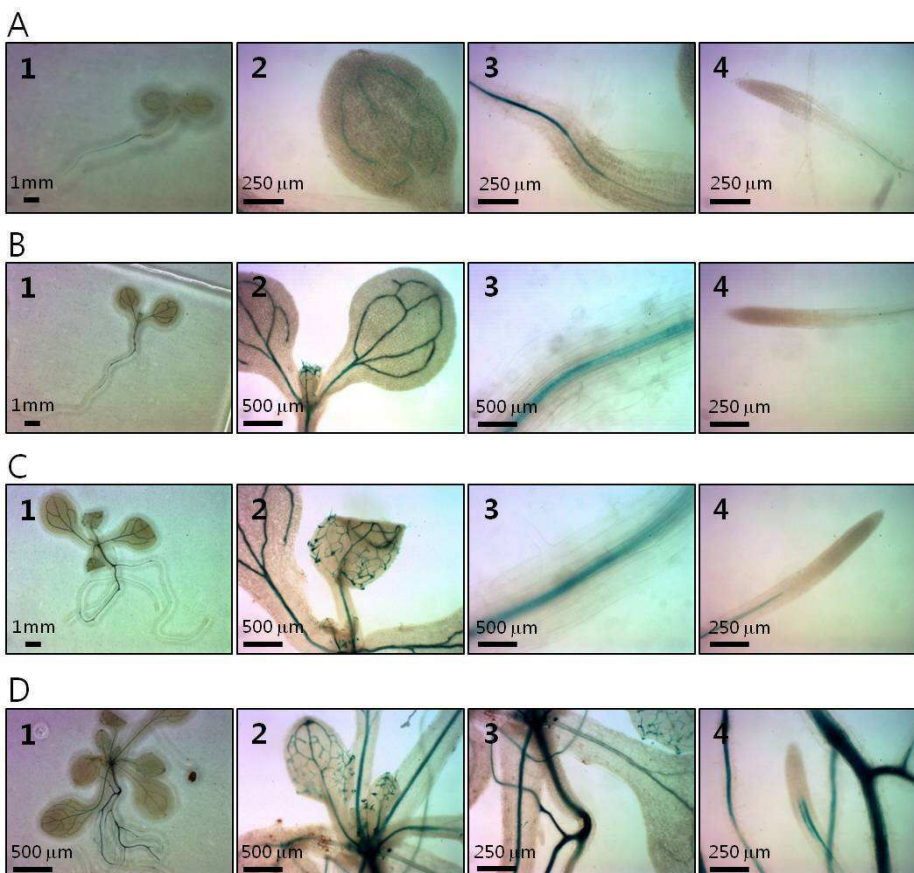
도면7



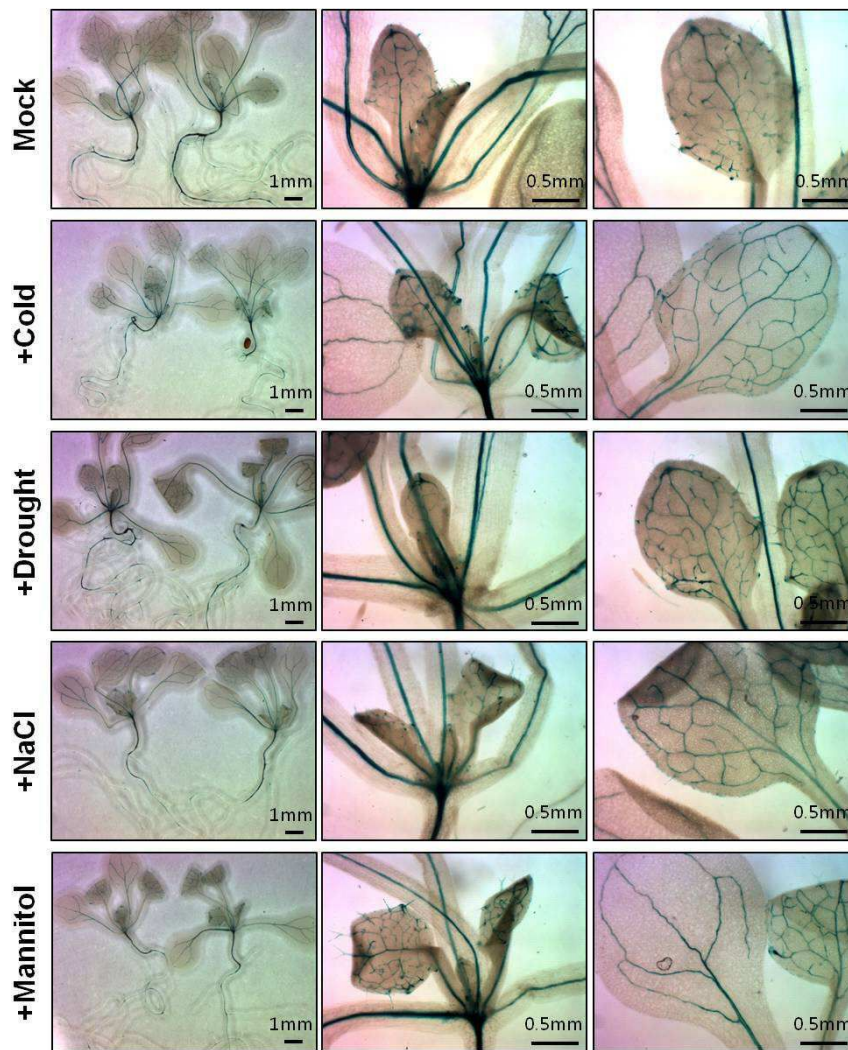
도면8



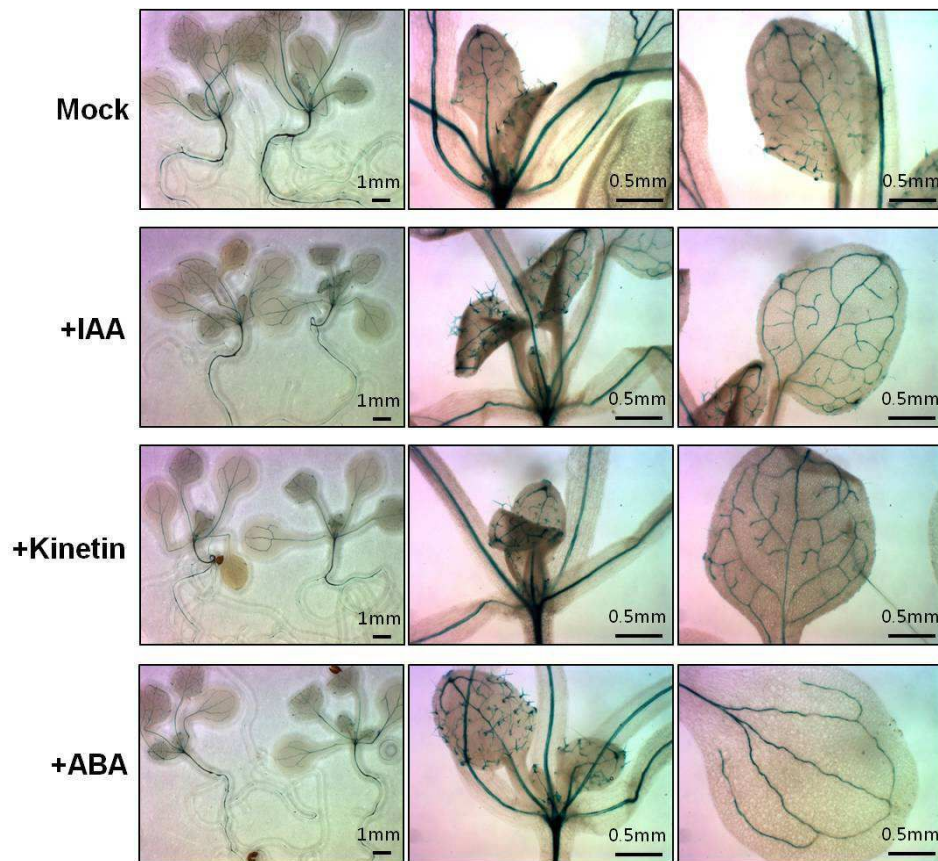
도면9



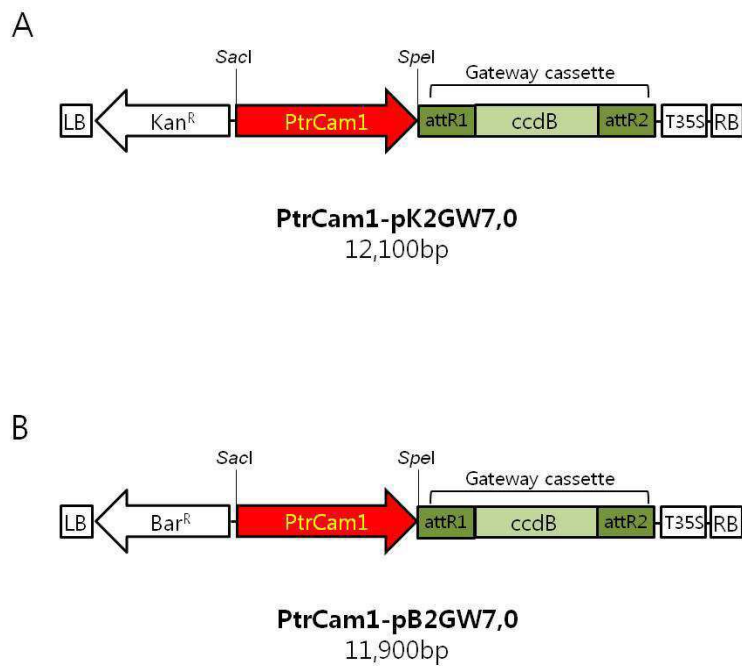
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A CAMBIUM-SPECIFIC PROMOTER AND USES THEREOF

<130> KPA141324-KR

<160> 3

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1005

<212> DNA

<213> Populus trichocarpa

<400> 1

atggcttctt cgggtaagca tctatctttc tctgtttgc tagtgacgtt ttcctctatc	60
caggctagag agagcatgtt ctttagcaag ttcacgagac actatagcat cacaaaagag	120
aatggtaaga aagggcccat caccattttg acagtaccaa ttcaagcacc tacaccagca	180
ccagcaccat caccagcatc gttactagat gtccagaac cagcaccagc accggtgttc	240
ggcgagagtg aaaagggccca tggccttttc ggtgagggtc caggaaatgtt ccctcctaag	300
gagacttcaa ccaccaccac cacttacgtc gatgaaaatg agcttttgaa cgaagaactt	360
gatggtgtaa cctctgacca gaagtatgaa aacagcaact acaacaaca tggctatact	420
agcacttaca acaataatgg ttacgagagg agcaactaca acaacaagaa caacaacaat	480
ggctacaaac ttggtagtgc tagatatgag acaggtaatc aaaacaaca cggtacacc	540
aacaagtact acaataatgg ctacaaacta gctggtgaaa gctatgaagc aggcaatcaa	600
aatagtgaga atggttacag caacaatggc aacgcaaaca actacaaca caaaggctac	660
accaacaagt actacaataa tggctacaaa ctagctggtg aaagctatga agcaggcagt	720
cagaaaagtg agaatggcta cagcaacaac tacaacaaca acggctacac caacaagtac	780
tacaataatg gctacaagct gcctggtgaa agctatgaag taggcaacca gaatagttag	840
aatggctaca ccaacacctc caacaacaaa atcaagggtc ttatggaaat gatgagaacc	900
ctaacgaatt caacaccatg gaagagtata agagccagga ggggtatgag gaaagccaag	960
aggagtcttt gccttgaaat actgttattg ttgttaaatt tgtag	1005

<210> 2

<211> 334

<212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<400> 2

Met Ala Ser Ser Gly Lys His Leu Phe Phe Phe Cys Leu Leu Val Thr

1	5	10	15
---	---	----	----

Phe Ser Ser Ile Gln Ala Arg Glu Ser Met Phe Phe Ser Lys Phe Thr
 20 25 30
 Arg His Tyr Ser Ile Thr Lys Glu Asn Gly Lys Lys Gly Pro Ile Thr
 35 40 45
 Ile Leu Thr Val Pro Ile Gln Ala Pro Thr Pro Ala Pro Ala Pro Ser
 50 55 60
 Pro Ala Ser Leu Leu Asp Val Pro Glu Pro Ala Pro Ala Pro Val Phe
 65 70 75 80
 Gly Glu Ser Glu Lys Gly His Gly Leu Phe Gly Glu Gly Ser Gly Met
 85 90 95
 Phe Pro Pro Lys Glu Thr Ser Thr Thr Thr Thr Tyr Ala Asp Glu
 100 105 110
 Asn Glu Leu Leu Asn Glu Glu Leu Asp Gly Val Thr Ser Asp Gln Lys
 115 120 125
 Tyr Glu Asn Ser Asn Tyr Asn Asn Asn Gly Tyr Thr Ser Thr Tyr Asn
 130 135 140
 Asn Asn Gly Tyr Glu Arg Ser Asn Tyr Asn Asn Lys Asn Asn Asn Asn
 145 150 155 160
 Gly Tyr Lys Leu Gly Ser Ala Arg Tyr Glu Thr Gly Asn Gln Asn Asn
 165 170 175
 Asn Gly Tyr Thr Asn Lys Tyr Tyr Asn Asn Gly Tyr Lys Leu Ala Gly
 180 185 190
 Glu Ser Tyr Glu Ala Gly Asn Gln Asn Ser Glu Asn Gly Tyr Ser Asn
 195 200 205
 Asn Gly Asn Ala Asn Asn Tyr Asn Asn Lys Gly Tyr Thr Asn Lys Tyr
 210 215 220
 Tyr Asn Asn Gly Tyr Lys Leu Ala Gly Glu Ser Tyr Glu Ala Gly Ser
 225 230 235 240
 Gln Lys Ser Glu Asn Gly Tyr Ser Asn Asn Tyr Asn Asn Asn Gly Tyr
 245 250 255
 Thr Asn Lys Tyr Tyr Asn Asn Gly Tyr Lys Leu Pro Gly Glu Ser Tyr

260	265	270
Glu Val Gly Asn Gln Asn Ser Glu Asn Gly Tyr Thr Asn Thr Tyr Asn		
275	280	285
Asn Lys Ile Lys Val Leu Met Glu Met Met Arg Thr Leu Thr Asn Ser		
290	295	300
Thr Pro Trp Lys Ser Ile Arg Ala Arg Arg Gly Met Arg Lys Ala Lys		
305	310	315
Arg Ser Leu Cys Leu Glu Ile Leu Leu Leu Leu Asn Leu		320
	325	330
<210>	3	
<211>	1549	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PtrCam1 promoter	
<400>	3	
tgaaaaataa ttcaagacct gaccaattaa gctacttctc aggattaaca agttaattta		60
atgattcggtt aactaagaat ttagccttaa caaataattt gtttaagcat cgagtaagac		120
tttgtttaat ttttaacta aaaaaataa cattatttca acttaaaaag aaaaatatta		180
aaatgacccc tcatcaatat catcgtgggt tgtattgaga aaaatttata aaacatgggt		240
ttttaccta tttaaacca gtcctttcat atcacatttg agctaaaatt tgcgtatatt		300
ttttaatcaa tgtattcatg atttttcttc tctctcaaca ttttcctaga ttgaagatct		360
gaataattac gtgtgaaaag taattattca attaacatat aatcataatc cggaaagtag		420
atgggtttgg gtttcttgag gtgttaggga ccaatcataa atggatttca tgagaattta		480
aagagccttt tcaattctcc atcttccatt ttaatgaaca attacctgaa ctgcgaattc		540
aagttatcga taccctttgc atttacttta cttaacatc aataaataga tacattttgc		600
tttaactatt cagcttggat caaattatta gaaaaagact tggcatgtgt atcaagacaa		660
gaattggggtt ataagtttag tgggttaact tgtatcattt tgaaatagta ttgttttaag		720
attatttttt aaaaaaattt aaaacgatat agttctaata aaaattaaat cgagttttga		780
ttaggtcgat tgaaatgta actcactgaa ttatcacttg cctggtttaa ttgaaacct		840
caatttaacc taaattatta gtccaagtt gaccaacat gttaaactag gttaattaa		900
agaaaaagat gaaatgtttt ggcaataaaa gcccttcttg aatccaata ttacctcat		960

atccagagca aaactgtcaa agcaatatct ctcaggaact ttgaaaaaag gagagaagaa	1020
ttactatctt cacgaagcca taaagtgcc aactccttag ttagagaagg aagaccaaac	1080
catagtaaca gtaataatga aatgtgccct accaccctc gttagttcct cacttttcta	1140
gacgaaccct aactaattca accgccaagg agtgattgag gaccccaat tcaattccac	1200
attgcccttc catgaaagca aaagagagtg tcttattttc ttcgttagct agaaaagcaa	1260
atagccctt tttgactagg aactgcatgt ctatTTTTTT tttcctgctg gagatttgg	1320
gccctctttt gctagacagt ctcaatgaag gcacatgcag catgcactgt gtgcatgat	1380
tttctacccc acaattttcc ctttctcaa tccacgcata attgcccggc ctactaagg	1440
atccaatact caatagtcta taaaagacta agggaaatga aacttcaacg taccaccaag	1500
aacctaaaaa atttcttcat ctctatcttt aatctttagg tcatttctc	1549