



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0063574
(43) 공개일자 2021년06월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8273 (2013.01)
C12N 9/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0151867
(22) 출원일자 2019년11월25일
심사청구일자 2019년11월25일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
백동원
경상남도 진주시 금산면 덕의길 15 (진주푸르지오1단지) 101동 1101호
김민철
경상남도 진주시 하대로 142 현대아파트 105동 2001호
(74) 대리인
김동완

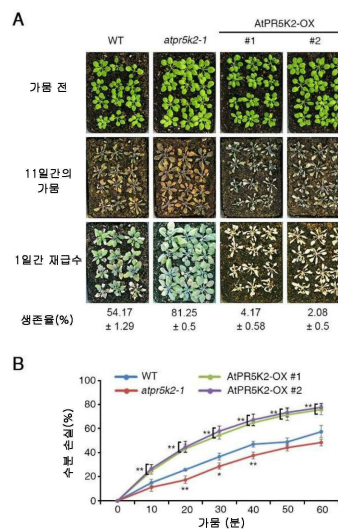
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 AtPR5K2 단백질 발현을 억제시킨 가뭄 저항성 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 아라비도시스 탈리아나 PR5-유사 수용체 키나아제 2(AtPR5K2) 발현을 억제시킨 가뭄 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 가뭄 스트레스 신호전달에 관여하는 AtPR5K2 단백질의 발현을 억제시켜 가뭄 저항성을 증진시킨 형질전환 식물체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1D1A1B01011803
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인지초연구지원사업(기본연구)
연구과제명	환경재해에 대응하는 식물 내성 유전자의 동정 및 고부가가치 작물체 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경상대학교 산학협력단
연구기간	2016.06.01 ~ 2022.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ01318202
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	시스템합성농생명공학사업단
연구사업명	차세대바이오그린사업
연구과제명	식물의 내염성 획득 및 후대유전성 기작 규명을 통한 작물 내염성 증진 기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경상대학교 산학협력단
연구기간	2018.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 AtPR5K2 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 AtPR5K2 단백질은 타우마틴-유사 도메인, 막 투과 도메인 및 세린-트레오닌 키나제 도메인을 포함하며, 단백질 포스파타제 2C형(PP2C 포스파타제)의 활성화를 통해 ABA-의존적 가뭄 스트레스 신호전달에 관여함을 특징으로 하는 AtPR5K2 단백질 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 AtPR5K2 단백질은 ABA의 부재시 ABI1(ABA-INSENSITIVE 1) 및 ABI2(ABA-INSENSITIVE 2)와 같은 PP2C 포스파타제를 탈인산화하여 ABA 신호전달의 양성 조절자인 SnRK2.6의 활성을 억제함으로써 ABA 신호전달 및 ABA-의존적 유전자의 발현을 저해함을 특징으로 하는 AtPR5K2 단백질 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 AtPR5K2 단백질은 ABA의 존재시 PP2C 포스파타제와 SnRK2.6을 유리시켜 SnRK2.6을 활성화 시킨 후 ABA 의존성 유전자 발현을 개시함을 특징으로 하는 AtPR5K2 단백질 조성물.

청구항 4

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 AtPR5K2 단백질의 발현을 저해시킨 가뭄 스트레스 저항성을 지닌 AtPR5K2 단백질 녹아웃 형질전환 식물체.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 아라비도시스 탈리아나 PR5-유사 수용체 키나아제 2(AtPR5K2) 발현을 억제시킨 가뭄 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 가뭄 스트레스 신호전달에 관여하는 AtPR5K2 단백질의 발현을 억제시켜 가뭄 저항성을 증진시킨 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 식물 수용체는 외부 자극으로부터의 신호를 감지하고 이 정보를 세포 내부로 전달한다. 이들 수용체는 신호를 검출하기 위한 외부 리간드-결합 도메인, 세포막에 고정하기 위한 막 투과 도메인 및 신호전달 캐스케이드를 생성하기 위해 세포 내부로 신호를 전달하기 위한 세포 내 도메인의 3개의 주요 도메인으로 구성된다. 환경적 자극으로 인해 발생하는 수많은 신호를 감지하고 전달하기 위해 식물은 막 수용체 키나아제와 수용체-유사 키나아제(RLK)의 큰 계열을 기능적으로 발전시켰다.

[0005] 아라비도시스 탈리아나 게놈에서 RLKs는 610개의 단백질을 44개의 서브 패밀리 및 적어도 16개의 유형으로 나누며 이는 고유한 세포외 도메인 구조와 기능을 지닌다. 식물 RLK는 세포외 도메인 내의 모티프 유형에 따라 상이한 기능을 지닌다; 예를 들면 류신-풍부 반복 RLK(LRR-RLK)의 세포외 도메인은 식물 성장 및 발달에서 다양한 신호 전달 경로에 필요한 단백질-단백질 상호작용에서 중요한 역할을 한다. 멤브레인-스패닝 세린/트레오닌 키나제 모티프를 지니는 S-수용체 키나아제(SRK)는 자기-비호환성에 대한 꽃가루-유래 S-단산형(haplotype) 특이성

의 결정에 관여한다.

- [0007] 렉틴 RLKs(LecRLKs)는 포도당, 만노오스, 과당, 키토비오스(chitobiose) 및 다른 당과 같은 세포외 탄수화물과 서로 상호 작용하며 식물 발달 과정과 다양한 비생물학적 및 생물학적 스트레스에 대해 식물 호르몬을 통해 신호전달 반응 역할을 한다. RLKs의 CRINKLY4(CR4) 계열은 중앙괴사인자 수용체(TNFR) 모티프를 포함하고 식물 성장, 꽃 기관 발달, 종자에서의 호분 형성 및 성별 결정에 필요하다. 반면에 RLK의 세포벽-관련 키나아제(WAK) 계열은 표피성장인자(EGF)-유사 도메인을 보유하며 아라비도시스 내에서 세포 성장, 면역 저항 및 중금속 내성에 필수적인 조절자이다.
- [0009] 병원성-관련 5(PR5) RLKs(PR5Ks)는 다양한 호르몬과 병원성 감염을 통해 활성화된다. 오스모틴은 타우마틴-유사 도메인을 지니는 PR5 계열로 분류된다. 오스모틴은 삼투성 적응 담배 세포 내에서 우세한 단백질(24kDa 단백질)로 확인되었다. 또한, 오스모틴은 외인성 ABA에 대한 반응으로 뿌리에서 합성되고 NaCl의 존재하에 축적된다. 항진균 활성을 지니는 오스모틴 및 오스모틴-유사 단백질(OLP)은 타우마틴-유사 단백질(TLP)의 기본 이소형이며 매우 유사한 아미노산 서열을 공유한다.
- [0011] 그들의 일반적인 타우마틴-유사 도메인 이외에, OLP 및 TLP는 기능하기 위한 2 개의 추가 도메인, 즉 단백질 키나제-유사 도메인 및 이중 작용성 억제제/지질-전달/종자 저장 2S 알부민 도메인을 함유한다. 이러한 단백질은 효소 활성화, 거대 분자의 조립, 단백질의 세포 국소화, 단백질 분해 등 다양한 세포 과정에 관련되어 왔다.
- [0013] 또한 OLP 및 TLP 유전자의 발현은 병원균, 염분, 앱식산(ABA), 가뭄, 추위 및 상처와 같은 다양한 환경 스트레스에 의해 유도되어 스트레스 신호전달에서도 기능 할 수 있음을 시사한다. 이들 단백질의 구조적 특성에 대한 인실리코 분석은 그들이 특정 수용체에 결합한다는 것을 제안한다. 그러나 그들의 결합 파트너의 성질 및 그러한 상호 작용의 분자 및 표현형 결과는 알려져 있지 않다.
- [0015] 식물 호르몬 앱식산(ABA)은 종자 성숙, 종자 휴면, 기문 폐쇄 및 종자 성장을 포함하여 식물 성장 및 발달의 다양한 과정과 관련이 있다. 또한 ABA는 주로 기문 폐쇄를 조절함으로써 추위, 가뭄 및 염분과 같은 비생물학적 스트레스에 대한 식물 적응 메커니즘에서 중요한 역할을 한다. ABA-Insensitive 1(ABI1), ABI2, AtPP2CA/ABA 과민감 발아 3(AHG3), AHG1, Hypersensitive to ABA 1(HAB1) 및 HAB2를 포함하는 단백질 포스파타제 유형 2C(PP2C) 단백질은 ABA 신호전달의 음성적 조절자로 기능한다.
- [0017] ABA의 부재하에 활성화된 PP2C는 SNF1-관련 단백질 키나제 2(SnRK2)에 결합하고 세린 잔기를 탈인산화하여 ABA 신호전달 경로에서 표적을 인산화하는 것을 방지한다. ABA 신호는 PP2C의 포스파타제 활성을 저해하기 위해 ABA 분자와 PP2C 단백질을 모두 결합시켜 ABA 신호전달을 활성화하는 주요 ABA 수용체인 파이라박틴 저항 (PYR)/PYR1-유사(PYL)/ABA 수용체의 조절 요소(RCAR) 단백질에 의해 검출된다.
- [0019] 이는 PP2Cs-SnRK2 복합체로부터 SnRK2를 방출하며, 이는 다른 키나아제에 의한 자가 인산화 및/또는 인산화에 의해 활성화 될 수 있다. 활성화된 SnRK2s는 ABF 전사 인자와 같은 ABA 신호전달에 관여하는 몇 가지 전사 인자를 인산화 시키고 활성화시킨다. PYL, PP2C 및 SnRK2를 포함하는 코어 구성 요소는 'ABA signalosome' 또는 'ABA 코어 신호전달 모듈'로 알려진 신호전달 복합체를 형성한다. 그러나 RLK 매개 신호전달에서 ABA signalosome의 상세한 조절은 추가 연구가 필요하다.
- [0021] 식물체 EST 데이터베이스에서, PR5 계열의 27종 단백질 중 3종의 PR5K는 N-말단 영역에서 타우마틴 도메인을 포함한다.

[0023] 이에 본 발명자들은 ABA-의존 가뭄 스트레스 반응에서 3종의 아라비도시스 PR5-유사 수용체 키나아제(AtPR5Ks)의 역할을 조사한 후 atpr5k2-1 녹아웃 변이체의 가뭄 스트레스 저항성을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0025] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 atpr5k2-1 녹아웃 변이체의 가뭄 스트레스 저항성을 확인코자 한 것이다. 즉 AtPR5K2 단백질의 가뭄 스트레스 동안에 ABA 신호전달의 저해 조절자 역할을 규명함으로써 가뭄 스트레스 저항성을 지닌 atpr5k2-1 녹아웃 형질전환 식물체를 개발코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0027] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 AtPR5K2 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 AtPR5K2 단백질은 타우마틴-유사 도메인, 막 투과 도메인 및 세린-트레오닌 키나제 도메인을 포함하며, 단백질 포스파타제 2C 형(PP2C 포스파타제)의 활성화를 통해 ABA-의존적 가뭄 스트레스 신호전달에 관여함을 특징으로 하는 AtPR5K2 단백질 조성물을 제공하는 것이다.

[0029] 이때 상기 AtPR5K2 단백질은 ABA의 부재시 ABI1(ABA-INSENSITIVE 1) 및 ABI2(ABA-INSENSITIVE 2)와 같은 PP2C 포스파타제를 탈인산화하여 ABA 신호전달의 양성 조절자인 SnRK2.6의 활성을 억제함으로써 ABA 신호전달 및 ABA-의존적 유전자의 발현을 저해함을 특징으로 한다.

[0031] 한편 상기 AtPR5K2 단백질은 ABA의 존재시 PP2C 포스파타제와 SnRK2.6을 유리시켜 SnRK2.6을 활성화 시킨 후 ABA 의존성 유전자 발현을 개시함을 특징으로 한다.

[0033] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 AtPR5K2 단백질의 발현을 저해시킨 가뭄 스트레스 저항성을 지닌 AtPR5K2 단백질 녹아웃 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 효과는 AtPR5K2 단백질의 가뭄 스트레스 동안에 ABA 신호전달의 저해 조절자 역할을 규명함으로써 가뭄 스트레스 저항성을 지닌 atpr5k2-1 녹아웃 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 가뭄 스트레스에 대한 반응으로 atpr5k2-1 녹아웃 변이 및 AtPR5K2-과발현 (AtPR5K2-OX) 식물체의 표현형을 나타낸 것이다.

(A) 야생형(WT), atpr5k2-1 및 AtPR5K2-과발현 식물체(AtPR5K2-OX #1 및 #2)를 3주간 토양에서 충분한 물로 성장시켰다(상단). 이어서 식물체에 11일간 급수를 중지한 후(중단), 식물체에 1일간 재급수 하였다(하단). 가뭄 조건 하에서 WT, atpr5k2-1 및 AtPR5K2-OX #1 및 #2 라인의 생존율을 4회 반복하여 평가하였다(n=48).

(B) 4 주령 WT, atpr5k2-1 및 AtPR5K2-OX #1 및 #2 식물체의 분리된 잎에서 발산 수분 손실을 측정하였다. 표시된 시점에서 신선 중량을 측정하였고, 초기 신선 중량의 백분율에 대해 물 손실을 정규화 하였다. 오차 막대는 3회 독립적인 실험의 표준 편차를 나타낸다. 별표는 WT와 상당한 차이를 의미한다(*, 0.01 <p-값 ≤ 0.01,

스튜던트 t-검정).

도 2는 ABA 스트레스에 반응하는 *atpr5k2-1* 녹아웃 변이체 및 AtPR5K2-과발현(AtPR5K2-OX) 식물체의 표현형을 나타낸 것이다.

(A) WT, *atpr5k2-1* 및 AtPR5K2-OX #1 및 #2 식물체를 0.75 μ M ABA의 존재 및 부재하에 1/2 MS에서 5일간 발아시켰다. ABA 민감도 분석은 각 실험에서 각 라인으로부터 적어도 50개의 종자를 사용하여 3회 수행되었다.

(B) WT, *atpr5k2-1* 및 AtPR5K2-OX #1 및 #2 모종의 떡잎 그린화는 5일 동안 상이한 농도의 ABA를 함유하는 1/2 MS에서 시작되었다. 떡잎 그린화는 파종된 종자의 백분율로 결정되었다($n=50$). 오차 막대는 3회 독립적인 실험의 표준편차를 나타낸다. 별표는 WT와 상당한 차이를 의미한다(*, 0.01 < p -값 $\leq$ 0.01, 스튜던트 t-검정).

도 3은 AtPR5K2의 발현 패턴 및 세포 내 국소화를 나타낸 것이다.

(A) 아라비도시스 탈리아나의 다양한 조직에서 AtPR5K2의 발현을 나타낸 것이다. 야생형 식물의 뿌리, 로제트 잎, 경생 잎, 줄기, 꽃 및 장각으로부터 총 RNA를 추출하였다. AtPR5K2의 전사체 수준을 qRT-PCR을 사용하여 측정하고 내인성 대조 유전자인 TUBULIN2의 발현에 대해 계산하였다. 오차 막대는 각각 3회의 기술적 복제를 지닌 3개의 생물학적 복제의 표준편차를 나타낸다.

(B) 아라비도시스 원형질체에서 AtPR5K2의 세포 내 국소화를 나타낸 것이다. *35S:AtPR5K2-GFP* 및 *Aquaporin-RFP*를 아라비도시스 원형질체에서 공동 발현시키고 공초점 형광 현미경을 사용하여 분석하고 22°C에서 24시간 배양 후 사진을 촬영하였다. 아쿠아포린-RFP는 원형질-막 마커이다. 스케일 바는 10 μ m를 나타낸다.

(C) 원형질 분리 이전과 이후에 *35S:AtPR5K2-GFP*를 발현하는 담배(*Nicotiana benthamiana*) 잎의 표피 세포 내에서 AtPR5K2의 세포 내 국소화를 나타낸 것이다. 표피 세포를 공초점 형광 현미경을 사용하여 분석하고 25°C에서 48시간 배양 후 사진을 촬영하였다. 스케일 바는 20 μ m를 나타낸다. 빨간색 별표는 AtPR5K2-GFP 신호가 Hechtian 가닥에 남아 있음을 나타낸다. 빨간색 화살표는 수축된 원형질막을 가리킨다.

(D) AtPR5K2의 시험관 내 키나제 분석을 나타낸 것이다. 상부 패널은 GST 융합 AtPR5K2 키나제 도메인(wPR5K2KD) 및 GST-융합 변이 유발 AtPR5K2 키나제 도메인(mPR5K2KD)의 개략적인 구조를 나타낸다. 각각의 키나제 도메인을 대장균 내에서 개별적으로 발현시키고 2 μ g 정제된 단백질을 키나제 에세이 완충액에서 인큐베이션하였다. 방사성 표지된 생성물을 SDS-PAGE 겔에서 분리하고 방사능을 사용하여 검출하였다(우측 하부). 전기영동 후, 정제된 생성물을 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하였다(좌측 하부).

도 4는 생체 내 및 시험관 내에서 ABI1, ABI2 및 SnRK2.6과 AtPR5K2의 상호작용을 나타낸 것이다.

(A) 담배(*Nicotiana benthamiana*) 잎에서 공동 발현된 AtPR5K2 및 PP2C의 2분자 형광 보완(BiFC) 분석을 나타낸 것이다. VN 및 VC는 Venus(eYFP)의 N- 및 C- 말단 영역을 각각 나타낸다. 표피 세포를 공초점 형광 현미경을 사용하여 분석하고 25°C에서 48시간 배양 후 사진을 촬영하였다. 스케일 바는 100 μ m를 나타낸다.

(B) AtPR5K2는 PP2C와 복합체를 형성한다. *35S:AtPR5K2-GFP*, *35S:ABI1-HA*, 및 *35S:ABI2-HA*의 각각의 조합은 담배 식물체에서 일시적으로 발현되었다. 단백질을 α -GFP 항체로 면역 침전시키고 SDS-PAGE로 분해시켰다. 면역 블롯은 AtPR5K2를 검출하기 위해 α -GFP 항체 또는 ABI1 및 ABI2를 검출하기 위한 α -HA 항체를 프로브로 사용하였다. 마이너스(-)는 음성 대조군으로서 공 벡터(각각 35S:GFP 또는 35S:HA)를 나타낸다.

(C 및 D) 담배 잎에서 공동 발현된 (C) AtPR5K2 및 SnRK2.6 또는 (D) PYL1의 BiFC 분석을 나타낸 것이다 표피 세포를 공초점 형광 현미경을 사용하여 분석하고 25°C에서 48시간 배양 후 사진을 촬영하였다. 스케일 바는 100 μ m를 나타낸다.

도 5는 ABA 스트레스 신호전달에 대한 AtPR5K2 복합체의 영향을 나타낸 것이다.

10 μ M 외인성 ABA의 존재 또는 부재 하에 담배(*Nicotiana benthamiana*) 잎에서 일시적으로 공동-발현된 AtPR5K2 및 ABI1, ABI2 또는 SnRK2.6의 2분자 형광 보완(BiFC) 분석. VN 및 VC는 Venus(eYFP)의 N- 및 C- 말단 영역을 각각 나타낸다. 표피 세포를 공 초점 형광 현미경을 사용하여 분석하고 ABA의 존재 또는 부재하에 25°C에서 48시간 배양 후 사진을 촬영하였다. 스케일 바는 100 μ m를 나타낸다.

도 6은 AtPR5K2의 겔 내 키나제 분석을 나타낸 것이다.

AtPR5K2 키나제 도메인(wPR5K2KD) 또는 변이된 AtPR5K2 키나제 도메인(mPR5K2KD)의 재조합 융합 단백질을 변형시키고 SDS 겔에서 분리하였다. 내포된 기질로서 재조합 ABI1(A; 좌측), ABI1^{S314A}(A; 우측), ABI2(B; 좌측) 또

는 ABI2^{S304A} (B; 우측)를 사용하여 겔 내 키나제 분석을 수행하였다. GST 태그를 음성 대조군으로 사용하였다.

도 7은 ABA 코어 신호전달에서 AtPR5K2의 제안된 작업 모델을 나타낸 것이다.

AtPR5K2는 N-말단 타우마틴-유사 도메인(적색 박스), 단일 막 투과 도메인(황색 박스) 및 C-말단 Ser/Thr 키나제 도메인(녹색 타원)을 지니는 단일 막 투과 단백질이다. ABA의 부재시 PP2C의 포스포타제 활성은 AtPR5K2의 존적 인산화에 의해 향상된다. 활성화된 PP2C는 SnRK2를 탈인산화하여 활성을 감소시킨다. 따라서 SnRK2에 의해 조절되는 ABA-의존성 유전자 발현이 저해된다.

ABA의 존재하에 AtPR5K2, PP2C 및 SnRK2 사이의 단백질-단백질 상호작용 친 화성이 약화된다. 이는 PP2C 및 SnRK2가 AtPR5K2로부터 방출되어 SnRK2.6이 자가인산화 될 수 있게 유리시키고 ABA-의존성 유전자 발현을 조절하는 전사 인자를 인산화 시킨다는 것을 의미한다. PP2C 및 SnRK2.6의 경우 뚜렷한 채색은 활성 상태를 나타내며 회색은 비활성 상태를 나타낸다. 문자 "P"를 포함하는 빨간색 원은 인산화를 나타낸다.

도 8는 AtPR5K 단백질의 구조적 구성을 나타낸 것이다.

(A) AtPR5K의 보존된 도메인. (B) AtPR5K의 아미노산 서열의 배열. 개별 서열의 유전자좌 번호는 다음과 같다: AtPR5K1, At5g38280; AtPR5K2, At4g18250; AtPR5K3, At1g70250.

도 9는 AtPR5K1, AtPR5K2 및 AtPR5K3의 발현 패턴을 비교한 것이다.

BAR 웹 사이트(<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)에서 아라비도시스 eFP 브라우저를 사용하여 발달 조직에서 AtPR5K1, AtPR5K2 및 AtPR5K3의 발현 패턴을 나타낸 것이다.

도 10은 atpr5k1-1, atpr5k2-1 및 atpr5k3-1 변이체의 동정을 나타낸 것이다.

(A) AtPR5K1, AtPR5K2 및 AtPR5K3 유전자의 스킴 및 각각의 변이주에서의 T-DNA 삽입. 상자는 엑손을 나타내고 선은 인트론을 나타낸다. LP 및 RP는 표 1에 기술된 유전자-특이적 프라이머이며 진단 PCR 분석에 사용되었다. (B) 진단 PCR 분석을 사용한 atpr5k1-1, atpr5k2-1 및 atpr5k3-1 변이체의 유전자형 분석. LB는 T-DNA에 특이적인 좌측 경계 프라이머를 나타내며 WT은 야생형을 나타낸다. (C) 각 변이체에서 AtPR5K1, AtPR5K2 및 AtPR5K3 발현의 RT-PCR 분석. 표 1에 기재된 유전자-특이적 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. TUBULIN2를 로딩 대조군으로서 사용하였다.

도 11은 가뭄 및 ABA 스트레스에 대한 반응으로 atpr5k1-1 및 atpr5k3-1 변이체의 표현형을 나타낸 것이다.

(A) 야생형(WT), atpr5k2-1 및 atpr5k3-1 식물체를 3주 동안 충분한 물로 토양에서 성장시켰다(상부 패널). 이어서 식물체에 급수를 13일간 중단한 후(중간 패널) 식물체에 하루 동안 재급수 하였다(하부). 가뭄 조건에서 WT, atpr5k2-1 및 atpr5k3-1 식물체의 생존율을 4회 반복하여 평가하였다(n=48).

(B) 4주령 WT, atpr5k2-1 및 atpr5k3-1 식물체에서 수분 손실을 측정하였다. 표시된 시점에서 신선 중량을 측정하였으며 초기 신선 중량의 백분율에 대해 수분 손실을 정규화 하였다. 오차 막대는 3회의 독립적인 실험에서 표준 편차를 나타낸다.

(C) WT, atpr5k2-1 및 atpr5k3-1 식물체를 5일간 상이한 농도의 ABA를 함유하는 1/2 MS에서 발아시킨 후, 그 표현형을 촬영하였다. ABA 민감도 분석은 각 실험에서 각 라인으로부터 적어도 50개의 종자를 사용하여 3회 수행하였다. (D) (C)에 나타난 WT, atpr5k2-1 및 atpr5k3-1 모종의 떡잎 그린화를 평가하였다. 떡잎 그린화는 파종된 종자의 백분율로 결정되었다(n=50). 오차 막대는 3회의 독립적인 실험에서 표준 편차를 나타낸다.

도 12는 가뭄 스트레스 조건에서 WT 및 atpr5k2-1 식물체에서 RD29B의 발현을 나타낸 것이다.

WT 및 atpr5k2-1 변이체의 10일령 모종을 장일 조건(16 시간 명/8시간 암) 하에 1/2 MS 배지에서 성장시켰다. 1 시간 탈수를 겪은 WT 및 atpr5k2-1 모종으로부터 총 RNA를 추출하였다. TUBULIN2의 발현을 정규화를 위한 내부 대조군으로 사용하였다. 오차 막대는 각각 3회의 기술적 복제를 지닌 3회의 생물학적 복제의 SD를 나타낸다. 별표는 0분 시점의 값과의 유의미한 차이를 나타낸다(**, p-값 ≤ 0.01, 스튜던트 t-검정).

도 13은 AtPR5K2-OX 식물에서 AtPR5K2의 발현을 나타낸 것이다.

WT, atpr5k2-1 및 AtPR5K2- 과발현(AtPR5K2-OX) 형질전환 식물체의 RT-PCR 분석. 표 1에 기재된 유전자-특이적 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. TUBULIN2를 로딩 대조군으로서 사용하였다.

도 14는 외인성 ABA에 대한 반응으로 AtPR5K2가 기공 폐쇄에 매개함을 나타낸 것이다.

(A) WT, *atpr5k2-1* 및 *AtPR5K2-OX* 식물의 잎 표피에서 외인성 ABA 처리 전 후의 기공 폐쇄를 평가하였다. 10 일령 WT, *atpr5k2-1* 및 *AtPR5K2-OX* 식물체의 잎을 기공 개방 용액에서 2시간 동안 배양하고 ABA의 부재(-ABA; 0 μ M ABA) 또는 존재(+ABA; 5 μ M ABA) 하에 1/2 MS 배지로 2시간 동안 처리하였다. 잎 표피의 기공 폐쇄는 스캐닝 현미경을 사용하여 관찰되었다. 눈금 막대는 50 μ m를 나타낸다.

(B) ABA 처리 전후의 WT, *atpr5k2-1* 및 *AtPR5K2-OX* 식물체에서 기공 개방(폭/길이)의 측정. 각 샘플로부터 적어도 50개의 가드 세포가 측정되었다. 오차 막대는 3회의 독립적인 실험으로부터의 표준편차를 나타낸다. 별표는 WT와 상당한 차이를 나타낸다(*, 0.01 < p-값 $\leq$ 0.01, 스튜던트 t-검정).

도 15는 다양한 비생물학적 스트레스에 반응하는 *atpr5k2-1* 변이체 및 *AtPR5K2-OX* 식물체의 표현형을 나타낸 것이다.

WT, *pr5k2-1* 및 *AtPR5K2-OX* (#1 및 #2) 식물체를 상이한 농도의 (A) NaCl, (B) 만니톨, (C) KCl 및 (D) LiCl을 함유하는 1/2 MS에서 5일간 발아시켰다. 떡잎 그린화는 파종된 종자의 백분율로 측정되었다(n=100). 오차 막대는 3회의 독립적인 실험에서의 표준 편차를 나타낸다.

도 16은 가뭄 스트레스에 대한 PR5K2의 발현을 나타낸 것이다.

장일 조건(16시간 명/8시간 암) 하에 1/2 MS 배지에서 성장시킨 10일령 WT 묘목에 가뭄 스트레스를 부여하였다. 1시간 탈수를 겪은 WT 식물체로부터 총 RNA를 추출하였다. TUBULIN2의 발현을 정규화를 위한 내부 대조군으로 사용하였다. 오차 막대는 각각 3회의 기술적 복제를 지닌 3회의 생물학적 복제의 SD를 나타낸다. 별표는 0분 시점의 값과의 유의미한 차이를 나타낸다(**, p-값 $\leq$ 0.01, 스튜던트 t-검정).

도 17은 *AtPR5K2*, ABI1 또는 ABI2와 공백터 사이의 2분자 형광 보완(BiFC) 분석을 나타낸 것이다.

(A) *AtPR5K2VN* 및 담배(*Nicotiana Benthamiana*) 잎에서 일시적으로 공동-발현된 PP2C ABI1VC 및 ABI2VC를 사용한 공 백터(YFPVC 및 YFPVN)의 BiFC 분석. VN 및 VC는 각각 Venus(eYFP)의 N- 및 C-말단 영역을 나타낸다. 표피 세포를 공초점 형광 현미경을 사용하여 분석하고 25°C에서 48시간 인큐베이션 후 사진을 촬영하였다. 스케일 바는 100 μ m를 나타낸다.

도 18은 *AtPR5K2*의 겔 내 키나제 분석을 나타낸 것이다.

AtPR5K2 키나제 도메인(wPR5K2KD) 또는 변이된 *AtPR5K2* 키나제 도메인 (mPR5K2KD)의 재조합 융합 단백질을 변성시키고 SDS 겔에서 분리하였다. *AtPR5K2* 키나제 도메인의 기질로서 재조합 SnRK2.6을 사용하여 겔 내 키나제 분석을 수행하였다. GST 태그를 음성 대조군으로 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 세포 표면 수용체는 환경으로부터의 신호를 감지하여 세포 내부로 전달한다. 아라비도시스 탈리아나 PR5-유사 수용체 키나아제(*AtPR5K*) 서브 패밀리는 PR5 단백질과 서열 유사성을 공유하는 세포 외 도메인을 지니는 3종의 멤버로 구성된다. 본 발명에서는 식물체 가뭄-스트레스 신호 전달에서 *AtPR5K2*의 역할에 대해 규명한다. *AtPR5K2*는 주로 잎에서 발현되고 원형질막에 국소화 되어 있다. *atpr5k2-1* 변이체는 탈수 스트레스에 대한 내성을 나타내었으며 *AtPR5K2* 과발현 식물체는 가뭄에 과민 반응을 나타내었다.

[0041] 2분자형광보완(Bimolecular fluorescence complementation) 에세이 결과는 *AtPR5K2*가 ABA-INSENSITIVE 1(ABI1) 및 ABI2와 같은 단백질 포스파타제 2C형(PP2C) 및 SNF1-관련 단백질 키나아제 2(SnRK2.6) 단백질과 물리적으로 상호 작용하며 함께 엡식산(ABA)의 신호전달의 개시에 관여한다는 것을 나타낸다. 그러나 이러한 상호 작용은 외인성 ABA의 처리에 의해 저해되었다. 또한 *AtPR5K2*는 SnRK2.6이 아닌 ABI1 및 ABI2를 인산화하는 것으로 규명되었다. 결론적으로 이러한 결과는 *AtPR5K2*가 ABI1 및 ABI2의 인산화를 통해 ABA-의존적인 가뭄-스트레스 신호 전달에 참여하는 것을 의미한다.

[0043] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

- [0045] (1) 가뭄 스트레스 신호전달에 관여하는 AtPR5K2 수용체 키나제의 동정
- [0047] 쌍자엽식물과 단자엽식물 모두에 존재하는 PR5K는 신호 펩타이드, 막 투과 도메인, 세포 외 타우마틴-유사 도메인 및 세포 내 Ser/Thr 키나제 도메인으로 구성된다. 3종의 아라비도시스 PR5K 유전자가 존재하며 AtPR5K1(At5g38280), AtPR5K2(At4g18250) 및 AtPR5K3(At1g70250)이다.
- [0049] AtPR5K1의 아미노산 서열은 AtPR5K2와 55.0%의 상동성을 지니며 AtPR5K3와 56.2%의 상동성을 지니는 반면에 AtPR5K2의 아미노산 서열은 AtPR5K3와 50.6%의 상동성을 지닌다(도 8B). BAR 웹사이트(<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)의 아라비도시스 eFP 브라우저로 PR5Ks 유전자의 발현을 분석하였다. 발달 조직에서 PR5K1, PR5K2 및 PR5K3 유전자의 발현 패턴은 서로 매우 상이하였다(도 9).
- [0051] AtPR5K의 생물학적 기능을 이해하기 위해 본 발명자들은 게놈 PCR 및 RT-PCR 분석을 사용하여 3개의 AtPR5K 유전자, 즉 *atpr5k1-1*, *atpr5k2-1* 및 *atpr5k3-1*의 동형 접합체 T-DNA 삽입 Nickout 변이체를 분리하였다(도 10). 이들 3개의 *atpr5k* 변이체는 정상적인 성장 조건 하에서 WT 식물과 유의미한 표현형 차이를 나타내지 않았다(도 1A 및 도 11A).
- [0053] 그 후 가뭄 스트레스를 포함하여 다양한 비생물학적 스트레스에 대한 식물체 반응과 PR5K의 잠재적 연관성을 시험하였다. 가뭄 내성을 시험하기 위해 3주령 WT 및 *atpr5k* Nickout 변이체 식물에 11일 동안 물을 주지 않았으며 다시 급수하였다. 재급수 1일 후, 가뭄 내성 표현형이 WT 식물체(약 54.17% 생존율)와 비교하여 *atpr5k2-1* 변이체 식물체(약 81.25% 생존율)에서 관찰되었다(도 1A). 그러나 *atpr5k1-1*과 *atpr5k3-1* 변이체의 가뭄 반응은 WT 식물과 유사했다.
- [0055] 이것은 AtPR5K2가 가뭄 스트레스 신호전달에 역할을 한다는 것을 의미한다(도 11). 또한, *atpr5k2-1* 변이체에서 RD29B의 mRNA 발현은 가뭄 스트레스 조건 하의 WT 식물에서보다 더 높았다(도 12). 스트레스 신호전달에서 AtPR5K2의 역할을 추가로 확인하기 위해, 본 발명자들은 WT 식물체에 전체길이 AtPR5K2 cDNA를 도입함으로써 AtPR5K2-과발현(AtPR5K2-OX) 식물체를 생성하였다.
- [0057] 상이한 수준의 AtPR5K2 발현을 지니는 2개의 독립적인 AtPR5K2-과발현 라인(#1 및 #2)을 선택하였다(도 13). 11 일간의 가뭄 스트레스와 1일 재급수를 받았을 때, AtPR5K2-과발현 식물체는 WT 식물체보다 가뭄 반응에 대한 과민증(약 2.08~4.17% 생존율)을 나타내었다(도 1A).
- [0059] 본 발명자들은 4주령 식물체에서 분리된 잎의 신선 중량의 변화를 시간에 따라 측정함으로써 WT, *atpr5k2-1* 및 AtPR5K2-과발현 식물체의 증발 수분 손실을 더욱 조사하였다. WT보다 *atpr5k2-1* 식물체에서 물이 더 느리게 손실되었으나 AtPR5K2-과발현 식물체에서는 물이 더 빨리 손실되었다(도 1B). 또한 ABA의 부재 하에 WT, *atpr5k2-1* 및 AtPR5K2-과발현 식물체에서의 기공 개방은 유사하였다.
- [0061] 그러나 ABA의 존재 하에 *atpr5k2-1* 변이체에서의 기공 개방은 WT에서보다 훨씬 현저하게 감소되었다. AtPR5K2-과발현 식물체의 기공 개방은 WT의 기공 개방과 유사하였다(도 14). 또한 본 발명자들은 다른 비생물학적 스트레스에 대한 반응에서 AtPR5K2의 잠재적인 관련성을 시험하였다. 그러나 *atpr5k2-1* 변이체와 AtPR5K2-과발현 식물 모두 NaCl, KCl, LiCl 및 만니톨 스트레스에 반응하여 WT와 명백한 표현형 차이를 나타내지 않았다(도 15). 이러한 결과는 AtPR5K2가 가뭄 스트레스에 대한 식물 반응의 조절에 특히 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

[0063] (2) AtPR5K2는 ABA 신호전달을 저해하는 역할을 한다

[0065] 식물의 물 부족은 식물 성장과 생산성에 큰 영향을 미친다. 물이 부족한 조건에서 초기 식물체 반응은 ABA의 축적을 조절하는 것이다. AtPR5K2가 ABA 신호전달에 관여 하는지를 결정하기 위해 외인성 ABA로 처리될 때 *atpr5k2-1* 변이체 및 AtPR5K2-과발현 식물체의 표현형을 조사하였다. 0.75 μ M ABA를 함유한 배지에 위치시켰을 때 *atpr5k2-1* 종자의 발아는 영향을 받지 않았으나 AtPR5K2-과발현 종자의 발아는 WT와 비교하여 현저하게 향상되었다(도 2A).

[0067] 0.5 μ M ABA의 존재 하에서 발아한 후, *atpr5k2-1* 변이체는 WT보다 느린(대략 2.7 배) 떡잎 그린화를 나타내었다. 그러나 AtPR5K2-과발현 식물체의 떡잎 그린화는 WT의 것보다 약 1.56 배 빠르다(도 2B). 이러한 결과는 AtPR5K2가 종자 발아 동안 ABA 신호의 음성 조절자로서 기능한다는 것을 나타낸다.

[0069] (3) AtPR5K2의 기능적 특성

[0071] AtPR5K2의 분자 기능을 연구하기 위해, 로제트 잎, 뿌리, 줄기, 경생 잎, 꽃 및 장각을 포함한 다양한 아라비도시스 조직에서 qRT-PCR을 사용하여 AtPR5K2의 발현 패턴을 분석하였다. 본 발명자들은 AtPR5K2가 로제트 및 경생 잎에서 고도로 발현됨을 발견하였다(도 3A). 또한 AtPR5K2의 mRNA 수준은 가뭄 스트레스에 대해 극적으로 유도되었다(도 16).

[0073] AtPR5K2 단백질의 세포 내 국소화를 조사하기 위해 전체길이 AtPR5K2 cDNA를 GFP와 융합시키고 CaMV 35S 프로모터의 제어 하에 발현시켰다. 적색 형광 단백질과 융합된 아쿠아포린을 원형질 막 마커로 사용하였다. *35S:AtPR5K2-GFP* 및 *35S:Aquaporin-RFP*는 아라비도시스 원형질체에서 일시적으로 공-발현되었으며 GFP 신호는 원형질막 신호와 중첩되는 것으로 관찰되었고 이는 단백질이 원형질막에 국소화 되어 있음을 시사한다(도 3B).

[0075] 그것의 원형질 막 위치를 확인하기 위해, 본 발명자들은 AtPR5K2-GFP를 발현하는 담배 표피 세포에서 원형질 분리를 유도하였다. GFP 형광은 Hechtian 가닥을 조직하는 세포벽으로부터 식물 원형질체의 명확한 분리에서 여전히 관찰되었으며, 이는 원형질 분리 후 세포벽 및 원형질 막과 관련되었다(도 3C). 이들 데이터는 AtPR5K2가 원형질 막에 국소화 되었음을 나타내었다.

[0077] AtPR5K 중 하나인 AtPR5K1은 시험관 내에서 자가 촉매 키나제 활성을 지니는 것으로 알려져 있다. AtPR5K2가 자가 인산화 활성을 지니는지 여부를 측정하기 위해 AtPR5K2(wPR5K2KD)의 단백질 키나제 도메인-암호화 서열을 GST와 융합시키고 이를 대장균으로 발현시켰다. 정제된 재조합 wPR5K2KD 단백질을 방사능성 [γ -³²P]ATP와 반응시키고 SDS-PAGE를 사용하여 분리하였다. 생성된 겔 상의 분자량 65kDa에 근접한 위치에서 인산화 된 밴드가 검출되었으며(도 3D) 이는 재조합된 wPR5K2KD 단백질의 분자량에 상응하는 것이다.

[0079] AtPR5K2의 키나제 활성을 방해하기 위해 키나제 도메인의 라이신 잔기(아미노산 위치 352)를 아르기닌으로 치환하였다. 이 라이신 잔기는 많은 키나제에서 ATP 결합에 중요한 것으로 알려져 있다. 변이체 PR5K2KD 단백질(mPR5K2KD)의 키나제 활성은 wPR5K2KD의 키나제 활성과 비교하여 유의미하게 감소되었으며(도 3D), 이는 AtPR5K2가 기능성 키나제 활성을 지님을 나타낸다.

[0081] (4) AtPR5K2는 ABA 신호전달 경로에서 단백질 포스파타제 2C 및 SnRK2.6과 상호 작용한다

- [0083] PYR/PYL/RCAR ABA 수용체, PP2C 및 SnRK2를 포함하는 ABA signalosome의 코어 구성 요소는 환경 스트레스에 대한 ABA 신호 전달 및 식물 적응 반응에서 중요한 역할을 한다. PP2C, ABI1 및 ABI2는 ABA 신호전달의 음성 조절자 역할을 하며 SnRK2.6/OST1은 ABA-의존 기공 폐쇄의 양성 조절자 역할을 한다.
- [0085] AtPR5K2가 ABA signalosome 매개 신호에 관여하는지 여부를 시험하기 위해 BiFC 분석을 사용하여 AtPR5K2와 PP2C 간의 생체 내 상호작용을 시험하였다. 전체길이 AtPR5K2 cDNA 서열은 Venus 단백질의 N-말단 단편 (AtPR5K2^{VN})에 융합된 반면에 ABI1 또는 ABI2는 Venus의 C-말단 단편(각각 ABI1^{VC} 또는 ABI2^{VC})에 융합되었다. AtPR5K2^{VN}이 ABI1^{VC} 또는 ABI2^{VC}와 공동 발현될 때 담배 표피 세포의 원형질 막에서 형광 신호가 검출되었으나(도 4A), 이러한 컨스트럭트가 공 YFP 또는 YFP^{VN} 벡터와 공동 발현될 때 형광 신호는 검출되지 않았다(도 17).
- [0087] ABI1 또는 ABI2와 AtPR5K2의 상호작용을 추가로 확인하기 위해, 본 발명자들은 담배 잎에서 생체 내 Co-IP 분석을 수행하였다. 전체길이 AtPR5K2 서열은 GFP에 융합된(AtPR5K2-GFP) 반면에 ABI1 및 ABI2는 HA 태그 단백질에 개별적으로 융합되었다(ABI1-HA 또는 ABI2-HA). AtPR5K2-GFP과 ABI1-HA 또는 ABI2-HA이 공동 침윤된 담배 잎의 총 단백질을 α-GFP 항체로 면역침전 시키고, 용해된 침전물을 α-HA 항체를 사용하여 검출함으로써 AtPR5K2가 ABI1 및 ABI2와 생체 내에서 상호 작용함을 나타내었다(도 4B).
- [0089] 앞서 PP2C와 PYL 또는 SnRK2의 물리적 상호작용이 ABA 신호전달 동안 확인되었다. AtPR5K2와 SnRK2.6 또는 PYL1 사이의 상호작용을 시험하기 위해, Venus의 C-말단 단편에 융합된 SnRK2.6 또는 PYL1(각각 SnRK2.6^{VC} 및 PYL1^{VC})을 사용하여 BiFC 분석을 수행하였다.
- [0091] AtPR5K2^{VN} 및 SnRK2.6^{VC}를 공동 발현하는 표피 세포의 원형질 막에서 형광 신호가 검출되었다(도 4C). 그러나 AtPR5K2^{VN}과 PYL1^{VC} 사이의 상호 작용은 감지되지 않았다(도 4D). 종합하면, 이들 결과는 AtPR5K2가 PP2C 및 SnRK2.6과 상호 작용함으로써 ABA 코어 신호전달의 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.
- [0093] (5) ABA는 AtPR5K2와 PP2C 및 SnRK2.6의 상호작용에 영향을 미친다.
- [0095] ABA의 부재 하에, PP2C는 ABA 코어 신호전달에서 SnRK2.6의 자가 인산화 및 활성화를 억제하는 반면에 세포 내 ABA는 PP2C와 PYL 수용체 사이의 생체 내 상호작용을 향상시킨다. 따라서 ABA의 존재 하에 SnRK2.6에 대한 PP2C의 억제 효과가 제거되어, SnRK2.6을 활성화시켜 ABA 반응을 자극하기 위해 이온 채널 또는 AREB/ABF 전사 인자를 인산화 시킨다.
- [0097] 세포 ABA 수준이 PP2Cs 또는 SnRK2.6과 AtPR5K2의 상호 작용에 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위해 담배 세포에서 AtPR5K2^{VN}을 ABI1^{VC}, ABI2^{VC} 또는 SnRK2.6^{VC}와 공동 발현시킴으로써 외인성 ABA의 존재 및 부재하에 BiFC 분석을 수행 하였다. AtPR5K2^{VN}/ABI1^{VC}, AtPR5K2^{VN}/ABI2^{VC} 및 AtPR5K2^{VN}/SnRK2.6^{VC}를 공동 발현하는 담배 잎에서의 형광 신호는 10 μM 외인성 ABA의 존재 조건하에서 ABA의 부재시 보다 약한 것으로 나타났다(도 5). 이는 ABA의 증가된 수준이 AtPR5K2와 ABI1, ABI2 및 SnRK2.6의 상호작용을 방해함을 시사한다.
- [0099] (6) AtPR5K2는 PP2C ABI1 및 ABI2를 인산화 한다.
- [0101] AtPR5K2가 ABI1, ABI2 또는 SnRK2.6을 특이적으로 인산화할 수 있는지 여부를 조사하기 위해, 겔 내 키나제 분

석을 수행하여 AtPR5K2에 의한 ABI1-GST, ABI2-GST 및 SnRK2.6-GST의 인산화를 시험하였다. PR5K2의 키나제 도메인(wPR5K2KD)은 ABI1 및 ABI2를 인산화 시켰다(도 6). 그러나 SnRK2.6 또는 GST가 기질로 사용될 때 인산화는 검출되지 않았다(도 6 및 도 18). 또한 ABI1 및 ABI2의 인산화는 PR5K 키나제 도메인의 변이에 의해 크게 약화되었다(mPR5K2KD; 도 6).

[0103] APR1 및 ABI2가 AtPR5K2에 대한 기질로서 기능함을 추가로 확인하기 위해, 본 발명자들은 식물 단백질 인산화 데이터베이스(<http://www.p3db.org>)를 사용하여 PP2C의 아미노산 서열을 분석함으로써 ABI1 및 ABI2의 추정 인산화 부위를 조사 하였다. ABI1(Ser-314) 및 ABI2(Ser-304) 내의 추정 인산화 부위는 알라닌(각각 ABI1^{S314A} 및 ABI2^{S304A})으로 대체되었다.

[0105] 본 발명자들은 AtPR5K2 키나제 도메인에 대한 기질로서 ABI1^{S314A} 및 ABI2^{S304A}를 사용하여 겔 내 키나제 분석을 수행하였으며(도 6), wPR5K2KD에 의한 그들의 인산화가 WT ABI1 및 ABI2 단백질과 비교하여 크게 약화되었음을 나타내었다(도 6). 이러한 결과는 AtPR5K2가 ABA 코어 신호전달 동안에 그들의 활성을 조절하기 위해 ABI1 및 ABI2 포스포타제를 인산화시킴을 시사한다.

[0107] AtPR5K2는 ABA 신호를 음성 조절한다.

[0109] 몇몇 RLK는 비생물학적 스트레스 신호전달에서 기능하는 것으로 알려져 있다. 일부 RLK는 ABA 신호전달과 관련되어 있다. 그러나 이들이 ABA 코어 신호전달 경로와 상호작용하는 메커니즘은 이전에는 규명되지 않았다. AtRPK1 발현은 ABA, 가뭄, 염분 및 추위와 같은 다양한 비생물학적 스트레스에 의해 빠르게 유도되며 이는 RPK1이 비생물학적 스트레스 반응을 매개함을 나타낸다. 반면에 ABA- 및 Ca²⁺-활성화 단백질 키나제인 프롤린-풍부 익스텐신-유사 수용체 키나제 4(PERK4)는 ABA 신호전달의 초기 단계에서 기능적으로 특성화되었다.

[0111] 시스테인-풍부 반복(CRR) RLK36(CRK36)은 수용체-유사 세포질 키나제 1(ARCK1)과 상호작용함으로써 ABA 및 삼투 스트레스 신호전달을 음성 조절한다. BRI1-관련 수용체 키나제(BAK1)은 SnRK2.6과 상호작용하여 ABA에 반응하여 기공 폐쇄를 유도하며 이는 ABA 반응 동안의 ABI1 기능과는 대조적이다. RECEPTOR DEAD KINASE 1(RDK1)은 ABA-의존적 비생물학적 스트레스 신호전달의 양성 조절자이다.

[0113] 본 발명자들은 ABA-의존 가뭄 스트레스 신호전달에서 AtPR5K2의 역할을 규명하였다. 원형질막에서 ABI1 및 ABI2와 상호 작용하고(도 4) 시험관 내에서는 인산화시키는 것으로 나타났다(도 3 및 도 6). ABI1 및 ABI2는 전형적인 PP2C 단백질 및 ABA 코어 신호전달 경로의 주요 음성 조절자이다. 또한 AtPR5K2-과발현 식물체는 ABA로 처리될 때의 WT보다 유의미하게 높은 수준의 딱잎 그린이 이루어졌다(도 2). 이러한 결과는 AtPR5K2가 PP2C의 기능을 조절하는 ABA 신호전달의 음성 조절자로 작용할 수 있음을 시사한다.

[0115] 연령에 따른 잎 노화는 다양한 환경 스트레스 및 ABA와 같은 다양한 식물 호르몬의 변화와 관련이 있다. 최근 식물체에서 가뭄으로 유도된 잎 노화가 지연될 때 가뭄 내성이 향상되는 것으로 보고되었다. 아라비돕시스 RPK1, 수용체 단백질 키나제 1은 ABA-유도 및 연령-의존적 잎 노화를 매개한다. ABA 수용체 PYL9는 가뭄 내성 능력 및 ABA-유도 잎 노화를 개선시켰다.

[0117] 이러한 결과는 ABA-의존적 가뭄 스트레스 신호전달과 잎 노화 사이의 상호 연관성을 제안한다. 이러한 관찰에 기초하여 AtPR5K2가 ABA-의존적 가뭄 스트레스 신호전달과 잎 노화 사이에서 상호 연관된 역할을 할 가능성이 존재한다.

- [0119] AtPR5K2는 ABA signalosome에서 PP2C를 직접 인산화하나 SnRK2.6은 그렇지 않다.
- [0121] 앞서 AtPR5K1이 키나제 활성을 지니는 것으로 보고되었으나, 밀접하게 관련된 AtPR5K2 단백질의 기능은 이전에 알려지지 않았다. AtPR5K2는 타우마틴-유사 도메인, 막 투과 도메인 및 Ser/Thr 키나제 도메인을 포함하며, 후자는 AtPR5K1과 유사성이 높다(도 8). AtPR5K1과 마찬가지로 AtPR5K2는 효율적인 키나제 활성을 나타냄으로 키나제 도메인에 라이신 잔기가 필요하다(도 3D).
- [0123] 본 발명자들은 AtPR5K2에 대한 잠재적인 표적 기질로서 ABA 코어 신호전달 경로의 여러 주요 구성 요소를 조사하였다. 앞서 ABI1, ABI2 및 SnRK2.6은 ABA 반응 동안 인산화에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다. 그러나 이 인산화의 메커니즘은 규명되지 않았다.
- [0125] 본 발명자들은 AtPR5K2가 ABI1과 ABI2를 시험관 내에서 인산화 시켰지만(도 6), SnRK2.6을 기질로 사용하지 않았다는 것을 나타내었다(도 18). 또한 본 발명자들은 AtPR5K2에 의해 사용된 ABI1 (Ser-314) 및 ABI2 (Ser-304)의 추정 인산화 부위를 확인하였다(도 6). 본 발명자들의 지식에 따르면, AtPR5K2는 ABI1 및 ABI2를 인산화시키는 것으로 알려진 최초의 식물성 신규 수용체 키나제이다.
- [0127] ABA 코어 신호전달에서 AtPR5K2의 제안된 작업 모델
- [0129] 본 명세서에서 본 발명자들은 ABA 코어 신호전달 경로에 신규한 주요 구성 요소인 AtPR5K2를 추가하였다(도 7). ABA의 부재시 AtPR5K2는 PP2C 및 SnRK2.6과 상호작용하지만 PYL1 ABA 수용체와 상호작용하지는 않는다.
- [0131] 활성 AtPR5K2는 탈인산화를 통해 ABI1 및 ABI2와 같은 PP2C 포스파타제를 인산화하여 ABA 신호전달의 양성 조절자인 SnRK2.6의 활성을 억제한다. 이는 ABA의 부재시 AtPR5K가 ABA 신호전달 및 ABA-의존적 유전자의 발현을 방해한다는 것을 의미한다. 가뭄과 같은 스트레스 조건 하에서 증가된 세포 내 ABA는 AtPR5K2로부터 PP2C 및 SnRK2.6을 분리시킨다(도 5 및 도 7).
- [0133] 방출된 PP2C는 ABA 및 PYL 수용체 모두에 직접 결합하여 불활성화 된다. 그 다음에 SnRK2.6 키나제는 자가 인산화에 의해 활성화되고 ABRE/ABF 전사 인자를 인산화하여 ABA-의존적 유전자의 발현을 유도하여 다양한 비생물학적 스트레스에 대한 식물체 내성을 향상시킨다(도 7).
- [0135] 본 발명자들은 가뭄 스트레스에 대한 식물체 반응 중의 ABA 코어 신호전달에서 AtPR5K2, PR5-유사 수용체 키나제의 역할을 확인하고 규명하였다. AtPR5K2-과발현 식물체는 가뭄 스트레스에 과민하고 및 외인성 ABA에 내성이 있어, 이는 AtPR5K2가 ABA-의존 가뭄 스트레스 신호전달을 매개함을 시사한다. 본 발명자들의 분자 및 생화학적 결과는 정상적인 성장 조건 하에서 기공 폐쇄의 주 요인인 PP2Cs 및 SnRK2.6의 인산화 상태를 조절함으로써 AtPR5K2가 ABA 코어 신호전달과 ABA-의존적 유전자 발현을 불활성화함을 시사한다.
- [0137] 그러나 비생물학적 스트레스에 반응하여 AtPR5K2는 PP2C를 방출하고 SnRK2.6을 유리시켜 ABA 신호전달을 촉진시킴으로써 ABA 코어 신호전달 캐스케이드 및 ABA-의존 유전자 발현을 작동시킨다. 본 발명자들의 결과는 ABI1 및 ABI2와 같은 PP2C 포스파타제를 인산화 함으로써 ABA 코어 신호전달의 주요한 음성 조절자로서 AtPR5K2가 중요한 역할을 함을 나타낸다.

- [0139] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0141] 인실리코 분석
- [0143] TAIR(<https://www.arabidopsis.org/>)의 아미노산 서열 분석 프로그램을 사용하여 동족체 유전자를 검색하였다. ClustalW(<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) 및 Plant Protein Phosphorylation DataBase(<http://www.p3db.org>)를 사용하여 단백질의 다중 서열 정렬을 수행하였다.
- [0145] (실시예 1) 식물 재료 및 성장 조건
- [0147] 본 발명에 사용된 아라비도시스 탈리아나 야생형(WT)은 Col-0 생태형이며 모든 변이 및 유전자 과발현 형질전환 식물체는 Col-0 배경을 지닌다. pr5k1-1 (Salk_142707), pr5k2-1 (GK_321B01) 및 pr5k3-1 (GABI_254G07) 변이체는 아라비도시스 생물 자원 센터(ABRC; pr5k1-1) 및 GABI collection(pr5k2-1 및 pr5k3-1)으로부터 획득하였다. 동형접합 변이체는 T-DNA 좌측 경계 프라이머(LBb1.3) 및 2쌍의 PR5K-특이적 프라이머를 사용하여 게놈 PCR 분석으로 분리되었다. 다양한 변이체의 유전자형 분석에 사용된 실험 프라이머의 서열을 표 1에 나타내었다.
- [0149] 아라비도시스 종자를 70% 에탄올과 2% 차아염소산나트륨 용액(Yakuri pure chemicals, Kyoto, 일본)으로 5분간 멸균시킨 후, 멸균된 물로 5회 세척하였다. 암실 내에서 4℃에서 3일간 층화 시킨 후, 종자를 0.6% 한천 및 1.5% 수크로스를 함유하는 1/2-강도 Murashige and Skoog(MS) 플레이트(pH 5.7) 상에 분주하고, 23℃에서 16시간 명/8시간 암의 광 주기로 성장 챔버 내에서 성장시켰다.
- [0151] (실시예 2) 생리학적 분석
- [0153] 가뭄 민감도를 시험하기 위해 충분한 물로 토양에서 자란 3주령 식물에 11일 또는 13일 동안 물을 주지 않았다. 다시 물을 준 후, 가뭄 처리된 식물의 회복을 모니터링 하였다. 가뭄 실험은 각각의 실험에서 각 라인에 대해 적어도 12개의 식물체를 사용하여 4회 반복하였다. 수분 손실을 측정하기 위해 토양에서 자란 4주령 식물체에서 잎을 떼어 내고 페트리 디쉬에 놓았다. 신선 중량을 지시된 시간과 물 손실 백분율로 주기적으로 측정하였다. 물 손실 분석은 각각의 실험에서 각 라인에 대해 적어도 15개의 식물체를 사용하여 3회 반복하였다.
- [0155] 떡잎 그린화의 백분율을 측정하기 위해 모든 실험 식물체의 종자를 동시에 수확하고 상이한 농도의 ABA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국) 및 NaCl, 만니톨, KCl 및 LiCl과 같은 다른 비생물학적 스트레스의 존재 또는 부재하에 0.6% 한천 및 1.5% 수크로스를 함유하는 1/2-강도 MS 플레이트(pH 5.7)에서 성장시켰다. 떡잎 그린화는 성장 후 결정되었다. 떡잎 그린화의 백분율은 각각의 복제에서 각 라인에 대해 적어도 48개의 묘목을 사용하여 3개의 생물학적 복제로부터 획득되었다.
- [0157] (실시예 3) PR5K2-과발현 형질전환 식물체의 생성
- [0159] PR5K2-과발현 형질전환 식물체를 생성하기 위해, PR5K2 cDNA의 전체길이를 PCR을 사용하여 WT로부터 증폭시키고 pMDC83 게이트웨이 벡터(Thermo Fisher Scientific, MA, 미국)에 클로닝하였으며, 이는 하이그로마이신 내성 유전자 및 GFP 융합 서열을 함유한다. 아라비도시스 식물체는 아그로박테리움 튜메파시엔스-매개 방법(Clough and Bent, 1998)을 사용하여 형질전환 시켰다. PR5K2-과발현 형질전환 식물체를 30 µg/L 하이그로마이신

(Merck, NJ, 미국)을 함유한 1/2 MS 배지에서 선택하였고 표 1에 열거된 유전자-특이적 프라이머를 사용한 RT-PCR을 사용하여 PR5K2 발현 수준을 분석하였다.

[0161] (실시예 4) 정량 RT-PCR 분석

[0163] RNeasy Plant Mini 키트(Qiagen, Hilden, 독일)를 사용하여 제조자 지침에 따라 다른 아라비도시스 조직으로부터 전체 RNA를 추출하고 정제하였다. 또한 DNaseI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국)로 처리하여 게놈 DNA 오염물질을 제거하였다. RT-PCR 및 qRT-PCR 분석의 경우, 제조자 프로토콜에 따라 SuperScript II(Thermo Fisher Scientific, MA, 미국)를 사용한 cDNA 합성을 위해 2 μ g의 총 RNA를 사용하였다.

[0165] qRT-PCR 분석은 SYBR Green Supermix(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, 미국)를 사용하여 수행되었으며, 상대 유전자 발현 수준은 CFX384 실시간 PCR 검출 시스템(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, 미국)을 사용하여 자동 계산되었다. qRT-PCR 수행 조건은 다음과 같다: 95 $^{\circ}$ C에서 10분, 이어서 95 $^{\circ}$ C에서 10초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초의 50 사이클. TUBULIN2의 발현을 내인성 대조군으로 사용하였다. qRT-PCR 실험은 3회의 생물학적 복제에서 수행되었으며, 각각 3회의 기술적 복제가 수행되었다. 사용된 유전자 특이 프라이머는 표 1에 열거되어 있다.

[0167] (실시예 5) PR5K2의 세포 내 국소화를 결정하기 위한 일시적 분석

[0169] 전체 길이 PR5K2 cDNA를 슈퍼폴더 녹색 형광 단백질(sGFP)을 함유하는 sGFP 벡터 플라스미드의 XbaI 및 BamHI 부위로 클로닝하여 CaMV 35S 프로모터의 제어 하에 키메라 GFP-융합 컨스트럭트를 생성하였다. PR5K2의 세포 내 국소화를 조사하기 위해 PR5K2-sGFP를 PEG-매개 형질전환을 사용하여 아라비도시스 원형질체에 도입하였다. 플라즈마 막에서 PR5K2의 국소화를 확인하기 위해, PR5K2-GFP를 함유하는 pMDC83 벡터를 아그로박테리움 튜메파시엔스(GV3101 균주)로 형질전환 시켰다. 형질전환된 세포를 3주령 담배(Nicotiana benthamiana) 식물체의 잎에 침투시켰다.

[0171] PR5K2-GFP-침투된 잎을 작은 조각으로 자르고 오스모티컴(osmoticum)을 함유하는 효소 용액(만니톨 및 MgSO₄) 및 보호제(CaCl₂)에 1시간 동안 담가서 원형질 분리시켰다. 형광 신호를 공초점 레이저 주사 현미경(Olympus FV1000; Olympus, Tokyo, 일본) 상에서 GFP 필터(여기, 488 nm; 방출, 510 nm) 및 RFP 필터(여기, 543 nm; 방출, 581 nm)를 사용하여 검출하였다. 명 시야(BF)의 과장 범위는 GFP의 경우 30nm, RFP의 경우 100nm 이다. 공초점 레이저는 GFP의 경우 아르곤, RFP의 경우 Green HeNe를 사용하였다.

[0173] (실시예 6) 키나아제 분석

[0175] PR5K2 키나제 도메인(wPR5K2KD) 및 변이된 PR5K2 키나제 도메인(mPR5K2KD)의 서열을 전체길이 PR5K2로부터 PCR 및 서열-특이적 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. mPR5K2KD 키나제 도메인은 키나제 도메인의 리신 잔기를 알라닌으로 전환시키는 자리-지정 변이 방법을 사용하여 생성되었다. wPR5K2KD 및 mPR5K2KD 서열을 pGEX5X-1 벡터의 EcoRI 및 SalI 부위에 클로닝하여 GST 발현을 제공하였다.

[0177] GST-융합 제조합 단백질을 대장균(BL21 균주)으로 발현시키고 글루타티온 세파로즈 4B(GE Healthcare, Chicago, IL, 미국)를 사용하여 제조자 지침에 따라 정제하였다. GST 단백질을 대조군으로 사용하였다. 시험관 내 자가 인산화 분석을 위해, 20 mM HEPES(pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 2mM MnCl₂ 및 1 μ Ci의 [γ -³²P]ATP(3000Ci/mmol)를 함

유하는 키나제 완충액 내에서 2 μ g의 제조합 단백질을 30℃에서 30분간 배양하였다. SDS-PAGE를 사용하여 반응 생성물을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 분리한 후, 인산화된 단백질을 자가방사법을 사용하여 검출하였다.

[0179] 겔 내 키나제 분석은 이전에 기술된 바와 같이 키나아제 기질로서 ABI1 또는 ABI2 중 어느 하나의 0.1 mg/mL로 매입된 10% 폴리아크릴아마이드 SDS-PAGE 겔 및 약간의 변형을 사용하여 수행하였다. 변이 유발된 ABI1 및 ABI2 단백질은 키나아제 도메인의 세린 잔기를 알라닌으로 전환시키는 자리-지정 변이 방법을 사용하여 생성되었다. GST, wPR5K2KD 또는 mPR5K2KD로 전기영동 한 후, 25mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.5mM DTT, 0.1mM Na₃VO₄, 5mM NaF, 5%건조 무지방 우유 및 0.1% Triton X-100를 함유하는 세척 완충액으로 3회 세척하였다.

[0181] SDS를 제거한 후, 25mM Tris-HCl(pH 7.5), 2mM EGTA, 12mM MgCl₂, 1mM DTT 및 0.1mM Na₃VO₄를 함유하는 반응 완충액 중에서 겔을 30분간 실온에서 배양하였다. 반응 시료를 동일한 반응 완충액 내에서 250nM ATP와 50 μ Ci의 [γ -³²P]ATP(3000Ci/mmol)와 혼합한 후 실온에서 1.5시간 동안 배양하였다. 자기방사법을 사용하여 ABI1 및 ABI2 인산화를 시각화 하였다.

[0183] (실시예 7) 담배 잎에서의 2분자 형광 보완(BiFC) 분석

[0185] BiFC 분석은 아그로박테리움-침투 방법을 사용하여 수행되었다. PR5K2, ABI1, ABI2, SnRK2.6 및 PYR1의 전체길이 서열은 바이너리 게이트웨이 벡터 *pDEST^{GW}-VYNE* 또는 *pDEST^{GW}-VYCE*로 클로닝 되었다. Venus eYFP의 N-말단 단편(YFP^{VN}; eYFP의 1-173 아미노산)은 PR5K2에 융합되었으며 C-말단 단편(YFP^{VC}; eYFP의 156-239 아미노산)은 BiFC 분석에 사용된 추정 상호작용 파트너에 융합되었다.

[0187] 4주령 *N. benthamiana* 식물의 잎을 침투 완충액 내에서 *pDEST^{GW}-VYNE-PR5K2* (*PR5K2^{VN}*) 및 *pDEST^{GW}-VYCE-ABI1* (*ABI1^{VC}*), *pDEST^{GW}-VYCE-ABI2* (*ABI2^{VC}*), *pDEST^{GW}-VYCE-SnRK2.6* (*SnRK2.6^{VC}*) 또는 *pDEST^{GW}-VYCE-PYR1* (*PYR1^{VC}*)와 p19 플라스미드를 보유하는 아그로박테리움 튜메파시엔스(OD₆₀₀=0.5)와 함께 공동-침윤시켰다. 2일간의 인큐베이션 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Olympus FV1000; Olympus, Tokyo, 일본) 상에서 GFP 필터(여기, 488 nm; 방출, 510 nm)를 사용하여 형광 신호를 검출하였다.

[0189] (실시예 8) 공동-면역침전(Co-IP) 분석

[0191] PCR을 사용하여 ABI1 및 ABI2 cDNA의 전체길이를 WT로부터 증폭시키고, Basta 저항성 유전자 및 HA 융합 서열을 함유하는 pEarleyGate 301 게이트웨이 벡터(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 미국)에 클로닝 하였다. PR5K2-GFP 및 ABI1-HA 또는 ABI2-HA 단백질을 모두 발현하는 동일한 양의 *N. benthamiana* 잎으로부터의 총 단백질을 100mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM NaCl, 1% NP-40, 1mM EDTA, 3mM DTT, 2mM Na₂VO₃, 2mM NaF, 50mM MG132 및 프로테아제 억제제 콕테일(Roche, Basel, 스위스)로 구성된 추출 배지에서 추출하였다.

[0193] 단백질 A 아가로스(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 미국)에 가교 결합된 α -GFP를 전체 단백질 추출물에 첨가하고 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 전기영동 후, 래트 α -HA 항체(Roche, Basel, 스위스)와 토끼 α -GFP 항체(Abcam, Cambridge, UK)를 사용하여 면역 블로팅을 수행하였다. ECL 검출 시약(GE Healthcare, Chicago, IL, 미국) 및 ChemiDoc™ 시스템(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, 미국)을 사용한 화학 발광을 사용하여 항원 단백질을 검출하였다.

표 1

본 발명의 프라이머 목록

명칭	서열 (5'→3')	목적
<i>atpr5k1-1</i> LP	GTTCCAAATCCTCCTTTACCG (서열번호: 2)	변이체 유전형질 분석
<i>atpr5k1-1</i> RP	TCGTGGATGGTTACAACCTTC (서열번호: 3)	
<i>atpr5k2-1</i> LP	ATGACGAAGAGGTCGCCATTAATC (서열번호: 4)	
<i>atpr5k2-1</i> RP	TTAAACCGCTTCCACAGTATATTGGT (서열번호: 5)	
<i>atpr5k3-1</i> LP	CACGTTTTGTCCGTCTAGCTC (서열번호: 6)	
<i>atpr5k3-1</i> RP	CCTTGCTCCAATCATCTCAAG (서열번호: 7)	
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC (서열번호: 8)	
GABI-Kat LB	CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC (서열번호: 9)	
attB1 adapter	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT (서열번호: 10)	플라스미드 클로닝
attB2 adapter	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT (서열번호: 11)	
AtPR5K2-attB1	AAAAAGCAGGCTTAATGACGAAGAGGTCG (서열번호: 12)	
AtPR5K2-attB2-1	AGAAAGCTGGGTCAACCGCTTCCACAGTA (서열번호: 13)	
AtPR5K2-attB2-2	AGAAAGCTGGGTCTTAAACCGCTTCC (서열번호: 14)	
ABI1-attB1	AAAAAGCAGGCTTAATGGAGGAAGTATCTCCG (서열번호: 15)	
ABI1-attB2	AGAAAGCTGGGTCTCAGTTCAAGGGTTTGCTCT (서열번호: 16)	
ABI2-attB1	AAAAAGCAGGCTTAATGGACGAAGTTTCTCCT (서열번호: 17)	
ABI2-attB2	AGAAAGCTGGGTCTCAATTCAAGGATTGCTCT (서열번호: 18)	
SnRK2.6-attB1	AAAAAGCAGGCTTTATGGATCGACCAGTGAGT (서열번호: 19)	
SnRK2.6-attB2	AGAAAGCTGGGTTTCACATTGCGTACACAATC (서열번호: 20)	
PYR1-attB1	AAAAAGCAGGCTTTATGCCTTCGGAGTTAACA (서열번호: 21)	
PYR1-attB2	AGAAAGCTGGGTTTCACGTCACCTGAGAACCA (서열번호: 22)	
AtPR5K2KD-F	GAATTCATGTTGAAACGTTATAGCTTTG (서열번호: 23)	자리 지정 변이
AtPR5K2KD-R	GTCGACAACCGCTTCCACAGTATAT (서열번호: 24)	
mAtPR5K2KD-F	CGAGATATTGCTCTGAGAATCTTGAAA (서열번호: 25)	
mAtPR5K2KD-R	TGACTCTTTCAAGATTCTCAGAGCAAT (서열번호: 26)	
mABI1-F	GCCATGTCGAGAGCCATTGGCGATAGATAC TT (서열번호: 27)	
mABI1-R	AAGTATCTATCGCCAATGGCTCTCGACATGGC (서열번호: 28)	
mABI2-F	TCGCAATGTCAAGAGCCATTGGCGATAGATAC (서열번호: 29)	
mABI2-R	GTATCTATCGCCAATGGCTCTTGACATTGCGA (서열번호: 30)	
AtPR5K1-qRT-F	GACGCTTTACTCTACGAATTTCAAG (서열번호: 31)	RT-PCR 및 qRT-PCR
AtPR5K1-qRT-R	CCTCTAGATTCCCCTCTAACATCTC (서열번호: 32)	
AtPR5K2-qRT-F	AGCCTCGAGTTTCGGTTACAA (서열번호: 33)	
AtPR5K2-qRT-R	AAGCACGGTCGAAGTTCTGT (서열번호: 34)	
AtPR5K3-qRT-F	CACGTCCATCAATGTCAAGG (서열번호: 35)	
AtPR5K3-qRT-R	TGAGTTGGTGGAGCAGAGTG (서열번호: 36)	
TUBULIN2-F	AGCAAATGTGGGACTCCAAG (서열번호: 37)	
TUBULIN2-R	CACCTTCTTCATCCGAGTT (서열번호: 38)	

[0195]

본 발명의 프라이머 목록

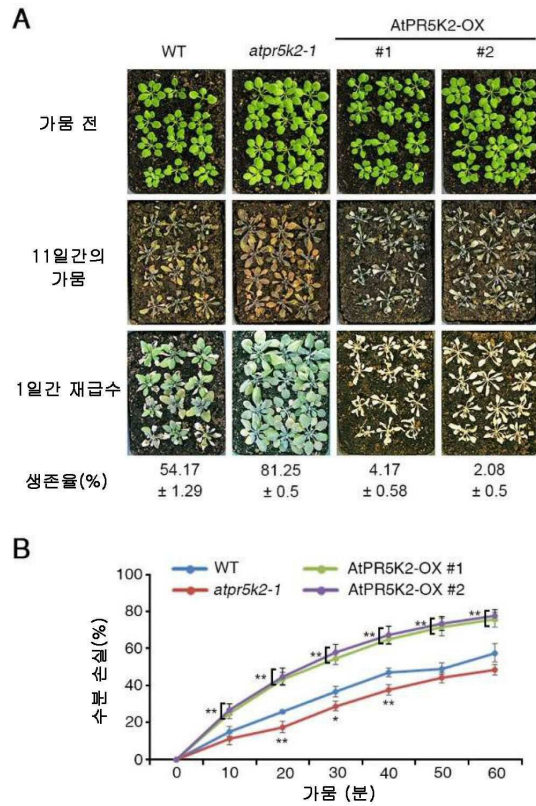
명칭	서열 (5'→3')	목적
<i>atpr5k1-1</i> LP	GTTCCAAATCCTCCTTTACCG (서열번호: 2)	변이체 유전형질 분석
<i>atpr5k1-1</i> RP	TCGTGGATGGTTACAACCTTC (서열번호: 3)	
<i>atpr5k2-1</i> LP	ATGACGAAGAGGTCGCCATTAATTC (서열번호: 4)	
<i>atpr5k2-1</i> RP	TTAAACCGCTTCCACAGTATATTGGT (서열번호: 5)	
<i>atpr5k3-1</i> LP	CACGTTTTGTCCGTCTAGCTC (서열번호: 6)	
<i>atpr5k3-1</i> RP	CCTTGCTCCAATCATCTCAAG (서열번호: 7)	
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC (서열번호: 8)	
GABI-Kat LB	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC (서열번호: 9)	
attB1 adapter	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT (서열번호: 10)	플라스미드 클로닝
attB2 adapter	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT (서열번호: 11)	
AtPR5K2-attB1	AAAAAGCAGGCTTAATGACGAAGAGGTCG (서열번호: 12)	
AtPR5K2-attB2-1	AGAAAGCTGGGTCAACCGCTTCCACAGTA (서열번호: 13)	
AtPR5K2-attB2-2	AGAAAGCTGGGTCTTAAACCGCTTCC (서열번호: 14)	
ABI1-attB1	AAAAAGCAGGCTTAATGGAGGAAGTATCTCCG (서열번호: 15)	
ABI1-attB2	AGAAAGCTGGGTCTCAGTTCAAGGGTTTGTCT (서열번호: 16)	
ABI2-attB1	AAAAAGCAGGCTTAATGGACGAAGTTTCTCCT (서열번호: 17)	
ABI2-attB2	AGAAAGCTGGGTCTCAATTCAGGATTTGTCT (서열번호: 18)	
SnRK2.6-attB1	AAAAAGCAGGCTTTATGGATCGACCAAGTGTGAGT (서열번호: 19)	
SnRK2.6-attB2	AGAAAGCTGGGTTTCACATTGCGTACACAATC (서열번호: 20)	
PYR1-attB1	AAAAAGCAGGCTTTATGCCTTCGGAGTTAACA (서열번호: 21)	
PYR1-attB2	AGAAAGCTGGGTTTCACGTCACCTGAGAACCA (서열번호: 22)	
AtPR5K2KD-F	GAATTCATGTTGAAACGTTATAGCTTTG (서열번호: 23)	자리 지정 변이
AtPR5K2KD-R	GTCGACAACCGCTTCCACAGTATAT (서열번호: 24)	
mAtPR5K2KD-F	CGAGATAITGCTCTGAGAATCTTGAAA (서열번호: 25)	
mAtPR5K2KD-R	TGACTCTTTCAAGATTCTCAGAGCAAT (서열번호: 26)	
mABI1-F	GCCATGTCGAGAGCCATGGCGATAGATAC TT (서열번호: 27)	
mABI1-R	AAGTATCTATCGCCAATGGCTCTCGACATGGC (서열번호: 28)	
mABI2-F	TCGCAATGTCAAGAGCCATTGGCGATAGATAC (서열번호: 29)	
mABI2-R	GTATCTATCGCCAATGGCTCTTGACATTGCGA (서열번호: 30)	
AtPR5K1-qRT-F	GACGCTTTACTCTACGAATTTCAAG (서열번호: 31)	RT-PCR 및 qRT-PCR
AtPR5K1-qRT-R	CCTCTAGATTCCCCTCTAACATCTC (서열번호: 32)	
AtPR5K2-qRT-F	AGCCTCGAGTTTCGGTTACAA (서열번호: 33)	
AtPR5K2-qRT-R	AAGCACGGTCGAAGTTCTGT (서열번호: 34)	
AtPR5K3-qRT-F	CACGTCCATCAATGTCAAGG (서열번호: 35)	
AtPR5K3-qRT-R	TGAGTTGGTGGAGCAGAGTG (서열번호: 36)	
TUBULIN2-F	AGCAAATGTGGGACTCCAAG (서열번호: 37)	
TUBULIN2-R	CACCTTCTTCATCCGAGTT (서열번호: 38)	

[0196]

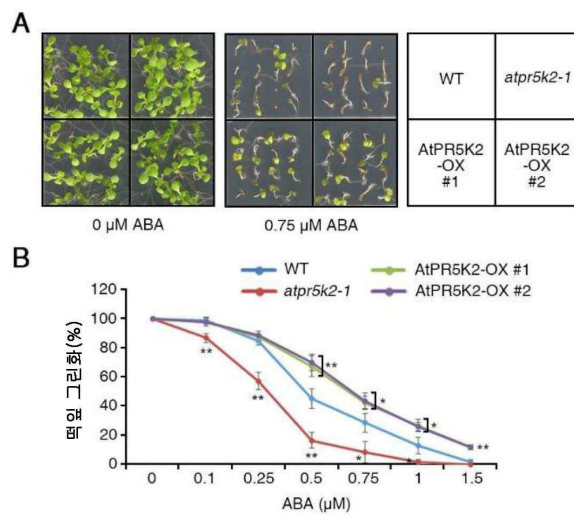
[0197]

도면

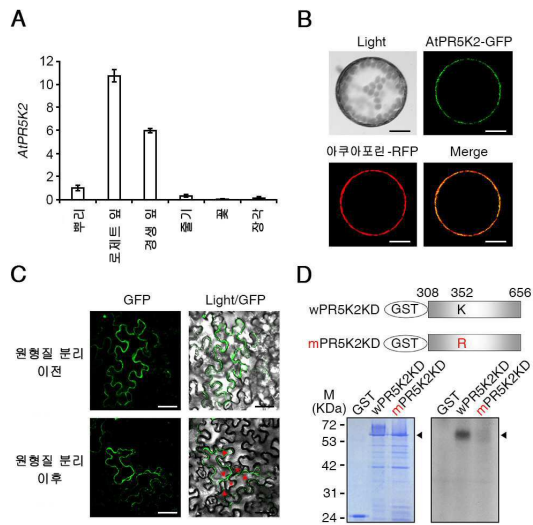
도면1



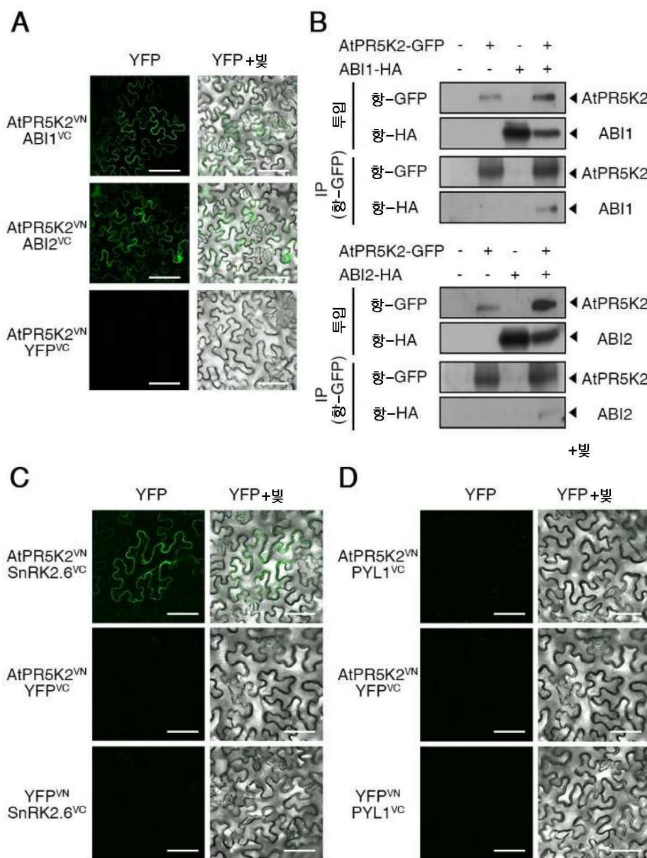
도면2



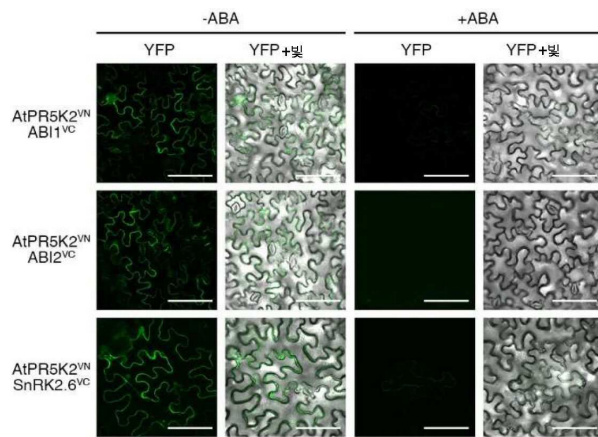
도면3



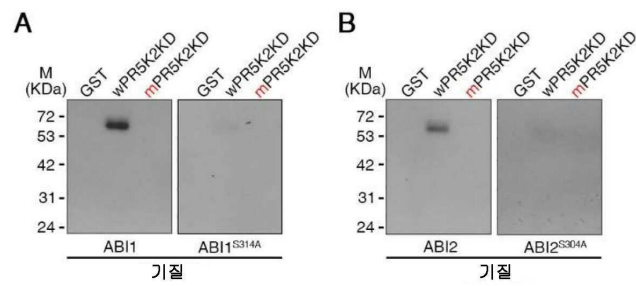
도면4



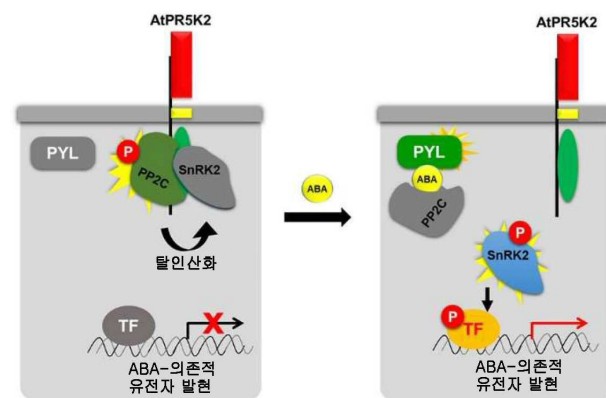
도면5



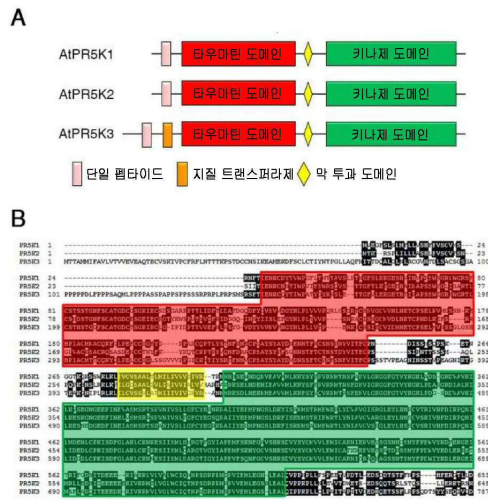
도면6



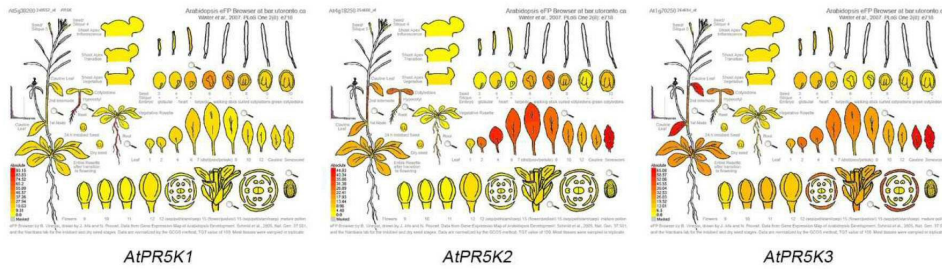
도면7



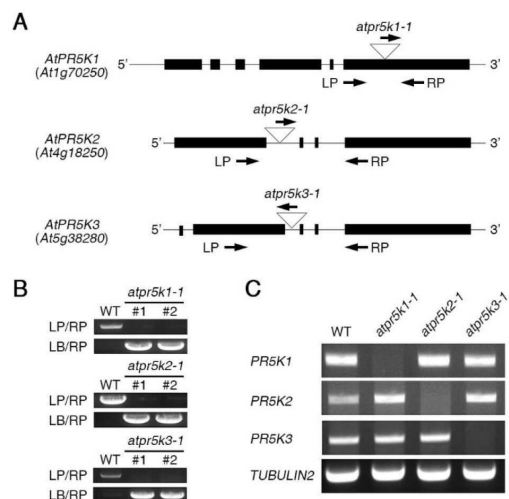
도면8



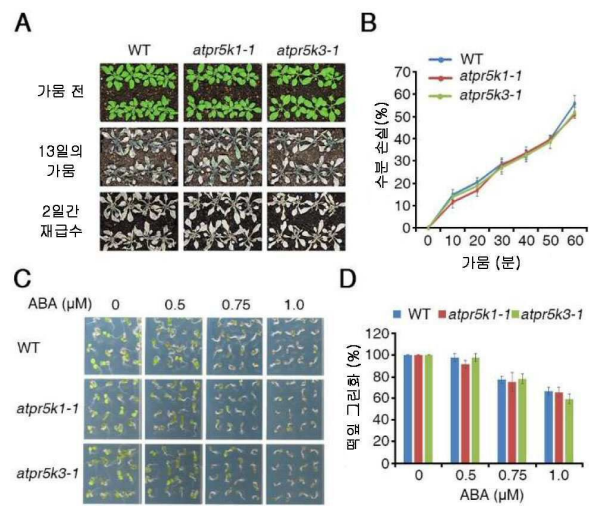
도면9



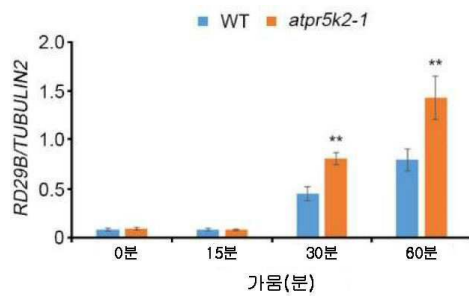
도면10



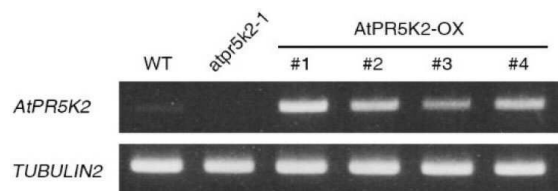
도면11



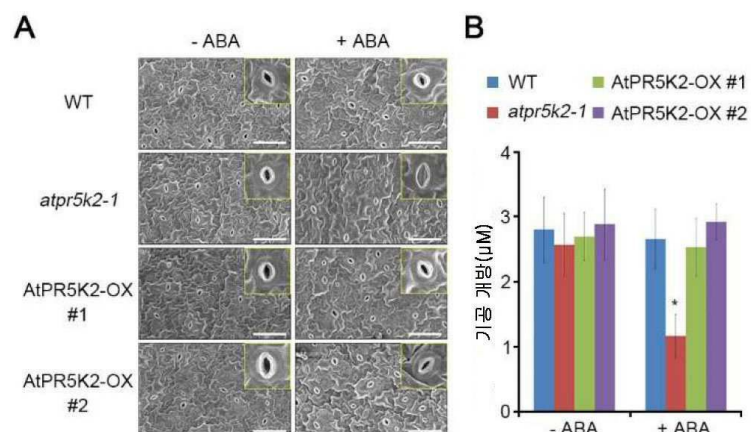
도면12



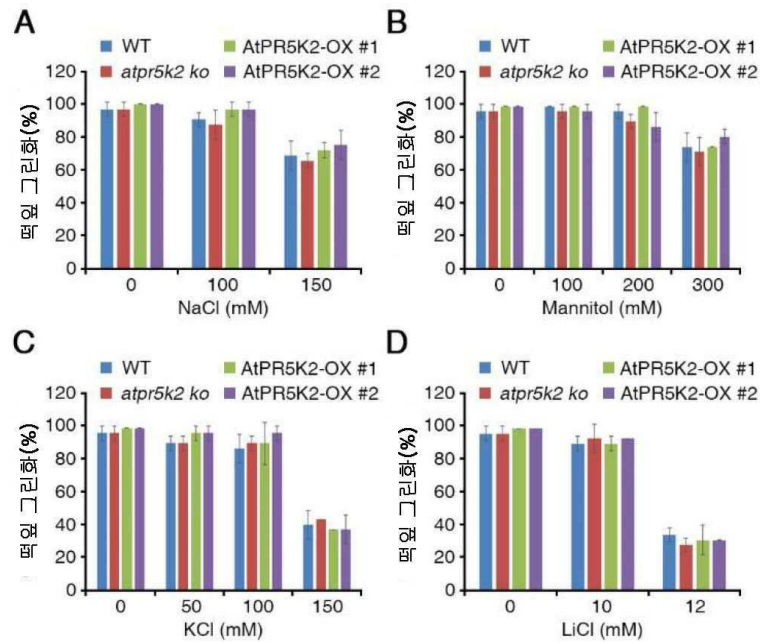
도면13



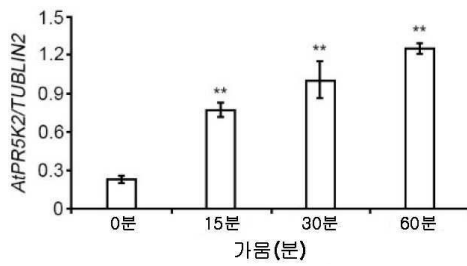
도면14



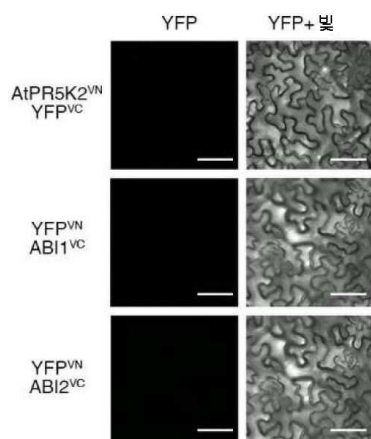
도면15



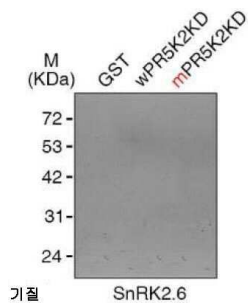
도면16



도면17



도면18



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Drought resistant transgenic plant inhibiting AtPR5K2 protein expression

<130> KP-1031

<160> 38

<170> Kopatent In 3.0

<210> 1

<211> 689

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Lys Lys His Lys Ala Arg Lys Asn Ile Tyr Asn Thr Lys Cys Ile

1 5 10 15

Val Val Arg Ile Tyr Ser Leu Phe Gly Thr Phe Trp Phe Ser Phe Lys

20 25 30

Pro Met Thr Lys Arg Ser Pro Leu Ile Leu Leu Leu Ala Ser His Leu

35 40 45

Phe Val Ser Gly Val Phe Ser Asn Ser Ile Ile Thr Ile Glu Asn Lys

50 55 60

Cys Asn Asn Thr Ile Trp Pro Val Ile Phe Ser Trp Arg Ser Gln Val

65 70 75 80

Ser Thr Thr Gly Phe Thr Leu Lys Thr Gly Glu Glu Arg Ala Ile Asn

85 90 95

Ala Pro Ser Ser Trp Tyr Gly Leu Ile Ser Ala Arg Thr Leu Cys Ser

100 105 110

Asn Asp Ser Thr Gly Asn Phe Ser Cys Ala Thr Gly Asp Cys Glu Ser
 115 120 125
 Gly Glu Ile Glu Cys Pro Gly Thr Tyr Lys Trp Ser Pro Val Thr Tyr
 130 135 140
 Val Ile Phe Arg Ile Asp Asp Gly Gln Ile Asn Ser Tyr Ile Ile Ser
 145 150 155 160
 Leu Glu Phe Gly Tyr Asn Leu Pro Leu Thr Val Val Pro Ser Asn Pro
 165 170 175
 Ala Cys Ile Ser Ser Gly Cys Met Val Asp Leu Asn Lys Thr Cys Pro
 180 185 190
 Asn Asp Leu Lys Glu Phe Ser Arg Arg Gly Leu Val Ala Cys Lys Ser
 195 200 205
 Ala Cys Arg Gln Ser Ala Ser Asp Glu Asn Cys Cys Thr Asn Tyr Phe
 210 215 220
 Lys Tyr Lys Gln Thr Cys Lys Pro Thr Pro Tyr Val Gln Asn Phe Asp
 225 230 235 240
 Arg Ala Cys Pro Ser Ala Tyr Ser Tyr Pro Phe Ser Gly Asn Asn Ser
 245 250 255
 Thr Phe Thr Cys Thr Asn Ser Thr Asp Tyr Val Ile Thr Phe Cys Pro
 260 265 270
 Ser Ser Ile Pro Asn Thr Thr Ser Ser Ser Met Ala Gln Leu Pro Gln
 275 280 285
 Pro Lys His Asn Ser Leu Arg Lys Leu Lys Pro Ile Leu Gly Gly Ser
 290 295 300
 Ala Ala Leu Ile Val Leu Ile Ser Ile Val Val Ile Ala Leu Val Val
 305 310 315 320
 Arg Ala Arg His Ala Lys Arg Lys Ser Glu Leu Asn Asp Glu Asn Ile
 325 330 335
 Glu Ala Val Val Met Leu Lys Arg Tyr Ser Phe Glu Lys Val Lys Lys
 340 345 350
 Met Thr Asn Ser Phe Asp His Val Ile Gly Lys Gly Gly Phe Gly Thr
 355 360 365

Val Tyr Lys Gly Lys Leu Pro Asp Ala Ser Gly Arg Asp Ile Ala Leu
370 375 380

Lys Ile Leu Lys Glu Ser Lys Gly Asn Gly Glu Glu Phe Ile Asn Glu
385 390 395 400

Leu Val Ser Met Ser Arg Ala Ser His Val Asn Ile Val Ser Leu Phe
405 410 415

Gly Phe Cys Tyr Glu Gly Ser Gln Arg Ala Ile Ile Tyr Glu Phe Met
420 425 430

Pro Asn Gly Ser Leu Asp Lys Phe Ile Ser Glu Asn Met Ser Thr Lys
435 440 445

Ile Glu Trp Lys Thr Leu Tyr Asn Ile Ala Val Gly Val Ala Arg Gly
450 455 460

Leu Glu Tyr Leu His Asn Ser Cys Val Ser Lys Ile Val His Phe Asp
465 470 475 480

Ile Lys Pro Gln Asn Ile Leu Ile Asp Glu Asp Leu Cys Pro Lys Ile
485 490 495

Ser Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Cys Lys Lys Lys Glu Ser Ile Ile
500 505 510

Ser Met Leu Asp Ala Arg Gly Thr Val Gly Tyr Ile Ala Pro Glu Met
515 520 525

Phe Ser Lys Asn Tyr Gly Gly Val Ser His Lys Ser Asp Val Tyr Ser
530 535 540

Tyr Gly Met Val Val Leu Glu Met Ile Gly Ala Thr Lys Arg Glu Glu
545 550 555 560

Val Glu Thr Ser Ala Thr Asp Lys Ser Ser Met Tyr Phe Pro Asp Trp
565 570 575

Val Tyr Glu Asp Leu Glu Arg Lys Glu Thr Met Arg Leu Leu Glu Asp
580 585 590

His Ile Ile Glu Glu Glu Glu Glu Glu Lys Ile Val Lys Arg Met Thr
595 600 605

Leu Val Gly Leu Trp Cys Ile Gln Thr Asn Pro Ser Asp Arg Pro Pro

610 615 620
Met Arg Lys Val Val Glu Met Leu Glu Gly Ser Arg Leu Glu Ala Leu
625 630 635 640
Gln Val Pro Pro Lys Pro Leu Leu Asn Leu His Val Val Thr Asp Trp
645 650 655
Glu Thr Ser Glu Asp Ser Gln Gln Thr Ser Arg Leu Ser Thr Gln Ser
660 665 670

Leu Leu Glu Arg Lys Thr Arg Ser Asn Tyr Gln Tyr Thr Val Glu Ala
675 680 685
Val

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer

<400> 2
gttccaaatc ctcctttacc g 21

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer

<400> 3
tcgtggatgg ttacaacctt c 21

<210>
4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer

<400> 4
atgacgaaga ggtcgccatt aattc 25

<210> 5

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 5
 ttaaaccgct tccacagtat attggt 26
 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 6
 cacgttttgt ccgtctagct c 21

 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 7
 ccttgetcca atcatctcaa g 21
 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 8
 atttgccga tttcggaac 19
 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 9

cccatttgga cgtaaatgta gacac

25

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 10

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggct

29

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 11

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggt

29

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 12

aaaaagcagg cttaatgacg aagaggtcg

29

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 13

agaaagctgg gtcaaccgct tccacagta

29

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	Primer	
<400>	14	
agaaagctgg	gtcttaaacc	gcttcc
		26
<210>	15	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	15	
aaaaagcagg	cttaatggag	gaagtatctc
		cg
		32
<210>	16	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	16	
agaaagctgg	gtctcagttc	aagggtttgc
		tct
		33
<210>	17	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	17	
aaaaagcagg	cttaatggac	gaagtttctc
		ct
		32
<210>	18	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	18	
agaaagctgg	gtctcaattc	aaggatttgc
		tct
		33
<210>	19	
<211>	32	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 19
 aaaaagcagg ctttatggat cgaccagtga gt 32
 <210> 20
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 20
 agaaagctgg gtttcacatt gcgtacacaa tc 32
 <210> 21
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 21
 aaaaagcagg ctttatgcct tcggagttaa ca 32

 <210> 22
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 22
 agaaagctgg gtttcacgtc acctgagaac ca 32
 <210> 23
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 23
 gaattcatgt tgaaacgtta tagctttg 28
 <210> 24

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 24
 gtcgacaacc gcttcacag tatat 25

<210> 25
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 25
 cgagatattg ctctgagaat cttgaaa 27

<210> 26
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 26
 tgactctttc aagattctca gagcaat 27

<210> 27
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 27
 gccatgtcga gagccattgg cgatagatac tt 32

<210> 28
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 28

aagtatctat cgccaatggc tctcgacatg gc	32
<210> 29	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 29	
tcgcaatgtc aagagccatt ggcgatagat ac	32
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 30	
agcctcgagt tcggttaca	20
<210> 31	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 31	
gacgctttac tctacgaatt tcaag	25
<210> 32	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 32	
cctctagatt cccctctaac atctc	25
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	

<400> 33
agcctcgagt tcggttaca 20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 34
aagcacggtc gaagttctgt 20

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 35
cacgtccatc aatgtcaagg 20

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 36
tgagttgggt gagcagagtg 20

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 37
agcaaagtgt ggactccaag 20

<210> 38
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 38

caccttcttc atccgcagtt

20