(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A01G 7/06 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년12월21일
(11) 등록번호 10-0660616
(24) 등록일자 2006년12월15일

(21) 출원번호 10-2006-0010126
(22) 출원일자 2006년02월02일
심사청구일자 2006년02월02일

(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자 류지연
대전 서구 흑석동 359

정석원
대전 유성구 노은동 559-10 205호

박연일
대전 유성구 지족동 919 열매마을 7단지 705동 401호

(74) 대리인 최규환

(56) 선행기술조사문헌
KR1020040110944 A 논문
* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 남기창

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 남세균 글루코키나제를 이용한 식물의 생장과 발달 조절방법

(57) 요약

본 발명은 남세균 시네코시스티스 종 PCC6803의 글루코키나제를 이용한 식물의 생장 및 발달을 조절하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 1로 기재되는 남세균의 글루코키나제 유전자 cglk를 35S 프로모터(promoter)가 있는 과발현벡터에 삽입한 후, 애기장대의 헥소키나아제 점돌연변이체에 상기 벡터로 형질전환시키고, 상기 형질전환 식물체에서 cglk 유전자를 과발현시켜 남세균의 글루코키나제가 식물체의 포도당 신호 전달경로 역할을 수행할 수 있음을 규명함으로써, 이를 이용하여 식물의 생장과 발달을 조절하는 것에 관한 것이다. 또한, 작물의 미질(맛)과 당도를 결정하는 기작을 규명하는 실마리를 제공할 수 있을 것이다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1의 염기서열을 가지는 남세균의 글로코키나제 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환시킴으로써 식물체의 생장 및 발달을 조절하는 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 남세균은 시네코시스티스 종 PCC6803(*Synechocystis* sp. PCC6803)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 재조합 벡터는 pCAM0593인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 남세균 시네코시스티스 종 PCC6803(cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803)의 글루코키나제(glucokinase)(이하'cGLK'이라 함)를 이용한 식물의 생장 및 발달을 조절하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 1로 기재되는 남세균의 글루코키나제 유전자 cglk(또는 sll0593)를 벡터에 삽입한 후, 애기장대의 헥소키나아제 점돌연변이체에 상기 벡터로 형질전환시키고, 상기 형질전환 식물체에서 cglk 유전자를 과발현시켜 남세균의 글루코키나제가 식물체의 포도당 신호 전달경로 역할을 수행할 수 있음을 규명함으로써, 이를 이용하여 식물의 생장과 발달을 조절하는 것에 관한 것이다.

식물에 있어 생육기간 동안 흡수된 빛의 양(광자수), 광합성능 및 작물의 수확량은 양의 상관관계를 가지고 있어 광합성능 향상을 통하여 작물의 생산성을 극대화하고자 노력하였으며, 그 예로 육종과 재배기법의 발달로 소오스(source)와 싱크 활성(sink activity)이 증대된 많은 품종을 개발하여 제1차 녹색혁명을 이룩한 바 있다.

식물생명공학 기법에 의거하여 작물의 생산성을 증대시키고자 광합성능이나 광호흡을 조절하는 열쇠효소(key enzyme)를 주목표로 하여 유전자의 클로닝과 형질전환을 통해서 광합성 탄소고정능을 증대시키려는 노력이 있었으나, 거의 대부분이 실패하였다. 그 이유는 대부분의 비가역적인 반응에 관여하는 열쇠효소가 전사수준에서 뿐만 아니라 번역 후 수준에서 유전자 조작을 통한 광합성 제어에 어려움이 있기 때문이다. 이는 루비스코(rubisco)나 포스포리불로키나아제(phosphoribulokinase, PRK)가 50 내지 85% 전사수준의 조작에 의해서 효소 활성은 감소되나 광합성은 영향을 받지 않는 것을 예로 들 수 있다. 또 다른 이유는, 광합성을 조절하는 당(sugar)과 질소 신호전달 경로를 고려하지 않았기 때문이다.

따라서 광합성능을 제어하기 위해서는 당과 질소 신호, 그리고 전사와 번역 후 수준에서의 조절을 고려하는 총체적인 접근이 필요하다. 이를 위해서 포도당 신호 센서(sensor)의 개량과 탄소대사 관련 모든 효소의 조절기작을 변형시킬 필요가 있는데, 이는 센서(sensor)로서의 기능이 없는 글루코오스 수송체(glucose transporter), 글루코키나제, 조절되지 않은 캘빈회로, 산화적 5탄당 인산 대사, 해당과정, TCA 회로, 탄소고정, 설탕 및 녹말 대사에 관여하는 유전자를 필요로 한다.

당(sugar)은 모든 생물체에서 유전자발현, 생장 및 발달에 영향을 미치는 조절신호(regulatory signal)로 작용한다. 그런데 효모와 같은 종속영양생물과는 달리 식물은 광독립영양생물(photoautotroph)이므로 광합성에 의한 탄수화물의 생산을

식물의 발달단계에 따라서 조직특이적으로 할당(allocation)과 분배(partitioning)를 조절해야만 하는 특성을 지니고 있다(Jang J.C. et al., Plant Cell, 1997, 9(1):5-19). 따라서 광합성, 해당과정, 글리옥실산(glyoxylate) 대사, 질소대사, 설탕 및 녹말대사, 방어기작 및 세포주기조절과 같은 과정에 관여하는 여러 유전자의 발현이 당에 의해서 조절된다. 일반적으로 고농도의 당은 당 산물에 관여하는 유전자의 발현을 억제하는 대신에 저장과 이용에 관여하는 유전자의 발현을 촉진한다. 반면에 당 결핍은 이와 상반되는 유전자 발현을 유도한다. 또한 당 농도에 의해 조절되는 유전자는 당 이외의 식물호르몬과 같은 내적 요인과 빛이나 병원균과 같은 외적요인에 의해서도 영향을 받고 있다. 따라서 이에 대한 연구는 식물대사에 대한 이해 측면에서 뿐만 아니라 광합성을 수행하는 잎과 저장부사이, 그리고 저장부(seed, tuber)에서의 녹말, 단백질 및 오일(oil)과 같은 저장산물 사이의 탄소분배(carbon partitioning)를 조절(manipulation)할 수 있는 기초를 제공한다는 점에서 매우 중요하다. 특히 최근에 담배에서 당 신호(sugar signals)를 조작함으로써 최대 광합성율을 33% 이상 획기적으로 향상시킬 수 있다는 보고는 이 분야 연구의 중요성을 더 하고 있다(Paul M. et al., Trends Plant Sci., 2001, 6(5):197-200).

다세포 식물에서의 당 감지(sugar sensing)와 조절은 단세포 효모에서보다 복잡한데 이는 소오스와 싱크간의 상호작용에서 주로 기인한다. 식물에서 포도당 감지는 1) 포도당 센서(glucose sensor)로서의 헥소키나아제(hexokinase), 2) 헥소키나아제 비의존성 포도당 신호전달(hexokinase-independent glucose signaling), 및 3) 대사작용 의존성 포도당 감지(metabolism-dependent glucose sensing) 경로가 제안되었다. 헥소키나아제가 식물에서 포도당 감지의 기능을 할 것인가에 대해서는 논란이 많지만, 애기장대에서 광합성에 관여하는 유전자 발현에 헥소키나아제가 관여하는 것으로 보고되고 있다(Jang J.C. et al., Plant Cell, 1997, 9(1):5-19; Xiao W. et al., Plant Mol. Biol., 2000, 44(4):451-461; Moore B. et al., Science, 2003, 300(5617):261-263). 그러나 명아주(*Chenopodium album*)나 애기장대(*Arabidopsis thaliane*)에서 수크로오스 인버타제(sucrose invertase)나 수크로오스 합성효소(sucrose synthase) 유전자가 헥소키나아제에 의존하지 않는 형태로 발현된다는 결과는 헥소키나아제 비의존성 경로가 있음을 제시한다. 또한 발병관련(pathogenesis related, PR) 유전자가 효모 헥소키나아제의 과발현(overexpression)에 의해서 촉진된다는 보고는 해당경로에서 당, 인산의 전 단계에 있는 대사작용이 포도당 신호전달에 관여함을 시사한다. 그러나, 포도당 신호가 핵으로 전달되는 신호전달에 관해서는 거의 알려진 바가 없다.

고등식물의 연구는 모델식물인 애기장대의 게놈(genome)이 2000년 12월에 발표되었고, 벼의 게놈도 밝혀졌으며, 포도당 감지/신호전달 분야에서도 주요 연구의 대상이 되어 왔다. 그러나 애기장대나 벼를 이용한 분자유전학적 접근은 가능하지만 고등식물이기 때문에 세대가 비교적 길고(적어도 3개월), 돌연변이가 발견되어도 유전자를 찾는데 오래 시간이 걸리며, 상보성 시험(complementation test)이나 유전자 넉아웃(knock-out) 실험 등과 같은 분자유전학적인 실험이 용이하지 않다는 많은 제약을 가지고 있다. 모델식물인 애기장대와 벼 등의 고등식물을 이용한 기능 유전체학 연구는 고등식물만이 갖는 개화나 조직 및 기관 분화기구에 대한 연구를 위해서는 필요하지만 1) 유전자 트랩 라이브러리(gene trap library) 작성시 대부분 배발달 단계나 발달단계에서 사멸(lethal)하거나 2) 구조적으로 혹은 기능적으로 중복(redundancy)되어 있어서 유전자 기능을 밝히는 데 한계가 있으며, 3) 상동성 재조합(homologus recombination)이 불가능하므로 분자유전학적 연구가 가능하지 않다는 문제점이 있다.

광합성박테리아 중 남세균은 원시대기에 산소(O_2)를 최초로 제공한 생물로, 식물 엽록체의 기원이다. 대장균(*Escherichia coli*)이 고등동물 연구의 분자유전학 모델시스템으로 되어왔듯이, 남세균이 고등식물 연구의 분자유전학 모델시스템으로 간주되는데, 특히 남세균 중에서도 시네코시스티스 종 PCC6803(*Synechocystis* sp. PCC6803)이 고등식물 대사과정을 연구하는 모델시스템이 되고 있다. 남세균은 여러 다양한 환경 스트레스에 대한 반응을 보일 수 있는 신호전달 캐스캐이드(signaling cascade)가 고등식물과 유사하다. 즉, 식물에서 스트레스 감지/신호전달(stress sensing/signaling)에 관계가 되는 것으로 밝혀진 것과 유사한 두 개의 구성요소(two component) 신호전달물질을 만드는 유전자가 80개 이상 존재하는 것으로 게놈 분석결과 밝혀졌다.

고등식물에서 포도당 감지/신호전달에 관여하는 것으로 추정되는 유전자 중에서 남세균에서 발견되는 것으로, 기본적인 광합성과 탄소대사 이외에 포도당 수송 단백질(glucose transport protein, *glc*P)(sll0771), 당 수송 단백질(sugar transport protein)(slr0530, slr0531), 만노오스(mannose) 대사(sll1212 등 11종 유전자), 프룩토오스(fructose) 대사(sll0018 등 4종), 글루코키나제(glucokinase)(cglk: sll0593)와 프로토키나제(fructokinase)(cscK: slr1448)등의 헥소키나아제 및 트레할로스(trehalose) 대사에 관여하는 트레할로스-인산 합성효소(trehalose-phosphate synthase)(otsA, sll1566) 등의 유전자를 지니고 있다. 특히 남세균 시네코시스티스 종 PCC6803은 효모나 대장균처럼 포도당 배지 에서 종속영양상태로 생장할 수 있는데, 포도당의 유무에 따라 광합성 및 호흡 관련 유전자 발현의 변화를 보이므로 포도당 혹은 당 감지에 관련된 유전자 확보의 가능성이 매우 높다. 예를 들어 포도당이 첨가된 배지에서는 광수확 색소인 피코빌린(phycobilin) 등의 증가가 수반되지만 광합성 전자전달에 관여하는 광계2와 1의 유전자 발현이 억제된다(Li H. and

Sherman L.A., J. Bacteriol., 2000, 182(15):4268-4277). 따라서 남세균은 포도당을 감지하는 감지시스템(sensing system)을 가지고 있음이 틀림없으며, 이에 대한 연구는 작물의 미질(맛)과 당도를 결정하는 기작을 규명하는 실마리를 제공할 수 있을 것이다.

애기장대에서 포도당 신호센서(glucose sensor)로 작용하는 헥소키나아제1(hexokinase I)은 진핵생물에서 볼 수 있는 헥소키나아제군에 포함되는 반면 남세균 cGLK는 원핵생물에서 볼 수 있는 2개의 글루코키나제 그룹 중 대장균과 같이 A군에 포함된다(Kawai S. et al., J. Biosci. Bioeng., 2005, 99(4):320-330). 애기장대의 헥소키나아제는 효모의 헥소키나아제와 달리 포도당을 인산화하는 기능 이외에 세포질 포도당을 감지하는 기능이 있다(Xiao W. et al., Plant Mol. Biol., 2000, 44(4):451-461). 그러나 효모의 헥소키나아제가 효모에서는 포도당 감지 기능이 있지만 애기장대에서는 포도당 감지기능이 없다는 이 보고는 헥소키나아제 유전자가 결손된 돌연변이체를 이용하지 않고 센스(sense) 혹은 안티센스(antisense) 기법으로 유전자 발현을 조절하는 기법을 사용하였기 때문에 애기장대의 포도당 감지 기능이 없는 돌연변이체를 모본으로 상보성 시험과 같은 추가적인 연구가 필요하다.

남세균 글루코키나제는 애기장대를 포함하는 헥소키나아제군 단백질과의 아미노산 동질성(identity)이 14~18%로 매우 낮아서 (Lee J.M. et al., Mol. Cells, 2005, 19(2):256-261) 포도당 감지 기능을 수행할 가능성이 매우 낮다. 예상한 바와 같이 남세균에서 포도당에 의해 유도되는 카로티노이드 생합성 관련 유전자의 발현은 글루코키나제의 활성도에 의존하지 않는 경로에 의해서 일어난다(Ryu J. Y. et al., J. Biol. Chem., 2004, 279(24):25320-25325). 따라서 광합성 산물이 포도당에 의한 광합성이 억제되는 피트백 억제(feed back inhibition)를 조절하기 위해 포도당 감지 기능이 없는 글루코키나제의 발굴 및 작물과 식물로의 도입이 요구된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 남세균의 글루코키나제가 애기장대로 도입되었을 경우 포도당 신호감지와 전달에의 관여에 대해 규명하는 것이다.

또한 본 발명의 다른 목적은 남세균 글루코키나제 유전자 cglk를 도입함으로써 식물 및 작물의 생장과 발달을 조절하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

본 발명은 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 남세균 시네코시스티스 종 PCC6803으로부터 글루코키나제 유전자 cglk를 클로닝하고 과발현벡터에 삽입한 후, 애기장대의 헥소키나아제 점돌연변이체에 상기 벡터로 형질전환시킴으로, 상기 형질전환 식물체에서 cglk 유전자를 과발현시켜 남세균의 글루코키나제가 식물체의 포도당 신호 전달경로 역할을 수행할 수 있음을 규명함으로써, 이를 이용하여 식물의 생장과 발달을 조절하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명하고자 한다.

본 발명은 남세균 시네코시스티스 종 PCC6803에서 글루코키나제 유전자 cglk(또는 sll0593)를 분리하고, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pCAM0593을 제작하였다. 상기 재조합 벡터를 아그로박테리아 GV3101에 형질전환하여 선별된 세포만을 얻어 애기장대의 야생종의 한 생태형 columbia(Col7)과 헥소키나아제 점돌연변이체인 gin2-1(생태형 lendsburg: Ler)에 각각 형질전환하고, 상기 식물체로부터 얻은 종자를 하이그로마이신(hygromycin)이 포함된 배지하에서 유전자 cglk 형질전환체(35S::cglk)를 선별하였다.

상기 형질전환체에서 cglk의 과발현을 확인하기 위해, 흙에서 14일간 배양된 애기장대의 야생형(Ler), 변이체 gin2-1 및 형질전환체의 1, 2, 3 세 라인을 선별하여 각각에서 RNA와 단백질을 추출하고, 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하여, 그 양을 확인하기 위한 유비퀴틴 유전자내 프라이머와 발현확인을 위한 cglk 유전자 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하였다. 야생형과 변이체 gin2-1에서는 cglk 유전자가 검출되지 않았으나, 과발현 형질전환체 1, 2, 3에서는 모두 발현되었다. 추출한 단백질로부터 웨스턴 블럿(Western blotting)한 결과 야생형과 변이체 gin2-1에서는 cGLK 단백질(서열번호 2)이 검출되지 않았으나 과발현 형질전환체 1, 2, 3에서는 모두 발현되었는데 특히 2번 라인에서 현저하게 증가하였다. 과발현 형질전환체에서 단백질을 추출하고 글루코키나제 효소활성도를 측정한 결과, 야생형과 변이체 gin2-1보다 훨씬 높은 활성도를 나타내어 남세균 글루코키나제가 애기장대에 과발현되어 생화학적인 기능을 수행함을 확인하였다.

또한, 포도당에 대한 cGLK 과발현 형질전환체의 생리적 반응을 확인하기 위해, 1 ~ 6% 의 포도당과 만니톨이 첨가된 고체배지에 야생형, 변이체 gin2-1 및 형질전환체의 종자를 파종하고 저온 처리후, 저광에서 배양하였다. 종자 발아율은 38 시간 후 유근이 종피를 뚫고 나온 경우를 대상으로 하여 조사하였는데, 포도당이 없는 조건에서 종자발아율이 헥소키나아제(AtHXK1) 점돌연변이에 의해서 저해되었으며, 상보성 발현에 의해서 회복되었다. 그러나 야생형과 점돌연변이체 및 상보성 과발현체에서 볼 수 있는 6% 포도당에 의한 발아율 억제는 삼투조절제(osmoticum) 대조구로 사용된 만니톨에서도 관찰되었다. 따라서 종자발아에서는 헥소키나아제가 포도당 신호전달 역할을 수행하기보다는 물질대사에 관여하는 효소로서의 역할만을 수행하는 것으로 생각된다.

고농도 포도당에 의한 광합성기구 발달 억제를 엽록소 함량과 엽록소 형광 파라미터(Fo)로 측정하였다. 야생종과 상보성 과발현체에서는 6% 포도당에 의해서 엽록소 집적과 광계2의 양자효율이 억제되었으나 점돌연변이체에서는 0% 대조구에 비해 거의 억제되지 않았다.

애기장대의 야생형 Col7에 남세균 글루코키나제를 과발현시켰을 경우 고농도의 포도당 조건에서 유식물의 생장이 현저하게 저하되는 과민 반응을 보였다. 이러한 결과는 남세균 글루코키나제가 애기장대의 헥소키나아제의 역할, 특히 포도당 감지 기능을 수행함을 시사한다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 이들 실시예에 의하여 본 발명의 범위가 국한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야 및 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 유전자 cglk를 가지는 재조합 벡터 제작

글루코키나제 유전자 cglk를 야생형의 남세균에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 아래와 같은 프라이머(primer)를 사용하여 1,068 kb의 cglk 유전자(서열번호 1) 내에 증폭되도록 하고, 이를 제한효소 *Sma*I을 처리한 벡터 pUC18에 클로닝하여 pUC0593을 완성하였다.

5'- TATGAATTCATGGGGGCCATGGGC

3'- TATCTGCAGCTAAGACTGGGCCGC

pUC0593을 제한효소 *Bam*HI과 *Sac*I으로 처리하여 약 1.1kb 크기의 cglk를 분리하고, 이와 별도로 제한효소 *Bam*HI과 *Sac*I으로 처리한 벡터 pCAMBIA1300-35SNOS 와 라이게이션(ligation)하였다. 그리하여 유전자 cglk가 삽입된 약 10 kb 크기의 재조합 벡터 pCAM0593을 얻었다(도 1).

실시예 2: 애기장대의 형질전환 및 유전자 cglk 형질전환체의 선별

상기 실시예 1에서 획득한 1 g의 재조합 벡터 pCAM0593을 아그로박테리아 GV3101(Agrobacteria GV3101)의 세포 100 ㎕에 첨가한 후, 37℃에서 5분간 열-충격(heat-shock)을 처리하였고, 이를 50 ㎍/㎖의 카나마이신(kanamycin) 항생제가 포함된 YEP 플레이트(plate) 위에 오버레이(overlay)하였다. 48시간 동안 30℃에서 배양하여 형질전환된 아그로박테리아를 선별하였다. 선별된 아그로박테리아를 50 ㎍/㎖의 카나마이신이 포함된 YEP 액체배지에 접종하여 30℃에서 24 시간 동안 배양하고, 원심분리하여 세포만을 분리했다. 이를 200 ㎕/ℓ의 실윗(Silwet)이 포함된 0.5X 액체 MS(Murashige and Skoog, 1962)배지에 희석하고, 꽃대가 올라온 애기장대 야생종 Col7과 gin2-1을 담궈 각각 형질전환 하였다. 형질전환 시도 후 얻은 종자를 40 g/ℓ의 하이그로마이신(hygromycin)이 포함된 MS 플레이트에 치상하여, 형질전환된 T1개체를 선별하였다. 선별된 개체를 화분에 옮겨 실시예 1에서 사용한 프라이머로 PCR하여 형질전환이 완전하게 이루어졌음을 확인하였다.

실시예 3: cglk 과발현 형질전환체의 분리

cglk 과발현 형질전환체에서의 삽입유전자 과발현을 전사체, 단백질 단계에서 확인하기 위하여 흙에서 14일간 배양된(광주기 명/암, 18/6 h, 100, 250, 그리고 500 mol/m^2/s, 광주기 명/암, 22/20 ℃) 영양단계식물 야생형(Ler)과 헥소키나아

제 점돌연변이체(gin2-1), cglk 과발현 형질전환체 라인 1, 2, 3에서 각각의 RNA와 단백질을 추출하였다. 생장광의 세기가 증가함에 따라 변이체 gin2-1 에서 잎의 생장과 발달이 현저하게 억제되었고, 여기에 cglk가 과발현되면 야생형(Ler)과 거의 유사한 발달 양상을 보여줌으로 cglk가 고광에서의 생장억제극복에 관여함을 알 수 있었다(도 2A).

저광에서 자란 잎의 RNA 추출을 위하여 막자사발에서 전체식물체를 동결상태로 마쇄한 뒤 트리졸(Trizol)을 이용하여 추출하였고, 추출된 전체 RNA는 DnaseI(Takara)을 처리하여 잔여 DNA를 제거하고 페놀과 에탄올을 이용하여 정제하였다. 정제된 RNA 중 각각의 시료에서 1 ㎍을 가지고 20 ㎕ 볼륨으로 역전사(Reverse transcription)(Promega)를 수행하여 cDNA를 얻었다. 이 중 4 ㎕를 채취하여 주형으로 삼아, 합성된 cDNA의 양을 확인하기 위한 유비퀴틴(Ubiquitin, UBQ) 유전자내 프라이머 (sense, 5'- GAT CTT TGC CGG AAA ACA ATT GGA GGA TGG T-3' antisense, 5'- CGA CTT GTC ATT AGA AAG AAA GAG ATA ACA GG-3') 와, cglk의 과발현 형질전환체에서 발현 확인을 위한 cglk 유전자 프라이머 (sense, 5'- TAT GAA TTC ATG GGG GCC ATG CGC-3' antisense, 5'- TAT CTGCAG CTA AGA CTG GGC CGC -3')를 이용하여 UBQ, cglk 각각 95℃/30sec, 60℃/25sec, 72℃/50sec 조건에서 25 cycles을 95℃/30sec, 52℃/20sec, 72℃/1min 조건에서 25 cycles의 PCR을 수행하였다. 야생형과 변이체 gin2-1에서는 cglk 유전자가 검출되지 않았으나 과발현 형질진환체에서는 모두 발현되었다 (도 2B).

과발현된 단백질양의 확인은 각 식물체를 동결상태로 마쇄한 뒤 추출 완충액(50 mM potassium phosphate buffer (pH7.8), protease inhibitor cocktail tablet)에 녹여 4℃, 15,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 수확하였다. 각 상등액은 SDS 트리트먼트 버퍼(0.125 M Tris-HCl(pH 6.8), 4% SDS, 20%(v/v) glycerol, 0.2% DTT, 0.02% bromophenol blue)와 함께 95℃에서 10분간 가열한 뒤 원심분리한 후, 각 샘플의 25 ㎍을 채취하여 12.5% SDS 페이지 젤(SDS PAGE gel)에서 분리하였다. 분리된 단백질 젤을 폴리비닐리덴디플로라이드 막(poly vinylidene diflouride membrane, PVDF membrane)(0.45 ㎛, Millipore)에 이동시켜 항체로 감지하였다. 야생형과 변이체 gin2-1에서는 cGLK 단백질이 검출되지 않았으나, 과발현 형질진환체에서는 모두 발현되었는데 특히 2번 라인에서 현저하게 증가하였다 (도 2B).

과발현된 식물체에서의 글루코키나제 효소활성도를 조사하기 위해, 흙에서 15일간 배양된 영양단계식물을 4℃ 보관된 단백질 추출액(50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 20 mM DTT, 10% v/v glycerol)으로 마쇄하고 4℃, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 상등액을 브래드포드(Broadford) 법으로 정량한 후 각 시료의 20 ㎍의 단백질을 37℃에서 미리 배양된 반응용액 (100 mM Tris-HCl(pH7.8), 20 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 1.5 mM ATP, 0.2 mM NADP, 0.2 U glucose-6-phosphate dehydrogenase, 0.5 mM glucose) 와 37℃에서 15분간 반응 시킨 후 340 nm 에서 NADPH의 흡광도를 측정하여 분석하였다. 야생형에 비해서 gin2-1의 클루코키나제 활성도가 약 10% 감소하였으며, 과발현 형질전환체의 경우 1번과 3번 라인의 활성도는 모본 gin2-에 비해 45% 증가하였고, 특히 2번 라인은 70% 증가하여 훨씬 높은 활성도를 나타냈다. 따라서 남세균 글루코키나제가 애기장대 내에서 과발현되어 생화학적인 기능을 수행함을 확인하였다 (도 2C).

실시예 4: 포도당에 대한 cglk 과발현 형질전환체의 생리적 반응

여러 당 농도에서의 생리적 반응 및 표현형의 확인은 1X MS배지(Murashige and Skoog, 1962), 0.7% 파이토아가(phytoagar) 및 1, 2, 3, 4, 5, 그리고 6%의 당과 만니톨(mannitol)이 첨가된 고체 배지에서 야생형(Ler), gin2-1, cglk 과발현 형질전환체의 종자를 파종하고 4일간 저온처리한 후, 저광의 광주기 조건에서 10일간 배양한 식물체를 사용하여 수행하였다. 여러 당 농도처리는 유식물의 발달에 매우 큰 영향을 미치었는데 1%의 낮은 당 첨가 배양의 경우 각 유식물의 생장 및 녹색화를 촉진시키는 양상을 나타내었고, 6%의 고농도의 당 첨가 배양에서는 오히려 유식물의 생장 및 녹색화를 억제하는 양상을 나타났다(도 3). 이 억제 효과는 야생종에서와 같이 Gin2-1에 남세균 글루코키나제를 과발현시킨 개체에서 더 뚜렷하게 나타났으며, 헥소키나아제의 점돌연변이 Gin2-1은 억제효과가 거의 나타나지 않음을 보였다. 이들의 당에 대한 외부적 표현형은 다음과 같은 방법으로 정량화 하였다.

종자의 발아율은 저광 배양 직후부터 38시간 후에 유근이 종피를 뚫고 나온 경우를 대상으로 하여 조사하였다. 헥소키나아제가 돌연변이 되는 경우 포도당이 없는 조건에서 발아율이 현저하게 저하되었으나 상보성 과발현에 의해서 발아억제현상이 없어졌다. 야생형과 gin2-1 모본에 cglk가 과발현된 형질전환체의 경우 2% 포도당에 의한 발아율이 억제되었으나 헥소키나아제 점돌연변이 Gin2-1의 경우 또한 포도당에 의한 발아억제를 볼 수 없었다(도 4A). 그러나 6% 포도당 조건에서는 모든 유전형에서 발아억제를 볼 수 있었다. 이러한 포도당에 의한 발아 억제는 삼투조절제(osmoticum)로 사용된 만니톨에서도 관찰되었다. 따라서 포도당에 의한 종자발아 억제는 헥소키나아제에 의한 신호전달경로에 의한 것보다 효소활성도에 의한 대사 억제에 의한 것으로 생각된다.

자엽과 어린잎을 포함한 묘조(shoot)의 엽록소 정량은 dimethylformide(DMF)로 추출하여 664 nm와 647 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다(도 4B). 야생형의 경우 2% 포도당에 의해서 엽록소 함량이 촉진되었으나 6% 포도당에 의해서는 현저하게 억제되었다. Gin2-1의 경우 야생형과 비슷한 양상을 보였으나 6% 고농도에서의 억제 효과는 거의 볼 수 없었다. Cglk가 gin2-1에 상보적으로 과발현되는 경우 6%에서의 엽록소 집적에 대한 억제효과가 야생형과 유사하거나 더 심하게 나타났다. 만니톨에 의한 엽록소 함량 변화는 볼 수 없었는데 이는 포도당에 의한 엽록소함량 변화가 포도당에 의한 특이적 반응임을 시사한다. 엽록소 함량의 증가는 엽록체 발달을 시사하며, 이는 광합성 기구의 활성도 증가를 의미한다.

광합성 기구 중 광계2의 활성도는 암 적응된 상태의 잎에서 볼 수 있는 형광(Fo, dark-adapted minimal Chl fluorescence)의 측정으로 조사할 수 있으며, Fo는 광계2에서 광화학반응에 대한 지표로서 사용된다(Park Y-I. et al., Planta, 1995, 196:401-411). 광합성 기구의 효율성이 영향을 받았는지를 조사하기 위해, 슈라이버(Schreiber, 1994)의 방법으로 Xe-PAM(Heinz Walz,, 독일)를 이용하여 Fo를 측정하였다(도 4C). 야생형의 경우 저농도의 포도당에 의해서 Fo의 증가를 볼 수 있었으나, 고농도에서는 현저하게 억제되었다. Gin2-1의 경우 촉진효과는 야생형과 유사하였으나 억제 효과는 낮은 수준을 보였다. 과발현 형질전환체의 경우 야생형과 유사한 촉진 및 억제 현상을 보여주었다. 따라서 글루코키나제에 의한 신호전달 경로는 헥소키나아제와 같이 저농도보다는 고농도에서 광합성 기구의 발달 억제에 관여하는 것으로 사료된다.

실시예 5: 포도당 민감성 유전자의 발현 양상

애기장대의 경우 포도당에 의해서 유전자발현이 조절되는 유전자는 전술한 바와 같이 헥소키나아제 의존성과 비의존성 그룹으로 구별된다. 다시 헥소키나아제 의존성 그룹은 헥소키나아제의 효소활성도(catalytic activity)에 의존하는 군과 비의존성 군으로 구분된다. 헥소키나아제 효소활성도에 의존하지 않는 군에는 클로로필 a/b 결합단백질(chlorophyll a/b binding protein, CAB), 루비스코 스몰 서브유닛(Rubisco small subunit, RBCS), 포스포리파제 D (phospholipase D, PLD), 플라스토시아닌(plastocyanin, PC), ERA1(enhanced response to ABA1)이 포함되며, 효소활성도 의존성 군에는 PR(pathogenesis-related gene) 1과 5 등이 있다. 헥소키나아제 비의존성으로는 ADP-글루코오스 피로포스포리라아제(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase), 찰콘 합성효소(chalcone synthase, CHS), 세포벽 인버타제(cell wall invertase1, CIN1), 페닐알라닌 암모니아-리아제1(phenylalanine ammonia-lyase1, PAL1)등이 알려져 있다(Xiao W. et al., Plant Mol. Biol., 2000, 44(4):451-461). 이러한 유전자군의 발현 양상을 야생형과 gin2-1 그리고 과발현 형질전환체를 이용하여 조사하였다(도 4). 0, 1, 6 % 포도당과 만니톨 처리에서의 유전자 발현 확인은 표현형 확인과 같은 조건에서 10일간 배양된 유식물 전체에서 추출된 RNA를 가지고 cDNA를 합성하여 주형으로 사용하였고, 하기와 같은 프라이머와

CAB(At3g27690, sense 5'-ATG GCC ACT TCA GCA ATC CAA-3' antisense 5'-CAC AAC TTG ACA CGC CCA TAT-3'),

RBCS(At1g67090, sense 5'-ATG CTC TCT TCC GCT ACT ATG G-3' antisense 5'-TCA ACA CTT GAG CGG AGT CGG T-3'),

PLD(At3g15730, sense 5'- CTG GCA AAT GTA GAA GAG ACG ATT -3' antisense 5'- GAG AGG AAT TCT AGG GAC AAA GTT -3'),

ERA1(At5g40280, sense 5'-CGG GAT CCT TAA GGC AGC TGG GTC CG-3' antisense 5'-CGG AAT TCA GAT TCG AGG AGC CAC CC -3'),

PR5(At1g75040, sense, 5'-ACC ACC GTC TGG GCC GGA ACT C-3' antisense, 5'-GGG AGG ACA AGT TTC CGG CTT AT-3'),

CHS(At5g13930, sense 5'- CTG ACG GAG GAA TTC CTC AAG GA -3' antisense, 5'- AAG ATG GGT TTC TCT CCG ACA GA -3'),

PAL1(At2g37040, sense,5'-TTG GTG GTG AGA CTC TGA CCA TT -3' antisense 5'-TAG CTT TGG AAT TGG GAC GAC CG -3')

유비퀴틴 유전자의 프라이머를 이용하여 CAB 유전자는 95℃ 30sec, 52℃ 20sec, 72℃ 30sec, 24 cycles의 PCR을 수행하였고, RBCS 유전자는 58℃ 30sec, 20 cycles, PLD, 58℃ 20sec, 25 cycles, ERA, 56℃ 1min, 28 cycles, PR5, 56℃ 20sec, 28 cycles, CHS 와 PAL1 유전자는 54℃ 20sec, 26 cycles의 익스텐션(extension) 조건과 사이클(cycle) 수를 바꾸어 PCR을 수행하였다.

야생형의 경우 포도당에 의해서 CAB, RBCS 유전자 발현이 억제되었으며 era1은 증가하였다. 그러나 변이체 gin2-1에서 이들 유전자 발현은 포도당에 의해서 영향을 받지 않은 반면 cglk가 도입되는 경우 야생형과 유사한 변화를 보였다(도 5). 헥소키나아제 비의존성 유전자 군에 속하는 CHS, PAL의 경우 포도당에 대한 유전자 발현이 야생형, 변이체 gin2-1 및 형질전환체에서 모두 증가하였다. 이러한 결과는 남세균 글루코키나제가 애기장대에서 헥소키나아제의 역할, 특히 포도당 감지 역할을 수행함을 의미한다.

실시예 6: 포도당에 대한 야생형(Col7)에서의 남세균 글루코키나아제 과발현 형질전환체(35S::cglk) 유식물 생장 반응

애기장대의 야생형(Col7)에 남세균 글루코키나제 과발현 식물체의 당 반응 확인은 각 농도의 당이 첨가된 MS 배지에서 18시간 광주기 조건으로 23일간 배양한 뒤의 유식물 상태를 확인하였다. 이 경우 남세균 과발현 식물체는 야생종보다 더 낮은(4-5%) 고농도의 포도당 조건에서 유식물의 생장이 저하되기 시작함을 보였고, 6%에서는 야생종보다 더 작은 크기와 녹색화 억제의 과민한 반응을 보였다(도 6). 이러한 결과는 과발현된 남세균 글루코키나제의 영향임을 알 수 있으며,따라서 광합성 박테리아 남세균의 글루코키나아제는 쌍떡잎 고등식물 애기장대의 헥소키나아제의 역할, 특히 포도당 감지 기능을 동일하게 수행함을 시사한다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 남세균 시네코시스티스 종 PCC6803의 글루코키나제 유전자 cglk가 식물체의 포도당 신호 전달경로 역할을 수행할 수 있음을 확인하였으며, 상기 cglk 유전자를 식물체내로 도입하여 과발현시킴으로써 식물체에서 생장과 발달을 조절할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 cglk 유전자를 이용하여 식물체의 광합성능을 향상시키고 작물의 생산량을 증대시킬 수 있다. 또한, 본 발명은 작물의 미질(맛)과 당도를 결정하는 기작을 규명하는 실마리를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 남세균 글루코키나제 유전자 cglk를 포함하는 재조합 벡터의 제작 과정을 나타내는 모식도이다.

도 2A는 애기장대 야생형(Ler), 헥소키나아제 점돌연변이체(gin2-1) 및 유전자 cglk 과발현 형질전환 식물체(gin2-1 + 35S::cglk)에서 생장광에 대한 표현형을 나타내는 사진이고, 도 2B는 상기 식물체들에서의 cglk 유전자 발현과 단백질 발현을 나타내는 사진이고, 도 2C는 글루코키나제 활성도를 나타내는 그래프이다.

도3은 애기장대 야생형, 헥소키나아제 점돌연변이체 및 유전자 cglk 과발현 형질전환 식물체에서 포도당에 대한 표현형을 나타내는 사진이다.

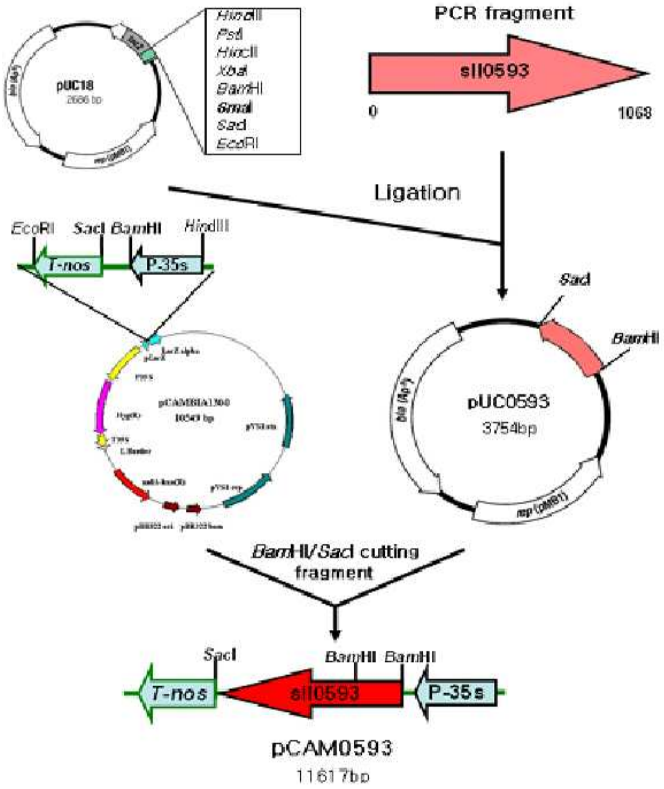
도 4A는 애기장대 야생형, 헥소키나아제 점돌연변이체 및 유전자 cglk 형질전환 식물체에서 포도당에 대한 발아율을 나타내는 그래프이고, 도 4B는 엽록소 함량을 나타내는 그래프이고, 도 4C는 광계2의 활성도를 나타내는 그래프이다.

도 5는 애기장대의 헥소키나아제 점돌연변이체와 유전자 cglk 형질전환 식물체에서 포도당에 대한 헥소키나아제 의존성 및 비의존성 유전자의 발현을 나타내는 사진이다.

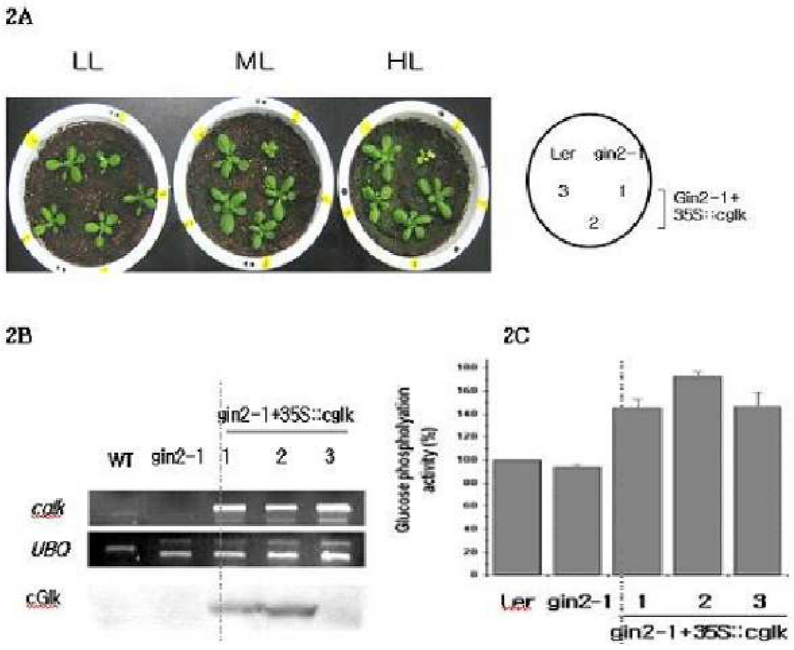
도 6은 유전자 cglk를 과발현시킨 애기장대의 야생형에서 포도당 농도에 따른 생장 반응을 나타내는 사진이다.

도면

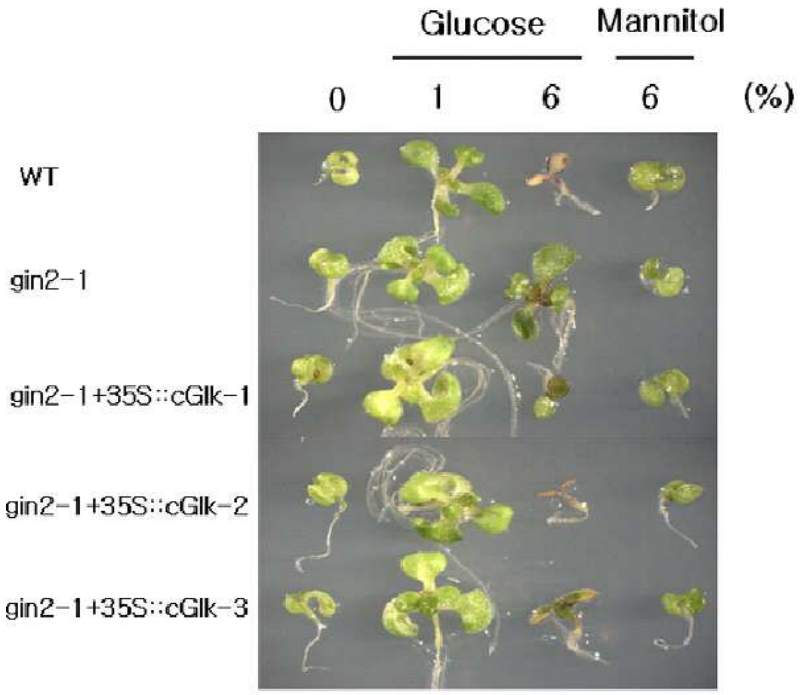
도면1


pUC18
HindIII
PstI
HincII
XbaI
BamHI
SmaI
SacI
EcoRI
PCR fragment
sll0593
0
1068
Ligation
EcoRI SacI BamHI HindIII
T-nos
P-35s
SacI
BamHI
pUC0593
3754bp
BamHI/SacI cutting fragment
SacI
BamHI BamHI
T-nos
sll0593
P-35s
pCAM0593
11617bp

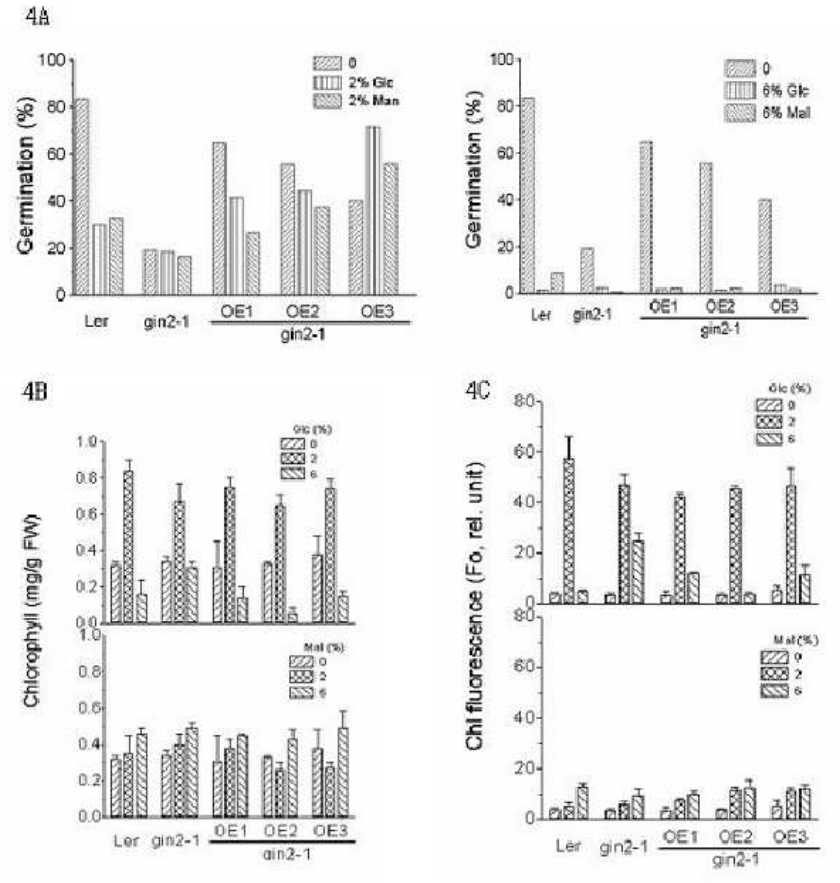
도면2


2A
LL
ML
HL
Ler
gin2-1
3
1
2
Gin2-1+
35S::cglk
2B
gin2-1+35S::cglk
WT
gin2-1
1
2
3
cglk
UBQ
cGlk
2C
Glucose phosphorylation activity (%)
Ler
gin2-1
1
2
3
gin2-1+35S::cglk

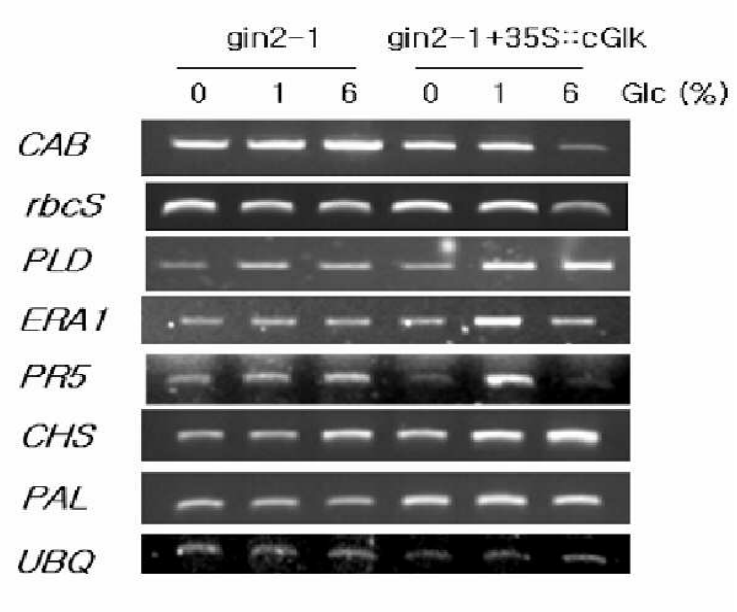
도면3


Glucose
Mannitol
0
1
6
6
(%)
WT
gin2-1
gin2-1+35S::cGlk-1
gin2-1+35S::cGlk-2
gin2-1+35S::cGlk-3

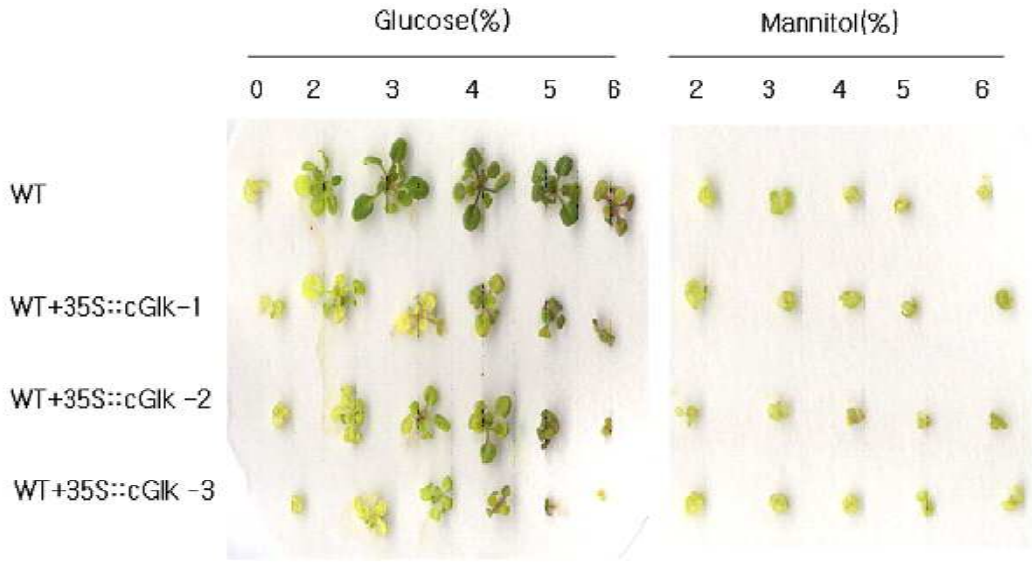
도면4


4A
Germination (%)
0
2% Glc
2% Man
6% Glc
6% Mal
Ler
gin2-1
OE1
OE2
OE3
4B
Chlorophyll (mg/g FW)
Glc (%)
Mal (%)
4C
Chl fluorescence (Fo, rel. unit)

도면5



도면6



서열목록

서열목록 전자파일 첨부