



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2012-0062040

(43) 공개일자

2012년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2010-0104538

(22) 출원일자

2010년10월26일

심사청구일자

2010년10월26일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

윤대진

경상남도 사천시 용현면 연호안길 41

박형철

경상남도 진주시 초전동 757-1번지

(74) 대리인

김동완

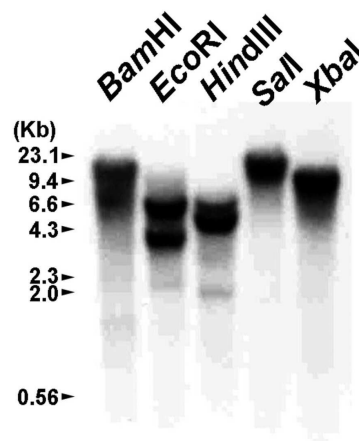
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 대두 칼모듈린 이소폼-4 프로모터 내의 DNA 결합 단백질 인식을 위한 유전자 단편

(57) 요약

본 발명은 병원체 또는 염 스트레스에 대응하는 대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCaM-4*) 프로모터(GenBank 수납번호 AY052528) 내의 DNA 결합 단백질 인식을 위한 유전자 단편에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 대두 칼모듈린 이소폼-4 프로모터 서열 내에서 GT-1 유사 단백질과 상호 작용하는 서열번호: 1로 표시되는 *GmCaM-4* 프로모터의 GT-1 시스-부위(프로모터 내의 -858 내지 -728 bp 번째 잔기) 또는 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 1 또는 2와 상호 작용하는 서열번호: 2로 표시되는 AG 서열을 포함하는 A/T로 주로 구성된 시스-부위(프로모터 내의 -1207 내지 -1128 bp 번째 잔기(E3))에 관한 것이다.

대표도



이 발명을 지원한 국가연구개발사업 구	과제고유번호	20070301034030
	부처명	농림 수산 식품부
	연구사업명	바이오그린21사업
	연구과제명	식물 스트레스 반응의 표적유전자를 이용한 환경내성 작물 개발 및 신호전달 네트워크 연
	주관기관	농촌진흥청
	연구기간	2010.01.01 ~ 2010.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
	과제고유번호	R32-10148
	부처명	교육과학기술부
	연구사업명	세계수준의 연구중심대학 육성사업
	연구과제명	기후변화에 대응한 식물 환경생명공학 기술개발
	주관기관	한국연구재단
	연구기간	2010.10.01 ~ 2011.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

병원체 또는 염 스트레스에 대응하여 발현하는 대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCaM-4*) 프로모터(GenBank 수납번호 AY052528)에 있어서, 상기 대두 칼모듈린 이소폼-4 프로모터 내의 DNA 결합 단백질의 결합부위인 A/T로 주로 구성된 25~30개의 올리고뉴클레오타이드는 2개 이상의 ATTA 모티프 반복서열과 별도의 AG 서열을 지님을 특징으로 하는 대두 칼모듈린 이소폼-4 프로모터 유전자 단편

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유전자 단편은 P-AG-Q-ATTA-R-ATTA-S(식 I)로 표시됨을 특징으로 하는 대두 칼모듈린 이소폼-4 프로모터 유전자 단편:

상기 식에서 P는 0~5개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이고, Q는 1~3개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이며 R은 1~10개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이고 S는 0~5개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이다. 단 P, Q, R, S의 뉴클레오타이드 염기 중 60% 이상은 아데닌(A) 또는 티민(T)임을 특징으로 한다.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 DNA 결합 단백질은 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 1(GmZF-HD1)(GenBank 수납번호 AY695729) 또는 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 2(GmZF-HD2)(GenBank 수납번호 AY695730)임을 특징으로 하는 대두 칼모듈린 이소폼-4 프로모터 유전자 단편

청구항 4

대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCaM-4*) 프로모터의 발현은 GT-1 유사 단백질과 상호 작용하는 서열번호: 1로 표시되는 *GmCaM-4* 프로모터의 GT-1 시스-부위(프로모터 내의 -858 내지 -728 bp 번째 잔기) 또는 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 1 또는 2와 상호 작용하는 서열번호: 2로 표시되는 AG 서열을 포함하는 A/T로 주로 구성된 시스-부위(프로모터 내의 -1207 내지 -1128 bp 번째 잔기(E3))에 의해 발현됨을 특징으로 하는 대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCaM-4*) 프로모터

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 병원체 또는 염 스트레스에 대응하는 대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCaM-4*) 프로모터(GenBank 수납번호 AY052528) 내의 DNA 결합 단백질 인식을 위한 유전자 단편에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 대두 칼모듈린 이소폼-4 프로모터 서열 내에서 GT-1 유사 단백질과 상호 작용하는 서열번호: 1로 표시되는 *GmCaM-4* 프로모터의 GT-1 시스-부위(프로모터 내의 -858 내지 -728 bp 번째 잔기) 또는 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 1 또는 2와 상호 작용하는 서열번호: 2로 표시되는 AG 서열을 포함하는 A/T로 주로 구성된 시스-부위(프로모터 내의 -1207 내지 -1128 bp 번째 잔기(E3))에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

유전자 발현의 전사 조절은 모든 생물체에서 기본적인 역할을 한다. 식물에서 이는 세포주기, 대사 및 생리 항상성, 발달, 환경 유래의 생물학적 및 비생물학적 자극에 대한 반응을 제어한다. 유전자 발현의 특이성은 프로모터 내에 존재하는 시스(*cis*)-요소 및 인핸서 영역 및 특정 전사 인자와의 상호작용에 따라 달라진다. 더욱이 전사 인자 활성화는 단백질:단백질 상호작용 및 단백질 변형을 조절하는 다양한 방식으로 조절된다.

- [0003] 생물학적 과정 중 환경 스트레스에 대한 반응은 다수의 신호전달 경로에 의해 조절된다. 애기장대 계놈의 약 5%는 1500개 이상의 전사 인자를 암호화하도록 조절되고, 이의 약 45%는 식물에 특이적인 패밀리에 속해 있다. 상이한 스트레스에 반응하여 식물에서 유도되는 전사 인자 중 유의적인 정도 및 수가 존재한다. 따라서 스트레스-반응성 유전자의 발현을 위한 시스-요소 및 전사 인자의 상호작용은 광범한 환경 스트레스에 대한 식물 반응의 중요한 부분을 구성한다.
- [0004] 호메오도메인(homeodomain, HD)은 인간, 초파리, 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)뿐만 아니라 식물과 같은 다양한 생물체 내 가장 중요한 DNA-결합 도메인 중 하나를 나타내고 이는 단백질-DNA 상호작용에 대한 모델 시스템으로서 널리 연구되어 왔다. 호메오도메인은 ~60개 아미노산 서열을 포함하고, 대부분의 호메오도메인은 핵심 공통 서열인 ATTA에 결합한다. 더욱이 호메오도메인 단백질은 단백질-단백질 상호작용 또는 다른 기능에 대한 추가 도메인을 포함한다. 추가 도메인의 존재 및 형태를 기반으로 많은 식물 호메오도메인 단백질은 HD-BEL, HD-KNOX, HD-ZIP, PHD 핑거 및 ZF-HD의 5개 서브패밀리로 분류된다. 이들 호메오도메인 단백질은 세포간 수송, 화서 줄기 성장, 호르몬 신호전달, 환경 스트레스에 대한 적응 반응 및 병원체-유래 신호전달 처리의 주요 조절자로 작용한다.
- [0005] 이들 중 징크 핑거(zinc finger, ZF)-HD 단백질은 징크 핑거 구조를 결정하는 여러 시스테인 및 히스티딘 잔기를 포함하는 N-말단 보존 징크 핑거(ZF) 도메인을 특징으로 한다. 또한 잠재적인 단백질-단백질 상호작용을 위한 도메인은 N-말단에 위치한다. 최종적으로 C-말단 보존 호메오도메인은 DNA에 결합 가능하다. 플라베리아 트리네비아(*Flaveria trinervia*)에서 4개의 ZF-HD 단백질이 먼저 확인되었고 효모 원-하이브리드(one-hybride) 선별을 이용하여 C4 포스포에놀피루브산 카르복실라제(PEPCase)의 조절 영역에 결합함이 발견되었다.
- [0006] 애기장대 계놈은 14개 AtZF-HD 유전자를 포함하고 AtZF-HD 유전자는 애기장대 꽃 발달시 중복 조절 역할을 하는 전사 조절자 그룹을 암호화한다. 애기장대 ZF-HD 단백질(ZHHD1)은 탈수 스트레스 초기 반응 1(*ERD1*) 프로모터의 ZFHD 인식 서열(ZFHDRS)에 특이적으로 결합하는 것으로 보고되었다. ZFHD1의 발현은 가뭄, 염 스트레스 및 앱식산(ABA)에 의해 유도되었다. 더욱이 ZFHD1은 NAC 단백질과 상호작용하였고, ZFHD1과 NAC 유전자의 동시-과발현은 유의적으로 증가된 가뭄 내성을 나타내었다. 이는 ZF-HD 단백질이 꽃 발달뿐만 아니라 비생물적 스트레스 신호전달에 관련됨을 의미한다.
- [0007] 본 발명자들은 최근 칼모듈린 프로모터 -858 내지 -728 bp 번째 잔기 및 -1207 내지 -1128 bp 번째 잔기의 염 스트림 서열에 걸친 대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCalM-4*) 프로모터의 2개의 영역이 *GmCalM-4* 유전자 발현을 위한 중요한 시스-요소를 포함하고, 이는 병원체 및 염 스트레스에 반응하여 중요한 역할을 함을 보고한 바 있다. -858 내지 -728 bp 영역은 병원체 및 염 스트레스에 반응하여 GT-1 유사 전사 인자와 상호작용하는 GT-1 시스-요소를 지닌다. GT-1 유사 전사 인자(AtGT-3b)의 발현은 병원체 또는 NaCl 처리에 반응하여 신속하게 증가되었다.
- [0008] 그러나 2개의 또다른 AtGT-1-관련 전사 인자의 발현은 병원체 또는 NaCl 처리에 의해 변화되지 않았다. 더욱이 칼모듈린 프로모터 -1207 내지 -1128 bp 번째 잔기 영역은 병원체 자극 후 2개의 대두 ZF-HD 단백질인 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 1(*GmZF-HD1*) 및 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 2(*GmZF-HD2*)와 특이적으로 상호작용하는 ATTA 호메오도메인 결합 부위의 2개 반복서열을 포함하는 30개의 A/T로 주로 구성된 시스-요소를 포함한다.
- [0009] 상기 칼모듈린 이소폼 4 프로모터내의 DNA 결합 단백질의 발현을 위한 A/T로 주로 구성된 20 내지 30개의 뉴클레오타이드를 지니고 두 개 이상의 ATTA 모티프를 지닌 유전자 단편은 본 발명자들에 의해 대한민국 공개특허 공보 제10-2008-110217호 '칼모듈린 이소폼 4 프로모터내의 DNA 결합 단백질 발현을 위한 유전자 단편'에

개시된 바 있다.

[0010] 또한 ZF-HD 단백질도 생물적 스트레스 신호전달 및 반응과 관련된다는 것이 확인되었다. 따라서 본 발명자들은 형질전환 다양한 *GmCalM-4* 프로모터 결실을 지닌 GUS 리포터 컨스트럭트를 생성하고 담배 식물체 내에서 GUS 발현을 분석하였다. GUS 발현 분석은 이중 시스템 내에서 2개의 종전 확인된 핵심 영역이 *GmCalM-4* 유전자 발현 유도과 관련됨을 나타내었다.

[0011] 이후 병원체 자극 후 ZF-HD 단백질의 DNA-결합 특이성을 확인하는 것이 중요하였다. 본 발명에서 본 발명자들은 GmZF-HD1과의 상호작용 및 결합을 위한 *GmCalM-4* 프로모터 내 DNA 서열의 특이성을 규명하였다. 특이적 결합을 모니터링하기 위해 본 발명자들은 *GmCalM-4* 프로모터의 30개의 A/T로 주로 구성된 시스-요소 내 보존 호메오도메인 결합 부위인 ATTA의 2개 반복서열 이외에 AG 서열의 필요성을 측정하였다. 전체 GmZF-HD1 단백질 결합 활성을 위해 AG 서열로 포위된 25개 이상의 A/T로 주로 구성된 서열 스트레치(stretch)를 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 해결하려는 과제는 병원체 또는 염 스트레스에 반응하여 글리신 맥스 징크 핑거 호메오도메인 단백질 1(GmZF-HD1) 또는 글리신 맥스 징크 핑거 호메오도메인 단백질 2(GmZF-HD2)의 DNA-결합 특이 영역을 확인코자 한 것이다. 또한 대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCalM-4*) 프로모터의 A/T로 주로 구성된 25~30개의 뉴클레오타이드에서 상기 호메오도메인 단백질 결합 부위인 2개 이상의 ATTA 모티프 반복서열 이외에 AG 서열의 필요성을 확인코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 목적은 병원체 또는 염 스트레스에 대응하여 발현하는 대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCalM-4*) 프로모터 (GenBank 수납번호 AY052528)에 있어서, 상기 대두 칼모듈린 이소폼-4 프로모터 내의 DNA 결합 단백질의 결합 부위인 A/T로 주로 구성된 25~30개의 올리고뉴클레오타이드는 2개 이상의 ATTA 모티프 반복서열과 별도의 AG 서열을 지님을 특징으로 하는 대두 칼모듈린 이소폼-4 프로모터 유전자 단편을 제공하는 것이다.

[0014] 또한 상기 유전자 단편은 P-AG-Q-ATTA-R-ATTA-S(식 I)로 표시됨을 특징으로 하는 유전자 단편이다. 상기 식에서 P는 0~5개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이고, Q는 1~3개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이며 R은 1~10개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이고 S는 0~5개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이다. 단 P, Q, R, S의 뉴클레오타이드 염기 중 60% 이상은 아데닌(A) 또는 티민(T)임을 특징으로 한다.

[0015] 한편 상기 DNA 결합 단백질은 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 1(GmZF-HD1)(GenBank 수납번호 AY695729) 또는 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 2(GmZF-HD2)(GenBank 수납번호 AY695730)임을 특징으로 한다.

[0016] 또한 본 발명의 또다른 목적은 대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCalM-4*) 프로모터의 발현은 GT-1 유사 단백질과 상호작용하는 서열번호: 1로 표시되는 *GmCalM-4* 프로모터의 GT-1 시스-부위(프로모터 내의 -858 내지 -728 bp 번째 잔기) 또는 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 1 또는 2와 상호작용하는 서열번호: 2로 표시되는 AG 서열을 포함하는 A/T로 주로 구성된 시스-부위(프로모터 내의 -1207 내지 -1128 bp 번째 잔기(E3))에 의해 발현됨을 특징으로 하는 대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCalM-4*) 프로모터를 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0017]

본 발명의 효과는 병원체 또는 염 스트레스에 반응하여 글리신 맥스 징크 핑거 호메오도메인 단백질 1(GmZF-HD1) 또는 글리신 맥스 징크 핑거 호메오도메인 단백질 2(GmZF-HD2)의 DNA-결합 특이 영역을 확인한 것이다. 또한 대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCalM-4*) 프로모터의 A/T로 주로 구성된 25~30개의 뉴클레오타이드에서 상기 호메오도메인 단백질 결합 부위인 2개 이상의 ATTA 모티프 반복서열 이외에 AG 서열의 필요성을 확인한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018]

도 1은 대두 게놈 내 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 1(*GmZF-HD1*) 유전자의 게놈 서던 블롯 분석을 나타낸다. 게놈 서던 블롯 분석은 실시예에 기재된 바와 같이 수행되었다. 좌측 상의 숫자는 DNA 크기를 나타낸다.

도 2는 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 1/-2(GmZF-HD1/-2)의 DNA 결합 도메인 서열과 다른 호메오도메인 단백질의 비교를 나타낸다. 공통 서열은 다양한 종류의 호메오박스(homeobox) 단백질의 19개 멤버를 포함함으로써 수립되었다. 대시(dash)는 잔기의 부재를 나타낸다. GenBank 수납 번호는 괄호 안에 나타나 있다: GmZF-HD1(AY695729), GmZF-HD2 (AY695730), FtHB1(Y18577), FbHB2(Y18579), FbHB3(Y18580), FbHB4(Y18581), ATHB24(AC006439), ATHB25(AB011479), ATHB26(AB011483), ATHB27(AB007647), ATHB28(AL049862.1), OsHB1(AC007858), ATH1(X80126), PRHA(L21991), STM(U32344), KN1(X61308), KNAT3(X92392), ATML1(U37589) 및 GL2(L32873). 헬릭스 1, 2 및 3의 위치가 나타나 있다.

도 3은 GmZF-HD1 단백질과 *GmCalM-4* 프로모터 유래의 80 bp(A-2 영역)의 상호작용을 나타낸다. 재조합 GST::GmZF-HD1 단백질은 80 bp DNA 단편(A-2 영역; -1207 내지 -1128 bp)에 결합하였고 DNA-단백질 복합체는 10 내지 200-배 물인 과량의 자가-경쟁자에 의해 명백하게 감소되었다. 결합 반응은 경쟁자로서 비표지 80-bp DNA 단편의 부재 또는 존재 하에 재조합 GST-융합 GmZF-HD1 단백질 및 ³²P-표지 80-bp DNA 단편(40 kcpm)으로 수행되었다. 레인 1은 프리 프로브만을 포함하였다. 레인 2는 0.1 μ g GST 단백질을 포함하였다. 레인 3~7은 0.1 μ g GST::GmZF-HD1 단백질을 포함하였다. 경쟁적 겔 이동 변화 분석의 경우 GST::GmZF-HD1 단백질은 프로브로서 ³²P-표지 80-bp DNA 단편의 첨가 전 10-배(레인 4), 50-배(레인 5), 100-배(레인 6) 또는 200-배(레인 7) 물 과량으로 예비 인큐베이트되었다. 프리(화살표) 및 단백질-복합화(화살촉) 프로브는 8% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리되고 자가조직방사선촬영에 의해 시각화되었다.

도 4는 시험관 내 GmZF-HD1 단백질과 결합하는 AG 서열의 중요성을 나타낸다. 도 4(A)는 *GmCalM-4* 프로모터 내 각각의 30-bp 단편의 3개 중복 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 각각의 방사선 활성 단편(E1 내지 E3)은 EMSA에 의한 DNA 결합 분석을 위한 프로브로 사용되었다. 도 4(B)는 재조합 GmZF-HD1의 E1, E2 및 E3 DNA 단편과의 DNA 결합능을 나타낸다. 결합 반응은 각각 재조합 GmZF-HD1 단백질 또는 병원체-처리 대두 현탁 배양액 세포 유래의 세포핵 추출물 및 프로브로서 ³²P-표지 3개 중복 올리고뉴클레오타이드(E1, E2 및 E3)으로 수행되었다. 레인 1 및 6은 프리 DNA 프로브만을 포함하였다. 레인 2는 0.1 μ g GST 단백질을 포함하였다. 레인 3~5는 0.1 μ g GST::GmZF-HD1 단백질을 포함하였다. 레인 7~9는 3 μ g의 병원체-처리 대두 세포핵 추출물을 포함하였다. 프리(화살표) 및 단백질-복합화(화살촉) 프로브는 8% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리되었고 방사능촬영에 의해 시각화되었다. "NE"는 병원체-처리 대두 세포핵 추출물을 나타낸다.

도 5는 생체 내 GmZF-HD1 프로모터의 AT-풍부 시스-요소 내 AG 서열의 돌연변이 효과를 나타낸다. 도 5(A)는 -1286 내지 -1065 및 -858 내지 -728 bp 영역의 *GmCalM-4* 프로모터 컨스트럭트(*pBI 4delIF*) 및 AT-풍부 시스-요소 내 2개의 돌연변이화 잔기를 지닌 돌연변이체(*pBI 4delIF M1*)의 개략도를 나타낸다. 프로모터는 최소 TATA 프로모터-GUS 컨스트럭트에 융합되었다. pDel. 151-8은 대조군으로 사용되는 TATA-최소 프로모터 GUS를 나타낸다. 도 5(B)는 GUS 발현 상의 *GmCalM-4* 프로모터 내 AT-풍부 시스-요소의 돌연변이 효과를 나타낸다. 트랜스펙트된 애기장대 원형질체는 물(백색 막대) 또는 토마토 DC3000 슈도모나스 시링게(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)(흑색 막대)로 12시간 동안 처리되었다. 트랜스펙션 효율의 표준화를 위해 *CaMV 35S* 프로모터-LUC 플라스미드가 각 실험에서 동시-트랜스펙션되었다. 데이터는 3개의 독립 실험의 평균 $\pm$ SE로 표기된다.

도 6은 *GmCalM-4* 프로모터 내 GmZF-HD1와 E3 단편의 결합 특이성을 나타낸다. 도 6(A)는 프로브 또는 경쟁자로 사용된 E3 단편 및 돌연변이화 단편(M_{core})의 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 도 6(B)는 프로브로서

E3 또는 M_{core} 단편과 제조합 GmZF-HD1의 EMSA에 의한 DNA 결합 반응을 나타낸다. 방사성 프로브는 제조합 GmZF-HD1(레인 3 및 4) 또는 GST 단독(레인 2)의 존재하에 인큐베이트되었다. 레인 1은 프리 DNA 프로브를 포함하였다. 도 6(C)는 경쟁자로서 E3 또는 M_{core} 단편을 이용한 경쟁적 겔 이동 변화 분석을 나타낸다. DNA 결합 반응은 비표지 경쟁자의 존재 하에 제조합 GST-융합 GmZF-HD1 단백질 및 ³²P-표지 E3 단편으로 수행되었다. 각각의 경쟁자 DNA(200-배 물 과량)가 반응 혼합물에 첨가되었다. 도 6(D)는 E3 단편의 결실된 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 도 6(E)는 E3 단편 내 결실된 올리고뉴클레오타이드의 DNA 결합능을 나타낸다. 프리(화살표) 및 단백질-복합화(화살촉) 프로브는 8% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리되고 방사능촬영에 의해 시각화되었다.

도 7은 병원체 및 염 스트레스에 반응한 *GmCalM-4* 유전자의 발현에 대해 제안된 모델을 나타낸다. 병원체 및 염 스트레스와 같은 환경 스트레스에 반응하는 *GmCalM-4*의 발현은 *GmCalM-4* 프로모터의 GT-1 시스-요소(-858 내지 -728 bp; GT-1 유사 전사 인자) 및 AG 서열을 포함하는 AT-풍부 시스-요소(-1207 내지 -1128 bp (E3); GmZF-HD 전사 인자)에 의해 매개된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 징크 핑거-호메오도메인(ZF-HD)은 많은 식물종에서 확인되었다. 대두(*Glycine max*)에서 GmZF-HD1은 병원체에 반응하여 대두 칼모듈린 이소폼-4(*GmCalM-4*) 유전자를 활성화시키는 전사 인자로 작용한다.

[0020] 최근 본 발명자들은 *GmCalM-4* 프로모터의 -1207 내지 -1128 bp 내의 보존 호메오도메인 결합 부위인 ATTA의 2개의 반복서열로 구성된 30-nt A/T-풍부 시스-요소에 대한 GmZF-HD1의 특이적 결합을 보고한 바 있다. 본 발명에서 본 발명자들은 GmZF-HD1 단백질의 호메오도메인 서열을 다른 호메오도메인 단백질과 비교하고 *GmCalM-4* 프로모터와 GmZF-HD1 단백질의 상호작용시 DNA 서열의 특이성의 특징을 부여하였다. 식물 내 호메오도메인의 보존 고려시 30-nt A/T-풍부 시스-요소 내 AG 서열이 GmZF-HD1 단백질 결합에 요구된다. AG 서열을 포함하는 약 25개의 A/T-풍부 DNA 서열이 GmZF-HD1 단백질의 효과적인 결합에 필수적이다. 따라서 본 결과는 GmZF-HD1 단백질이 *GmCalM-4*의 프로모터와 상호 작용함으로써 식물 스트레스 신호전달에 특이적으로 작용한다는 견해를 지지한다.

[0021] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0022] 대두 내 ZF-HD 패밀리 멤버인 GmZF-HD1의 특성

[0023] 본 발명자들은 병원체 자극에 반응하여 *GmCalM-4* 프로모터의 -1207 내지 -1128 영역 내의 30개 A/T-풍부 시스-작용 부위에 특이적으로 결합하는 2개의 전사 조절제인 GmZF-HD1 및 GmZF-HD2를 분리한 바 있다. GmZF-HD1 단백질은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 ATHB24, 25, 26, 27 및 28과 플라베리아 트리네비아의 FtHB1을 포함하는 식물 유전자의 ZF-HD 패밀리 내에 존재하는 높게 보존된 추정 징크 핑거 도메인 및 DNA 결합 호메오도메인을 지닌다. 대두 게놈 내 GmZF-HD1의 복사체 수를 측정하기 위해 프로브로서 방사성동위원소 표지된 GmZF-HD1 cDNA 클론으로 게놈 DNA 겔 블롯 분석이 수행되었다. 도 1에 나타난 바와 같이 2개의 주요 혼성화 밴드가 높은-스트린전시 조건 하에서 관찰되었고, 이는 GmZF-HD1 및 GmZF-HD2가 대두 게놈 내에 존재함을 의미한다.

[0024] ZF-HD 타입 호메오도메인은 64개 아미노산 잔기로 구성된다. 호메오도메인에 전형적인 3개의 헬릭스를 형성함이 예측된다. GmZF-HD1의 DNA 결합 특이성을 조사하기 위해 본 발명자들은 GmZF-HD1의 호메오도메인 서열을 식물체 내 또다른 호메오도메인 단백질과 비교하였다(도 2). 모든 호메오도메인 단백질은 각각 2개의 불변성 아미노산인 트립토판(W₅₅) 및 아스파라긴(N₅₈)을 보유한다.

- [0025] 한편 ZF-HD 패밀리 멤버는 각각 세 번째 헬릭스 내에서 W₅₅ 다음의 페닐알라닌(F)의 비극성 잔기(Met, Ile 또는 Leu)로, 잔기 60에서 아르기닌(R)에서 라이신(K)으로의 치환을 나타낸다. 더욱이 이들 단백질의 가장 명백한 특징은 헬릭스 1과 헬릭스 2 사이의 루브 내에 삽입된 4개의 여분의 아미노산이 존재한다는 점이다. 식물 ZF-HD 패밀리 내 호메오도메인의 일반적으로 높은 보존을 고려할 때 ZF-HD 단백질 내 나타나는 변화는 이들 전사 인자가 다양한 환경 자극에 반응하게 할 수 있는 관찰된 DNA-결합 특이성의 다양성에 대한 설명을 제공한다.
- [0026] GmZF-HD1과 GmCaM-4 프로모터와의 특이적 상호작용
- [0027] GmCaM-4 프로모터 내 GmZF-HD1의 결합 서열을 명백하게 지도화하기 위해 본 발명자들은 *E. coli* 내 GST 및 A-2 영역(80개; 위치 -1207 내지 -1128)에 융합된 재조합 전장 GmZF-HD1 단백질을 이용한 전기영동 이동 변화 분석을 수행하였다. 이러한 영역은 GmCaM-4 프로모터의 A/T-풍부 시스-작용 요소 서열을 포함하였다. 재조합 GST::GmZF-HD1 융합 단백질은 GmCaM-4 프로모터의 A-2 영역에 강하게 결합하였다(도 3). 더욱이 GST::GmZF-HD1의 DNA 결합 특이성은 경쟁 실험에 의해 확인되었다(도 3). 200-배 몰 과량의 비표지 A-2 단편은 GST::GmZF-HD1에 대한 A-2 단편 결합을 완전하게 차단하였다. 이러한 결과는 GmZF-HD1 단백질이 GmCaM-4 프로모터의 A/T-풍부 시스-작용 요소를 포함하는 A-2 영역(80개; 위치 -1207 내지 -1128)과 특이적으로 상호 작용한다는 증거를 제공한다.
- [0028] AT-풍부 시스-요소 내 GmZF-HD1 단백질에 결합하는 AG 서열의 중요성
- [0029] DNase I 풋-프린팅 분석을 기반으로 AT-풍부 시스-작용 요소(AGTAATTAAATAATAAATTA)를 포함하는 20개 서열이 GmZF-HD1 단백질에 의해 결합되는 모티프로서 확인된 바 있다. 따라서 단백질 결합 부위의 위치를 더욱 정확하게 한정하기 위해 본 발명자들은 각각 30 bp 길이의 3개의 이중-나선 올리고뉴클레오타이드를 고안하였다(E1, E2 및 E3, 도 4A).
- [0030] 이후 본 발명자들은 재조합 GST::GmZF-HD1 융합 단백질 및 프로브로서 각각의 30 bp 단편을 이용한 EMSA(Electrophoretic mobility shift assay)를 수행하였다. 재조합 GmZF-HD1 단백질은 각각 E1 및 E3 단편에 효과적으로 결합된 반면(도 4B, 레인 3 및 5) E2 단편의 결합은 재조합 GST::GmZF-HD1 융합 단백질로 미약하게 검출되었다(도 4B, 레인 4). 더욱이 본 발명자들은 병원균-처리 대두 세포핵 추출물을 이용하여 EMSA도 수행하였다(도 4B). 도 4B에서 E1 및 E3 단편은 병원균-처리 대두 세포핵 추출물과 단단하게 결합되었다. 한편 E2 단편의 결합은 거의 완전하게 소실된 것으로 나타났다(도 4B; 레인 7, 8 및 9). 이들 단편의 서열 조사는 AG 서열이 GmZF-HD1 단백질에 대한 전체 결합에 필요함을 나타내었다.
- [0031] 시험관 내 DNA 결합에 의해 확인된 GmCaM-4 프로모터의 AT-풍부 시스-요소 내 AG 서열이 실질적으로 병원체 반응에 역할을 하는지 여부를 더욱 상세하게 확인하기 위해 본 발명자들은 AT-풍부 시스-요소 내 AG에서 CA로의 돌연변이를 포함하는 돌연변이 GmCaM-4 프로모터(-1286 내지 -1065 및 -858 내지 -728; pBI 4delF)-GUS 컨스트럭트를 고안하였다(도 5A). GmCaM-4 프로모터 내 -858 내지 -728 bp 및 -1286 내지 -1065 bp의 2개의 영역(pBI 4delF)은 GmCaM-4 유전자 발현을 위한 중요한 시스-요소를 포함하고, 이는 병원체 및 염 스트레스에 대한 반응시 중요한 역할을 한다. pBI 4delF는 병원체 처리 후 GUS 리포터 유전자의 7- 내지 8-배 유도를 나타내었다. 그러나 pBI 4delF M1 돌연변이 컨스트럭트는 야생형 프로모터와 비교시 동일한 처리에 의해 약 5-배 유도, 35% 감소를 반복적으로 나타내었다(도 5B). 이들 관찰은 GmZF-HD1이 병원체 자극에 반응하는 GmCaM-4 프로모터 내 AG 서열을 포함하는 표준 ATTA 호메오도메인의 2개 반복서열과 상호 작용함을 의미한다.
- [0032] GmZF-HD1 단백질과 AG 서열을 포함하는 AT-풍부 시스-요소와의 결합 특이성

- [0033] AG 모티프 및 2개의 ATTA 핵심 요소 이외에 가능한 다른 서열의 중요성을 상세하게 수립하기 위해 본 발명자들은 도 6A에 나타난 바와 같은 30-nt 서열(E3)의 하나의 돌연변이화 버전(M_{core})을 고안하였다. 재조합 GmZF-HD1 융합 단백질의 야생형(E3) 또는 돌연변이화 30-nt 서열(M_{core})에 결합할 수 있는 능력은 EMSA 및 경쟁 분석을 이용하여 조사되었다(도 6B 및 C). GmZF-HD1 융합 단백질은 E3 단편에는 강하게 결합하였으나 M_{core} 단편에는 그렇지 않았다(도 6B). 이러한 결과를 확인하기 위해 본 발명자들은 프로브로서 E3 단편 및 경쟁자로서 E3(비표지)과 M_{core} 단편을 이용하여 경쟁 분석을 수행하였다(도 6C). 200-배 물 과량의 E3은 그 자체에 대한 결합을 완전하게 저해하였다.
- [0034] 그러나 경쟁자로서 M_{core} 은 DNA-단백질 복합체의 형성에 영향을 미치지 않았고, 이는 DNA 결합 분석에서 관찰된 바와 유사하였다. 이들 결과는 *GmCaM-4* 프로모터 내 2개의 ATTA 반복서열 핵심 시스-작용 요소 이외에 AG 디뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 서열이 GmZF-HD1 단백질에 결합하기 위해 필수적임을 강력하게 나타낸다.
- [0035] 핵심 시스-작용 요소로서 2개의 ATTA 반복서열을 포함하는 DNA 서열 길이가 GmZF-HD1의 결합 활성화에 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위해 본 발명자들은 3개의 이중-나선 올리고뉴클레오타이드를 고안하였다. 가장 긴 30-bp 올리고뉴클레오타이드는 E3 서열이었고(상기 참조) 3'-말단으로부터의 절단을 지닌 길이 내 2개의 짧은 서열은 각각 25 bp 및 20 bp이었다(도 6D). 이후 본 발명자들은 GmZF-HD1 단백질로 EMSA를 수행하였다(도 6E). 프로브로서 E3 단편 이용시 이동 변화는 충분히 입증되었고 E3a 단편에 의해서는 미약하게 나타났다. 그러나 E3b 단편은 GmZF-HD1 단백질에 대한 어떠한 결합도 나타내지 않았다. 이들 결과는 약 25-bp의 DNA 서열이 최소 결합 활성화에 필수적임을 나타낸다.
- [0036] 전사 수준에서 유전자 발현 조절은 많은 생물학적 과정을 제어한다. 이는 세포주기조절, 대사 균형 또는 환경에 대한 반응과 같이 다양한 활성화의 유력한 제어 모델이다. 이러한 조절을 달성하기 위해 전사 인자는 DNA-단백질 상호작용, 단백질-단백질 상호작용 및 염색질 구조의 변형을 포함한 여러 메커니즘에서 작용한다.
- [0037] 유전자 발현 특이성은 서열-특이적 방식으로 DNA에 결합하는 전사 인자에 의해 달성된다. 스트레스 많은 환경 내 변화를 항상 인식하고, 측정하고, 반응해야 하는 식물체는 후성적 및 전형적인 번역 과정을 포함한 유전자 전사 및 다운스트림 메커니즘의 활성화 또는 억제를 유발하는 다수의 신호전달 경로에 의해 제어를 달성한다. 스트레스 반응시 프로모터의 시스-작용 요소 및 그의 관련된 결합 단백질 파트너는 중요한 역할을 한다. 이들 단백질은 상이한 형태의 DNA-결합 도메인을 인식하고; 이들은 일반적으로 그의 존재를 필요로 하는 조건에 의해 또는 시스-요소 또는 AP2/ERF, bZIP/HD-ZIP, MYB, MYC, NAC, WRKY 및 여러 종류의 호메오도메인(HD)과 같은 단백질 도메인 내 서열 특징에 의해 확인된다.
- [0038] 본 발명자들은 종전 유인제로서 80-bp(A2) *GmCaM-4* 프로모터 단편을 이용한 효모 원-하이브리드 선별 방법에 의해 대두에서 GmZF-HD1/-2 단백질을 분리한 바 있다. GmZF-HD1/-2 단백질은 대두내 신규한 징크-핑거 호메오도메인(ZF-HD) 서브패밀리를 명기한다.
- [0039] 본 발명에서 본 발명자들은 GmZF-HD1/-2가 그 자체로 별개의 종류의 칼모듈린 단백질에 속하는 칼모듈린(*CaM-4*)의 발현을 조종하는 *GmCaM-4* 프로모터와 특이적으로 상호작용함을 나타낸다. 식물체에서 다수의 칼모듈린(*CaM*) 이소폼이 발현된다. 이들은 생물적 및 비생물적 스트레스에 의해 유도된 것과 같은 다양한 Ca^{2+} -매개 신호의 변환에 중추적인 역할을 한다. GmCaM-4는 식물계 및 동물계에서 보고된 가장 많이 분지된 이소폼이다.
- [0040] 분지된 GmCaM-4는 식물 병원체 저항성 및 염 내성과 관련된 것으로 알려져 있다. 따라서 *GmCaM-4* 발현과 관련

한 정확한 DNA 결합 부위를 확인하는 것이 중요하였다. 본 발명자들은 본 발명에서 *GmCaM-4* 프로모터의 시스-작용 요소를 구성하는 30-뉴클레오타이드 길이 A/T-풍부 DNA 서열 내 DNA 서열의 특징을 부여하였다.

[0041] 본 발명의 데이터는 *GmCaM-4* 프로모터 내 GmZF-HD1의 생산적 결합이 보존 호메오도메인 결합 부위인 ATTA의 2개 반복서열뿐만 아니라 30-뉴클레오타이드 길이 A/T-풍부 서열 내 AG 서열도 필요로 함을 나타낸다(도 4 및 5). 더욱이 본 발명자들은 GmZF-HD1 단백질의 최소 DNA 결합 부위 길이인 25개 이상의 뉴클레오타이드이어야 하는 이러한 요소의 길이에 대한 필요조건을 확인하였다(도 6).

[0042] ZF-HD 단백질은 애기장대 꽃 발달시 주로 조절 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 확실하게는 생물적 및 비생물적 스트레스 조건 하에 ZF-HD 단백질 기능에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 최근 AtZFHD1(At1g69600 또는 ATHB29로도 표기됨)은 탈수-유도가능 유전자의 프로모터 내 ZFHD 인식 서열에 결합함이 보고되었다.

[0043] 더욱이 본 발명자들은 병원체-유도가능 *GmCaM-4* 유전자 발현시 GmZF-HD1 단백질의 연구를 보고한 바 있다. 이후 본 발명자들은 GmZF-HD1 단백질이 식물 스트레스 신호전달에 대한 연루로 인해 다른 ZF-HD 단백질과 비교시 그의 호메오도메인 내에서 상이한 아미노산 서열을 지니거나 상이한 구조를 나타내는 것으로 추측하였다. GmZF-HD1 호메오도메인 아미노산 서열이 보존되기 때문에 이는 이러한 경우가 아닌 것으로 간주된다(도 2). 따라서 본 발명자들은 GmZF-HD1에 의한 *GmCaM-4* 프로모터의 조절이 다양한 스트레스 조건에 반응하여 또다른 전사 인자 또는 결합 단백질과의 국소화 또는 이량체화의 세포내 변화와 같은 번역-후 변형을 진행해야 한다는 가능성을 고려해야 한다.

[0044] ZF-HD 단백질에 의한 또다른 전사 인자와의 이량체화를 지지하는 증거는 효모 원-하이브리드 분석을 이용하여 애기장대 ZF-HD 패밀리의 멤버간의 이형이량체화의 특성에서 추론된다. ZF-HD 단백질의 이형이량체화는 타겟 유전자 프로모터에 대한 특이성 조절에 대한 가능한 설명으로 판명되었다.

[0045] 예를 들어 호메오도메인 단백질인 Aristaless-like4(Alx4) 및 Goosecoid는 동형- 또는 이형-이량체를 형성한다. DNA 결합 특이성은 상이한 DNA 서열에 대한 상이한 이량체 조합 결합에 따라 달라진다. 또다른 예는 그 특이성이 이량체 파트너에 따라 달라지는 TALE 호메오도메인 단백질의 하위세포 국소화를 조절하는 식물-특이적 단백질 패밀리의 애기장대 달걀 모양 패밀리의 단백질(AtOPF)이다. 따라서 GmZF-HD1과 직접적으로 상호작용하는 보조인자를 확인하도록 목표된 추가 연구는 GmZF-HD1이 식물 내 스트레스 신호전달과 관련하여 *GmCaM-4* 프로모터를 특이적으로 조절하는 메커니즘을 규명해야 한다.

[0046] 결론적으로 본 발명자들은 병원체 또는 염 자극에 반응한 *GmCaM-4* 유전자 발현에 대한 모델을 제안한다(도 7). *GmCaM-4*의 발현은 GT-1 유사 단백질과 상호작용하는 GT-1 시스-작용 요소 및 GmZF-HD1 단백질과 상호작용하는 특정 AT-풍부/AG-포함 시스-작용 요소(E3)에 의해 조절된다. 또한 AG 서열을 포함하는 25-nt 이상의 A/T-풍부 서열이 *GmCaM-4* 프로모터 내 최소 GmZF-HD1 단백질의 결합에 필요하다. 본 발명의 결과는 반응이 그 자체로 스트레스-유도 가능한 스트레스-내성 형질전환 식물의 개발에 이용되는 정보를 제공한다.

[0047] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0048] (실시예 1) 식물 재료 및 박테리아 스트레인

[0049] 세포 현탁 배양액 세포(*Glycine max* L. cv. Williams 82; W82)는 0.75 mg/L 벤질 아데닌으로 보충된 Murashige and Skoog 배지 내에서 성장되고 130 rpm으로 진탕하면서 암조건의 25°C에서 유지되었다. 대두

현?? 배양액 세포는 박테리아 병원체인 *avrA*를 지닌 세균성점무늬병균(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) 스트레인으로 접종되었다. 박테리아는 적당한 항생제로 보충된 액체 King 배지 B 내에서 성장되고 Rajasekhar, V.K. et al., Plant Physiol. 120, 1137-1146, 1999에 기재된 바와 같이 조작되었다. 박테리아 배양액은 세척되고 10 mM MgCl₂ 내에 재현탁되었고, 박테리아 농도는 OD₆₀₀ nm에서의 흡광도에 의해 측정되었다. DNA 클로닝을 위해 대장균(*Escherichia coli*) XL1-Blue MRF' 및 DH 5α(Stratagene, La Jolla, CA, USA) 이 박테리아 스트레인으로 사용되었다. 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST) 융합 단백질은 *E.coli* BL21 (pLys S) DE3 내에서 발현되었다.

[0050] (실시예 2) 게놈 서던 블롯 분석

[0051] 게놈 DNA는 Dellaporta, S.L. et al., Plant Mol. Biol. Rep. 1, 19-21, 1983에 기재된 방법에 따라 4-일령 대두 모종에서 추출되었다. 10 μg의 정제된 게놈 DNA는 제한 효소(*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sal*I 및 *Xba*I)로 완전하게 분해되고, 0.8% 아가로스 겔 상에서 분리되고, 나일론 멤브레인(Hybond N⁺, Amersham) 상으로 이동되었다. UV 교차-결합 후 멤브레인은 65℃에서 밤새 0.5 M Na₂HPO₄ pH 7.2, 1 mM EDTA, 1% BSA 및 7% SDS의 용액 내 ³²P-표지 GmZF-HD1 cDNA 프로브에 혼성화되었다. 멤브레인은 0.1% SDS를 함유한 2 x SSC(1 x SSC는 0.15 M NaCl, 0.015 M 구연산나트륨염)로 10분간 2회 세척된 후 0.1% SDS를 함유한 0.2 x SSC로 10분간 2회 세척되었다. 블롯은 공기-건조되고 -70℃에서 X-선 필름에 노출되었다.

[0052] (실시예 3) *E. coli* 내 재조합 단백질의 발현 및 정제

[0053] 전장 *GmZF-HD1* cDNA는 단백질 발현 벡터 pGEX-2T-링커 I(Amersham Pharmacia Biotech)의 *Bam*HI 및 *Xho*I 사이트 내로 클론되었다. 수득된 컨스트럭트는 DNA 서열분석에 의해 확인되었다. 이후 재조합 플라스미드는 *E. coli* BL21(pLys S) DE3 스트레인 내로 도입되었고, 형질전환체는 30℃에서 암피실린(50 μg/ml) 및 클로람페니콜(33 μg/ml)을 함유한 Luria-Bertani 액체배지 내에서 성장되었다. 재조합 단백질의 발현은 배양액의 OD₆₀₀이 0.6에 도달하면 이소프로필 β-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 0.4 mM의 농도로 배지에 첨가함으로써 유도되었다. 세포는 인큐베이션 4시간 후 채취되었고, 0.1 mM PMSF를 지닌 1 x PBS 완충액(140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ 및 1.8 mM KH₂PO₄를 함유한 인산염-완충 식염수 pH 7.6) 내에 재현탁되었다. 재현탁된 세포는 초음파파쇄에 의해 분쇄되었고, 용해질의 용해성 분획은 10,000 xg에서 20분간 원심분리에 의해 채취되었다. 재조합 GST 융합 단백질은 제조사의 프로토콜(Amersham Pharmacia Biotech.)에 기재된 바와 같이 글루타티온-아가로스 비드를 이용하여 정제되었다.

[0054] (실시예 4) 대두 세포핵 추출물의 제조

[0055] 대두 세포핵 추출물은 Nagao, R.T. et al., Plant Mol. Biol. 21, 1147-1162, 1993에 기재된 절차를 이용하여 약 1시간 동안 *avrA*를 지닌 세균성점무늬병균으로 처리된 대두 현탁 배양액 세포(W82)로부터 제조되었다. 대두 현탁 배양액 세포(W82)는 채취되고 액체 질소 내에 신속하게 동결되고 균질화 완충액(0.5 M 슈크로스, 10 mM Hepes pH 7.9, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT 및 프로테아제 저해제 콕테일[Roche Applied Science]) 내에서 균질화된 후 Miracloth를 통해 여과되었고, 여과물은 3000 xg 속도로 원심분리되었다. 펠렛은 작은 브러쉬로 서서히 세포핵 세척 완충액(20% 글리세롤, 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM MgCl₂) 내에서 2회 세척되었다. 펠렛은 4℃에서 30분간 완만하게 진탕되면서 높은-염 추출 완충액(10 mM HEPES pH 7.9, 450 mM NaCl, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 5% 글리세롤 및 프로테아제 저해제 콕테일[Roche Applied Science]) 내에 재현탁되었다. 추출물은 원심분리(1시간 동안 33 Krpm)에 의해 정화되었고, 상청액은 완만한 교반 하에 황산암모늄으로 45% 포화되었다. 침전된 단백질은 원심분리(10분간 10 Krpm)에 의해 채취되었고, 펠렛은 투석 완충액(20 mM HEPES pH 7.9, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 20% 글리세롤 및 프로테아제 저해제 콕테

일[Roche Applied Science]) 내에 재현탁되고 투석 완충액에 대해 광범위하게 투석되었다. Bradford 단백질 분석 키트(Bio-Rad)에 의한 단백질 농도 측정을 위해 일정량이 채취되었고, 일정량의 추출물은 -70℃에서 동결되었다.

[0056] (실시예 5) 전기영동 이동 변화 분석(EMSA)

[0057] DNA-표지 및 EMSA는 Hong, J.C. et al., Plant J. 8, 199-211, 1995 및 Park, H.C. et al., Nucleic. Acids Res. 35, 3612-3623, 2007에 기재된 바와 같이 수행되었다. DNA 프로브는 ³²P-표지에 말단-표지되고, 용출되고, LSC 계측기(Beckman Co.)로 정량되었다. 대두 세포핵 추출물과 GST 융합 단백질 모두는 실온에서 10분간 결합 완충액(20 mM HEPES pH 7.9, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 2 μg 폴리 dI/dC, 50 mM KCl 및 15% 글리세롤) 내에서 예비-인큐베이트된 후 40 Kcpm의 말단-표지 DNA 프로브와 20분간 인큐베이트되었다.

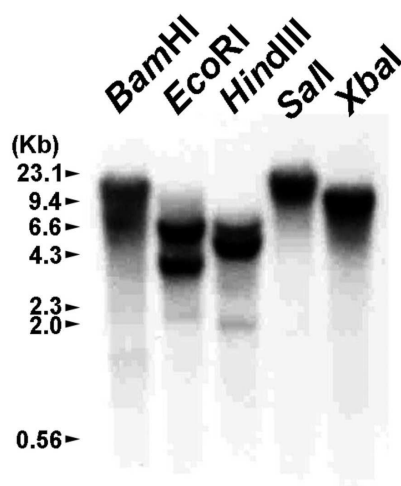
[0058] 수득된 단백질-DNA 복합체는 0.5 x TBE 완충액 내의 비-변성 8% 폴리아크릴아마이드 겔 내에서 전기영동되었다. 이후 겔은 건조되고 X-선 필름에 노출되었다.

[0059] (실시예 6) 애기장대 원형질체 트랜스펙션 및 형광측정 GUS 분석

[0060] Abel, S. and Theologis, A. Plant J. 5, 421-427, 1994에 기재된 바와 같이 애기장대 원형질체가 제조되고 폴리에틸렌 글리콜-매개 DNA 트랜스펙션이 수행되었다. 일시적인 발현 분석은 Park, H.C. et al., Plant Physiol. 135, 2150-2161, 2004에 기재된 바와 같이 수행되었다. 트랜스펙션 효율을 표준화하기 위해 *CaMV 35S* 프로모터-*LUC* 플라스미드가 각각의 실험에서 동시 트랜스펙트되었다.

도면

도면1



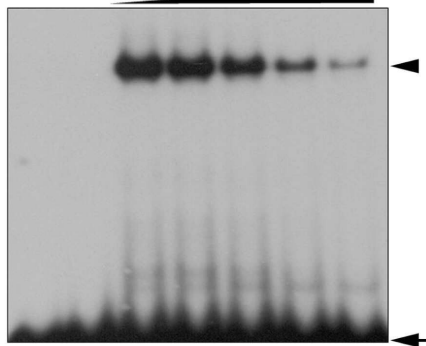
도면2

	GmZF-HD1	-KKRFR-TKPSAQKEKMLGFAEKLGWKLQK-EVDDEIERFCKSVGVTRQVFKVWMHNNKNN-SNTSTN
	GmZF-HD2	-KKRFR-TKPSAQKEKMLGFAEKLGWKLQK-EVDXEIERFCKSVGVTRQVFKVWMHNNKNN-SNSSTN
	FtHB1	-KKRFR-TKPSQDQKEKMLTFAEKVGWKLQK-D-DMVADFCSEIGIRRVLVKWMHNNKNT--SAKKE
	FbHB2	-KKRFR-TKFTQDQKDRMLAFSEALGWRIQKH-D-EAAVQFCNETGVKRHLVKWMHNNKHT--IGKKP
	FbHB3	-KKRFR-TKFTQDQKEKMHLEAERVGVWMQKK-D-EDLIIGFCNEIGVDKGVFKVWMHNNKMT-PGGKED
	FbHB4	-KKRFR-TKFTQDQKQKMHLEAERVGVWMQKK-D-EDLIIFCNEIGVDKGVFKVWMHNNKMT-SAGKED
ZF-HD	ATHB24	-KKRFR-TKPNBQKEKMMFAEKIGWRMTKL-E-DDEVNRFCREIKVKRQVFKVWMHNNKQ---AAKK
	ATHB25	-KKRFR-TKFTABQKERMALALAERIGWRIRQK-D-DEVIQRFQETGVPRQVLKVMHNNKHT--LGKSP
	ATHB26	-HK--R-TKFTABQKVMRGFAERAGWKINGW-D-EKVVREFCSEVGIKRVLVKVMHNNKYF--NNGRSR
	ATHB27	-VKRLK-TKFTABQTEKMRDYAEKLRWVRPE-R-QEEVEEFCVEIGVNRKNFRIWMHNNKDK----III
	ATHB28	-KKRFR-TKINEBQKEKMKFAERLWVRMQKK-D-BEEDKFCRMVNLRRQVFKVWMHNNKQ---AMKR
	OsHB1	-KKRFR-TKFTPBQKEQMLAFAERVGVWMQKK-D-EALVQFCQVGVRRQVFKVWMHNNKSS--IGSSS
HD-BEL1	ATH1	-RP-QR-G-LPEKSVSVLRNWMQNF-LHPYPKD-SEK-HLLAIRSGLTRSQVSNWFINARV--RLWKPM
PHD-Finger	PRHA	-GGRRRMERLPRNAVEKLQVFAET---ELPSK-AVR-DRLAKELSLDPEKVNKVPKENTRY--HALNR
	STM	-KKRFR-TKLPKEARQQLLDWVSRHY-KWPYPSE-QQR-LALAEStGLDQKQINNWFINQK--RHWKPS
HD-KN1	KN1	-KKRFR-TKLPKEARQQLLSWVQHY-KWPYPSE-TQR-VALAEStGLDLQKQINNWFINQK--RHWKPS
	KNAT3	-KKRFR-TKLPKEARQQLLSWVQSHS-KWPYPTE-EDK-ARLVQETGLQLKQINNWFINQK--RHWKPS
HD-ZIP	ATML1	-NKKRYHRHTTQRIQELESFFKEC---PHPDD-KQR-KELSLRELSLEPLQVFKVFPQNRRTQMKQHER
	GL2	-RKRKKYHRHTTQIRHMEALPKET---PHPDE-KQR-QQLSKQLGLAPQVFKVFPQNRRTQIKAIQER



도면3

GST	-	+	-	-	-	-	-
GmZF-HD1	-	-	+	+	+	+	+
프로브	-	-	-	-	-	-	-
COMP(A-2)	-	-	-	10X	50X	100X	200X



도면4

A

E1: CTCAA AGTAA TTAAA TAATA AATTA AATTT

E2: TAA TTAAA TAATA AATTA AATTT CT

E3: AGTAA TTAAA TAATA AATTA AATTT CTGGT

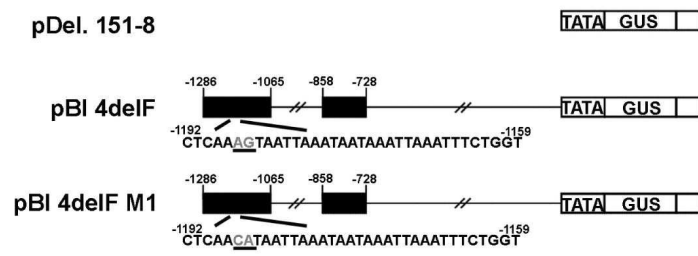
B

GST	-	+	-	-	-	-	-	-
GmZF-HD1	-	-	+	+	+	-	-	-
NE	-	-	-	-	-	-	+	+
프로브	E3	E3	E1	E2	E3	E3	E1	E2

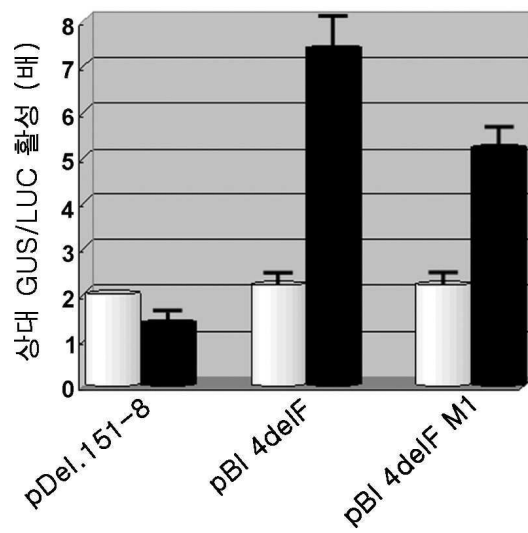


도면5

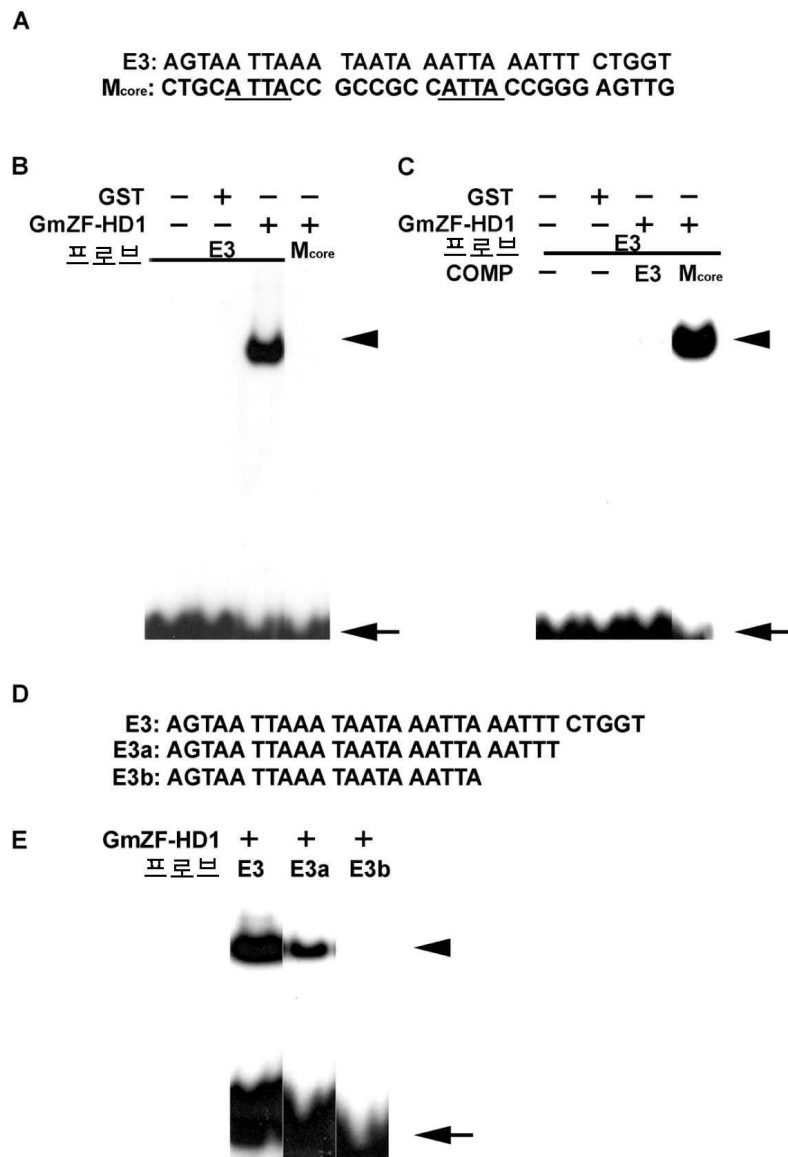
A



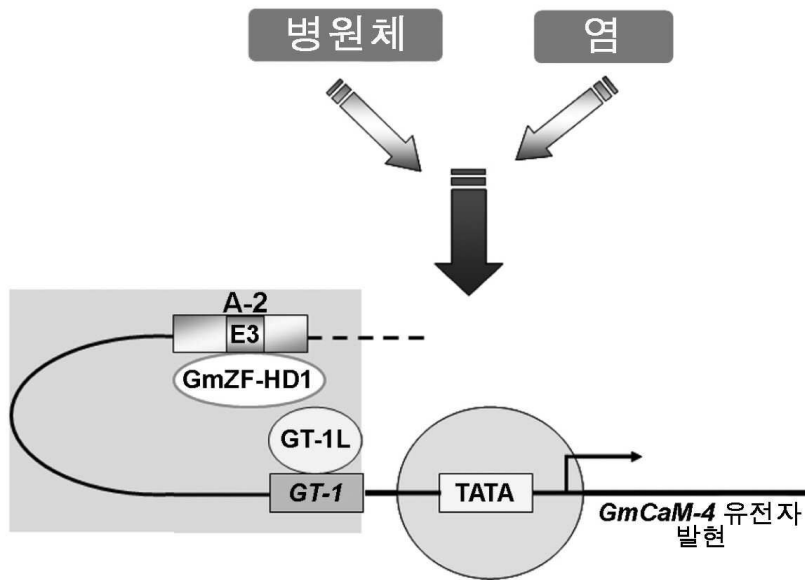
B



도면6



도면7



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Gene fragment for recognizing DNA binding protein in Glycine max
calmodulin isoform-4 promoter

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 131

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 1

gtacacctca caaggtcaag cttttataag gattttaact cttctaaatt aagaaggaat 60

aaaataaata atttcagacg ttaataagaa aaataacgat taatattttg atacattcat 120

aattcattat a 131

<210> 2

<211> 80

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 2

gaataacaca ctcactcaa agtaattaaa taataaatta aatttctggt atatttgat 60

tgacaatagg aattcacgtt 80