(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0003939
(43) 공개일자 2023년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
A01H 1/06 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2021-0085616
(22) 출원일자 2021년06월30일
심사청구일자 2021년06월30일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
정우식
경상남도 진주시 가좌안골길21번길 5, 102동 1305호(가좌동, 가좌제일풍경채)
김선호
경상남도 사천시 사천읍 구암두문로 254-9, 102동 1003호(원광 이안애 아파트)
(74) 대리인
최규환

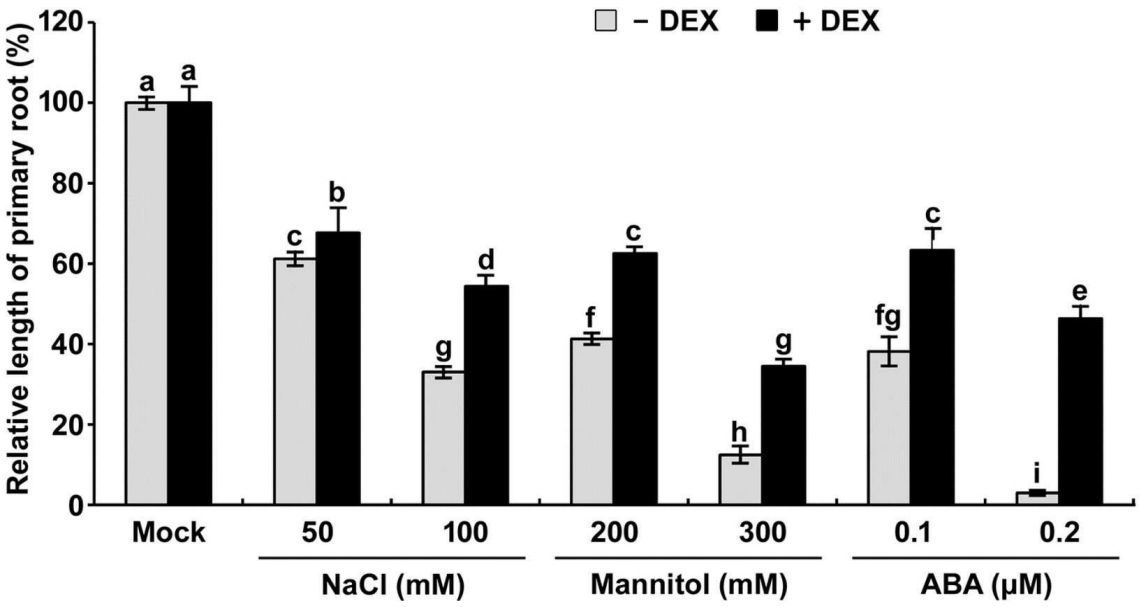
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **식물체의 환경 스트레스 내성을 증진시키는 IAA15 변이체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 식물체의 환경 스트레스 내성을 증진시키는 IAA15 변이체 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 IAA15 단백질 변이체는 환경 스트레스 조건에서 주뿌리 신장 증진 효과가 우수하므로, IAA15 단백질 변이체 코딩 유전자를 이용하면 환경 스트레스에 대해 내성을 갖는 식물체를 개발할 수 있어 농작물의 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A01H 1/1225 (2021.01)
A01H 5/10 (2022.05)
C12N 15/8273 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067690
과제번호	PJ015909012021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린연계농생명혁신기술개발
연구과제명	식물 호르몬 신호 통합 네트워크 구명을 통한 작물 내재해성 형질개선(1주관)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 IAA15(indole-3-acetic acid inducible 15) 단백질의 75번째 아미노산인 프롤린(proline, P)이 세린(serine, S)으로 치환된 IAA15 단백질 변이체.

청구항 2

제1항의 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제3항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 5

제3항의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 식물체의 환경 스트레스 내성을 증진시키는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 환경 스트레스는 염, 건조 또는 앱시스산에 의한 스트레스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제3항의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는 비형질전환 식물체 대비 환경 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 8

제7항의 제조 방법에 의해 제조된 환경 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체.

청구항 9

제8항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.

청구항 10

제2항의 유전자를 유효성분으로 포함하는 식물체의 환경 스트레스 내성 증진용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물체의 환경 스트레스 내성을 증진시키는 IAA15 변이체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물은 병균, 해충, 바이러스 등의 생물학적 스트레스뿐만 아니라 지구 환경의 악화에 따라 발생하는 고온, 염해, 건조, 공해, 상처, 냉해, 과다한 광조건, 오존, 과다한 UV 노출 및 삼투성 충격(osmotic shock)과 같은 각

종 환경 스트레스를 받게 된다. 그 중에서, 염 스트레스는 독성 Na^+ 이온의 축적, 삼투 또는 산화 스트레스의 원인이 되어 작물의 생산성 감소, 성장 저해를 유발한다. 또한, 세포 내 이온과 물 항상성(homeostasis)의 급격한 변화를 초래하여 심할 경우 식물이 죽게 된다. 수분 부족으로 인한 건조 스트레스 또한 작물의 생산성을 감소시키는 주된 요인이 된다. 식물은 이러한 염, 수분 또는 산화 스트레스에 대한 방어기작을 가지고 있어서 생육에 부적합한 환경에 처하게 되면 그들의 형태를 조절하거나 생리적 대사과정을 조절함으로써 환경에 적응하여 생존하고자 하는 경향이 있다.

[0003] 식물체 내 존재하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 광범위한 세포 손상 및 광합성 억제를 일으킬 수 있다. 일반적으로 이러한 손상을 방지하기 위해 활성산소는 자체 항산화제에 의해 제거되지만, 스트레스에 의해 이러한 항산화 작용이 손상되면 식물체 내 활성산소가 축적된다. 활성산소 이외에, 환경 스트레스에 대한 식물의 반응은 복잡한 스트레스 신호 전달 단계를 조절하는 식물 호르몬에 의해 매개된다. 특히, 식물 호르몬인 앱시스산(abscisic acid, ABA)은 가뭄과 염분에 대한 식물 세포 적응의 활성화에서 중요한 조절자로 작용한다고 보고된 바 있다(Danquah et al., 2014, Biotechnol Adv. 32(1):40-52).

[0004] 한편, 옥신(auxin)은 종자의 발아, 개화의 조절, 뿌리 및 줄기의 성장, 조직의 노화 등과 같은 식물의 전반적인 성장 및 발달에 관여하는 식물 생장 호르몬이다. 옥신 관련 신호전달경로는 주로 TIR1/AFB, Aux/IAA 및 ARF에 의해 조절되며 특히, 애기장대에서 IAA(indole-3-acetic acid inducible) 패밀리는 옥신에 의해 강하게 발현되는 최초의 유전자로 알려져 있다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1664943호에는 '식물의 환경 스트레스 내성을 조절하는 AtLRK10L1.2 유전자 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1664206호에는 '식물의 환경 스트레스 내성을 증가시키는 벼 유래의 OsWOX13 유전자 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 '식물체의 환경 스트레스 내성을 증진시키는 IAA15 변이체 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 애기장대 유래 IAA15(indole-3-acetic acid inducible 15) 단백질의 75번째 아미노산인 프롤린(proline, P)이 세린(serine, S)으로 치환된 IAA15 단백질 변이체를 제조하였고, 환경 스트레스 조건에서 상기 IAA15 단백질 변이체를 과발현하는 식물체의 주뿌리 길이가 대조군 식물체 대비 증가하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 IAA15(indole-3-acetic acid inducible 15) 단백질의 75번째 아미노산인 프롤린(proline, P)이 세린(serine, S)으로 치환된 IAA15 단백질 변이체를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 식물체의 환경 스트레스 내성을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는 비형질전환 식물체 대비 환경 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 의해 제조된 환경 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 식물체의 환경 스트레스 내성 증진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 IAA15 단백질 변이체는 환경 스트레스 조건에서 식물체의 주뿌리 신장 증진 효과가 우수하므로, IAA15 단백질 변이체 코딩 유전자를 이용하면 환경 스트레스에 대해 내성을 갖는 식물체를 개발할 수 있어 농작물의 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 정상 조건에서의 야생형 IAA15 과발현 식물체($IAA15^{WT}$ OX) 및 돌연변이 IAA15 과발현 식물체($IAA15^{P75S}$ OX)의 IAA15 발현을 qRT-PCR(A, B) 및 웨스턴 블랏(C, D) 분석으로 확인한 결과이다. DEX는 덱사메타손이고, MG132는 단백질 분해효소 억제제이며, CBS는 Coomassie blue staining이다.

도 2는 정상 조건에서의 $IAA15^{WT}$ OX 및 $IAA15^{P75S}$ OX의 뿌리 성장을 확인한 결과로, A 및 B는 14일령의 각 식물체의 사진이고, C는 주뿌리의 길이를 측정한 결과이며, D는 곁뿌리의 수를 측정한 결과이다.

도 3은 정상 조건에서의 $IAA15^{P75S}$ OX의 옥신 반응성 유전자(A) 및 LBD(lateral organ boundaries domain) 유전자(B)의 발현을 qRT-PCR로 분석한 결과이다. NAA; α-naphthaleneacetic acid.

도 4는 환경 스트레스 조건(염, 건조 또는 앱시스산)에서의 $IAA15^{P75S}$ OX의 주뿌리의 길이를 측정한 결과이다. MOCK은 아무 처리도 하지 않은 대조군이고, NaCl은 염 스트레스 상태를 유도하는 염화나트륨이고, mannitol은 건조 스트레스 상태를 유도하는 만니톨이며, ABA는 앱시스산(abscisic acid)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 IAA15(indole-3-acetic acid inducible 15) 단백질의 75번째 아미노산인 프롤린(proline, P)이 세린(serine, S)으로 치환된 IAA15 단백질 변이체를 제공한다.

[0018] 본 발명에 따른 IAA15 단백질 변이체는 형질전환된 식물체에서 과발현될 때, 환경 스트레스 조건에서 식물체의 주뿌리의 길이를 증가시킬 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한, 상기 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 명세서에서 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 '유전자'는 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 '폴리뉴클레오티드'와 상호교환하여 사용할 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자의 범위는, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 야생형 IAA 단백질의 서열에서, 75번째 아미노산인 프롤린(proline, P)이 세린(serine, S)으로 치환될 수 있도록, 프롤린의 코딩 염기가 세린의 코딩 염기(TCT, TCC, TCA 또는 TCG)로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명은 또한, 상기 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0023] 본 발명의 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0024] 본 발명의 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0025] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-DNA 영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0116718 B1 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0120516 B1 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스 (예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0026] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate), 포스피노트리신(phosphinothricin) 및 글루포시네이트(glufosinate)와 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 덱사메타손 유도성(dexamethasone-inducible) 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 상기 프로모터 외에 구성적(constitutive) 프로모터도 본 발명에 사용될 수 있다. "구성적 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 상기 구성적 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0028] 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0029] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0030] 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다.

[0031] 또한, 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0032] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 식물체의 환경 스트레스 내성을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0033] 본 발명의 식물체의 환경 스트레스 내성을 증진시키는 방법에 있어서, 상기 환경 스트레스는 염, 건조 또는 앱시스산에 의한 스트레스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물체의 환경 스트레스 내성을 증진시키는 방법에 있어서, 상기 스트레스 내성은 스트레스 조건에서 IAA15 단백질 변이체 코딩 유전자가 과발현되면 주뿌리의 길이를 증가시킴으로써 생육 발달이 유도되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물체의 환경 스트레스 내성을 증진시키는 방법에 있어서, 상기 IAA15 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 IAA15(indole-3-acetic acid inducible 15) 단백질의 75번째 아미노산인 프롤린(proline, P)이 세린(serine, S)으로 치환된 것일 수 있다.

[0036] 상기 "유전자 과발현"이란, 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 상기 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미

한다. 식물체 내로 상기 유전자를 도입하는 방법으로는 프로모터의 조절을 받는 상기 유전자가 포함된 발현 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 방법이 있다. 상기에서 프로모터로는 식물체 내에 삽입 유전자를 과발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다.

[0037] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Negrutiu et al., 1987, Plant Mol. Biol. 8:363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito et al., 1985, Bio/Technol. 3:1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway et al.,1986, Mol. Gen. Genet. 202:179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein et al.,1987, Nature 327:70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0301316 B1) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EPA 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 바이너리 벡터 기술을 이용하는 것이다.

[0038] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물세포"는 어떤 식물세포도 된다. 식물세포는 배양세포, 배양조직, 배양기관 또는 전체 식물이다. "식물조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물조직은 인 플란타(*in planta*)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

[0039] 본 발명은 또한,

[0040] 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계; 및

[0041] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는 비형질전환 식물체 대비 환경 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0042] 본 발명의 일 구현 예에 따른 환경 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조 방법에 있어서, 상기 IAA15 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 IAA15(indole-3-acetic acid inducible 15) 단백질의 75번째 아미노산인 프롤린(proline, P)이 세린(serine, S)으로 치환된 것일 수 있고, 식물의 형질전환 방법 및 식물의 형질전환에 이용되는 식물 세포는 전술한 것과 같다.

[0043] 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0044] 본 발명은 또한, 상기 제조 방법에 의해 제조된 환경 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0045] 본 발명의 형질전환 식물체는 환경 스트레스 조건에서 주뿌리의 길이가 대조구 대비 10 내지 40% 증가되는 것일 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명에 따른 형질전환 식물체로는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물이 될 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물이다. 쌍자엽 식물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갓무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두가 있다.

[0047] 본 발명은 또한, IAA15 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 식물체의 환경 스트레스 내성 증진용 조성물을 제공한다.

[0048] 본 발명의 식물체의 환경 스트레스 내성 증진용 조성물은 유효성분으로서, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 IAA15(indole-3-acetic acid inducible 15) 단백질의 75번째 아미노산인 프롤린(proline, P)이 세린(serine, S)으로 치환된 IAA15 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 환경 스트레스 내성을 증진시킬 수 있는 것이다.

[0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명은 예시하는 것일 뿐, 본 발명의

내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] **재료 및 방법**

[0051] **1. 식물체 및 재배조건**

[0052] 애기장대(*Arabidopsis thaliana*, Columbia-0 생태형)의 종자를 70%(v/v) 에탄올에 1분 동안 담그고, 1/10로 희석한 일반 락스(0.4% 차아염소산소다)에 10분 동안 담가 표면 살균한 후, 멸균수로 3번 세척하였다. 표면 살균된 종자를 2%(w/v) 수크로스와 0.8%(w/v) 아가가 포함된 1/2 MS(Murashige and Skoog) 고체 배지에 심고 4℃, 3일 동안 암조건으로 배양한 후, 22℃ 성장 챔버에서 16시간 명/8시간 암주기로 배양하였다. 10~12일령 유묘를 토양으로 옮겨 심고, 상기와 동일한 조건으로 배양하였다. 이후, 14일령 유묘에서 IAA15 발현 및 뿌리 성장 분석을 위하여 50 μM 덱사메타손(dexamethasone)이 포함된 MS 배지에서 24시간 동안 배양하였고, 옥신 반응성 유전자 및 LBD(lateral organ boundaries domain) 유전자 발현 분석을 위하여 10 μM NAA(α-naphthaleneacetic acid) 및 50 μM 덱사메타손이 포함된 MS 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 또한, 스트레스 조건에서의 뿌리 성장 분석을 위하여 50 μM 덱사메타손이 포함된 MS 배지에 염화나트륨(50 또는 100 mM), 만니톨(200 또는 300 mM) 또는 앱시스산(0.1 또는 0.2 μM)을 첨가하고 14일 동안 발아를 유도하며 배양하였다.

[0053] **2. IAA15 돌연변이 식물체 제조**

[0054] IAA15(indole-3-acetic acid inducible 15) 돌연변이 식물체를 제조하기 위하여 애기장대 유묘의 cDNA로부터 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 IAA15 유전자를 증폭하여 T-blunt 벡터(Solgent, Korea)에 클로닝하였다. IAA15 도메인 Ⅱ의 75번째 아미노산인 프롤린(proline, P)이 세린(serine, S)으로 치환되는 특정 부위 돌연변이를 유도하기 위하여 하기 표 1의 프라이머 및 QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit(Stratagene, USA)를 이용하였다. IAA15의 변이가 유도되지 않은 $IAA15^{WT}$과 IAA15의 돌연변이가 유도된 $IAA15^{P75S}$를 3XFLAG가 포함된 pBlueScript Ⅱ KS(+) 벡터의 *BamH*Ⅰ 및 *Spe*Ⅰ 부위 사이에 삽입하여 3XFLAG-$IAA15^{WT}$ 및 3XFLAG-$IAA15^{P75S}$를 제조하였고, 이를 덱사메타손(dexamethasone) 유도성 35S 프로모터를 포함하는 pTA7002 바이너리 벡터(Aoyama and Chua, 1997, Plant J. 11(3):605-612)에 클로닝하였다.

표 1

[0055] 프라이머 정보

용도		프라이머 서열(5'-3')	서열번호
돌연변이 식물체 제조용	IAA15 증폭	F: GGATCCATGTCACCGGAGGAATACGT	3
		R: ACTAGTTCACTTACATATTGTTATTA	4
	$IAA15^{P75S}$ 유도	F: GTGGGCTGGTCGCCGGTAGCGACAGCGAGG	5
		R: CGCTACCGGCGACCAGCCCACCAACTGGTC	6
qRT-PCR 분석용	IAA5	F: AAGAGTCAAGTTGTGGGTTGGC	7
		R: AATGCAGCTCCATCTACACTCACT	8
	IAA14	F: GAATTCATGAACCTTAAGGAGACGGA	9
		R: CCCGGGTGATCTGTTCTTGAACTTCT	10
	GH3.3	F: ATGGAGGAGTCGTTGAACTCTGTG	11
		R: AAGCTCCATTATTGGCGTGAAACTC	12
	SAUR10	F: CGAAGTCGGTACATCGTTCCTATC	13
		R: CATGGAGATAAGAGACCTGAAGAAGA	14
	LBD16	F: GAGAGACTCATCATCAAACC	15
		R: CTAAGAGCCAAAGCCTGAAG	16
	LBD29	F: AAGTTCTGGGACGGTTCAAC	17
		R: GCTGATTGAAGCTCTTTGAG	18
	LBD33	F: ACCAATTTCGTCGACGAGAG	19
		R: TCCATGTTCTGGAGCCATTG	20
	Tubulin	F: CCAACAACGTGAAATCGACAG	21
		R: TCTTGGTATTGCTGGTACTCT	22

[0056] 상기 재조합 벡터를 아그로박테리움 GV3101(pMP90)을 이용한 방법(Clough 등. 1998, Plant J. 16:735-743)으로 야생형 애기장대로 형질전환하고 선별하였으며, 3세대 식물체를 이후 실험에 이용하였다.

[0057] **3. qRT-PCR**

[0058] 14일령 애기장대 식물체로부터 RNA purification kit(Macherey-Nagel, Germany)를 이용하여 총 RNA를 추출하고 SuperScript II RNase-Reverse Transcriptase(Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후, 상기 표 1의 프라이머를 이용하여 CFX384 Real-Time System(Bio-Rad, USA)으로 PCR 분석을 수행하였다: 94℃에서 5분, 94℃에서 30초(45 사이클), 72℃에서 40초, 55℃에서 사이클당 0.5℃씩 증가(90 사이클), 72℃에서 10분.

[0059] **4. 웨스턴 블랏**

[0060] 식물체를 액체질소에 담가 조직을 분쇄하고 단백질 추출 버퍼(50 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4, 25 mM NaF, 50 mM-glycerophosphate, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 5% glycerol, 1% Triton X-100 및 단백질 분해효소 억제제)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 이후, 12,000g에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 Bio-Rad Protein Assay kit(Bio-Rad)로 정량한 후, 50 ㎍의 단백질로 웨스턴 블랏을 수행하였다. 1차 항체로는 anti-Flag 항체(1:5,000, Sigma, USA)를 이용하였고, 2차 항체로는 HRP-anti-mouse 항체(1:5,000, Sigma, USA)를 이용하였다.

[0061] **실시예 1. 정상 조건에서의 IAA15 발현 분석**

[0062] 덱사메타손 유도성 프로모터에 의해 발현이 조절되는 야생형 IAA15 과발현 식물체($IAA15^{WT}$ OX) 및 돌연변이 IAA15 과발현 식물체($IAA15^{P75S}$ OX)의 IAA15 발현을 전사체 및 단백질 수준에서 분석하였다.

[0063] $IAA15^{WT}$ OX 및 $IAA15^{P75S}$ OX에서 분리한 총 RNA를 이용하여 IAA15에 대한 qRT-PCR 분석을 수행한 결과, 덱사메타손을 처리하였을 때의 $IAA15^{WT}$ OX 및 $IAA15^{P75S}$ OX의 IAA15 전사체 발현양이 덱사메타손을 처리하지 않았을 때보다 유의성있게 증가하는 것을 확인하였다(도 1A, B).

[0064] $IAA15^{WT}$ OX에서 분리한 단백질을 이용하여 IAA15에 대한 웨스턴 블랏을 수행한 결과, $IAA15^{WT}$ OX는 MG132(단백질 분해효소 억제제)를 처리하지 않았을 때는 IAA15 단백질이 검출되지 않지만, MG132를 처리했을 때는 IAA15 단백질이 검출되었으며, 덱사메타손 처리에 의해 발현이 유도된 IAA15 단백질이 단백질 분해효소에 의해 분해되는 것을 알 수 있었다(도 1C). 반면, $IAA15^{P75S}$ OX에서 분리한 단백질을 이용하여 IAA15에 대한 웨스턴 블랏을 수행한 결과, $IAA15^{P75S}$ OX는 덱사메타손 처리에 의해 IAA15 단백질이 발현이 유도되며, MG132 처리 유무에 상관없이 IAA15 단백질이 식물체 내 존재하는 것을 확인하였다(도 1D).

[0065] 상기 결과를 바탕으로, 정상 조건에서 $IAA15^{WT}$ OX 식물체에 비해 $IAA15^{P75S}$ OX 식물체에서 IAA15 단백질이 안정화되어 축적됨을 알 수 있었다.

[0066] **실시예 2. 정상 조건에서의 $IAA15^{WT}$ OX 및 $IAA15^{P75S}$ OX의 뿌리 성장 분석**

[0067] 야생형(WT), $IAA15^{WT}$ OX 및 $IAA15^{P75S}$ OX에 덱사메타손을 각각 처리한 후, 뿌리 성장을 관찰한 결과, 덱사메타손을 처리하지 않았을 때는 야생형(WT), $IAA15^{WT}$ OX 및 $IAA15^{P75S}$ OX의 주뿌리 길이 및 곁뿌리 수에 차이가 없는 것을 확인하였다. 그러나, 덱사메타손을 처리하였을 때는 $IAA15^{P75S}$ OX의 주뿌리 길이 및 곁뿌리 수는 야생형(WT) 또는 $IAA15^{WT}$ OX보다 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 특히, 덱사메타손을 처리한 경우, $IAA15^{P75S}$ OX의 주뿌리 길이 및 곁뿌리 수는 야생형(WT) 대비 각각 40% 및 90% 감소한 것을 확인하였다(도 2).

[0068] 상기 결과를 바탕으로, 정상 조건에서 $IAA15^{P75S}$ OX 식물체는 덱사메타손 처리에 의해 주뿌리 및 곁뿌리 발달이 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0069] **실시예 3. 정상 조건에서의 옥신 반응성 유전자 및 *LBD* 유전자 발현 분석**

[0070] $IAA15^{P75S}$ OX에서 분리한 총 RNA를 이용하여 옥신 반응성 유전자(*IAA5*, *IAA14*, *GH3.3* 및 *SAUR10*) 및 곁뿌리 발달에 관여하는 *LBD* 유전자(*LBD16*, *LBD29* 및 *LBD33*)에 대한 qRT-PCR 분석을 수행하였다.

[0071] 그 결과, 합성 옥신인 NAA를 처리하지 않았을 때는 덱사메타손 처리 유무에 상관없이 옥신 반응성 유전자 및 *LBD* 유전자의 발현양에 변화가 거의 없는 반면, NAA를 처리하였을 때는 덱사메타손 처리에 의해 옥신 반응성 유

전자 및 *LBD* 유전자의 발현이 현저하게 감소한 것을 확인하였다(도 3).

[0072] 상기 결과를 바탕으로, 정상 조건에서 IAA15^{P75S} OX 식물체는 덱사메타손 처리에 의해 옥신 반응성 유전자 및 *LBD* 유전자의 발현이 저해되는 것을 알 수 있었다.

[0073] **실시예 4. 환경 스트레스 조건에서의 뿌리 성장 분석**

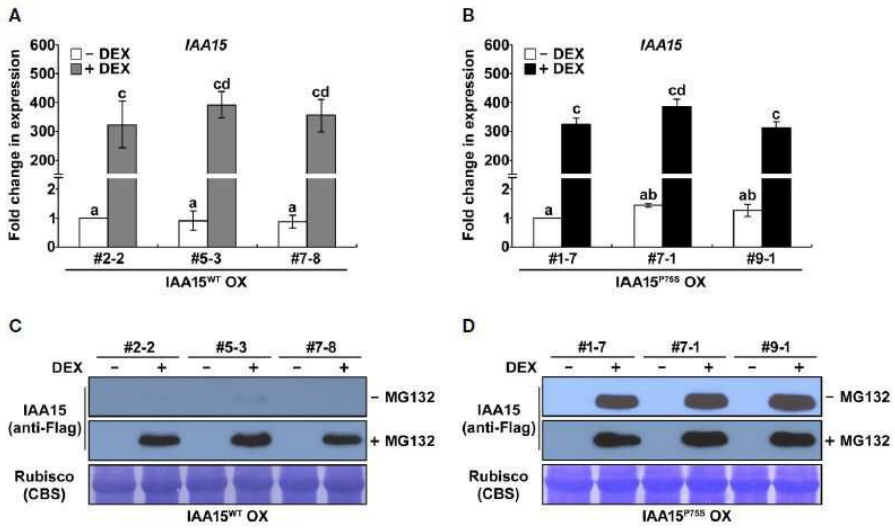
[0074] IAA15^{P75S} OX에 염화나트륨, 만니톨 또는 앱시스산을 처리하여 다양한 환경 스트레스를 유도한 후, 주뿌리 길이를 각각 측정하였다.

[0075] 그 결과, 스트레스를 유도하지 않은 IAA15^{P75S} OX(MOCK) 조건에서는 덱사메타손 처리 유무에 상관없이 주뿌리 길이의 변화가 없었으나, 각 스트레스 조건에서 덱사메타손을 처리하지 않은 IAA15^{P75S} OX보다 덱사메타손을 처리한 IAA15^{P75S} OX의 주뿌리 길이가 유의적으로 증가한 것을 확인하였다(도 4).

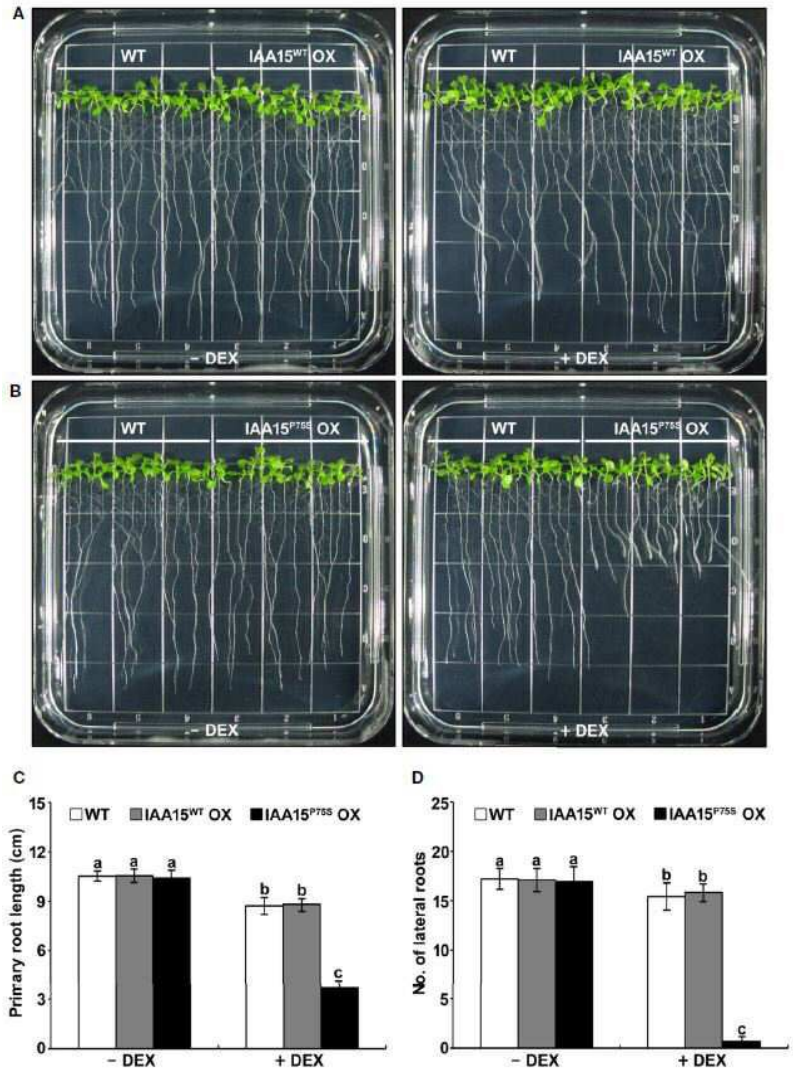
[0076] 상기 결과를 바탕으로, 환경 스트레스 조건에서 IAA15^{P75S} OX 식물체는 덱사메타손 처리에 의해 주뿌리 길이를 증가시킴으로써, 생육 발달이 유도되어 환경 스트레스 내성을 가질 수 있음을 알 수 있었다.

도면

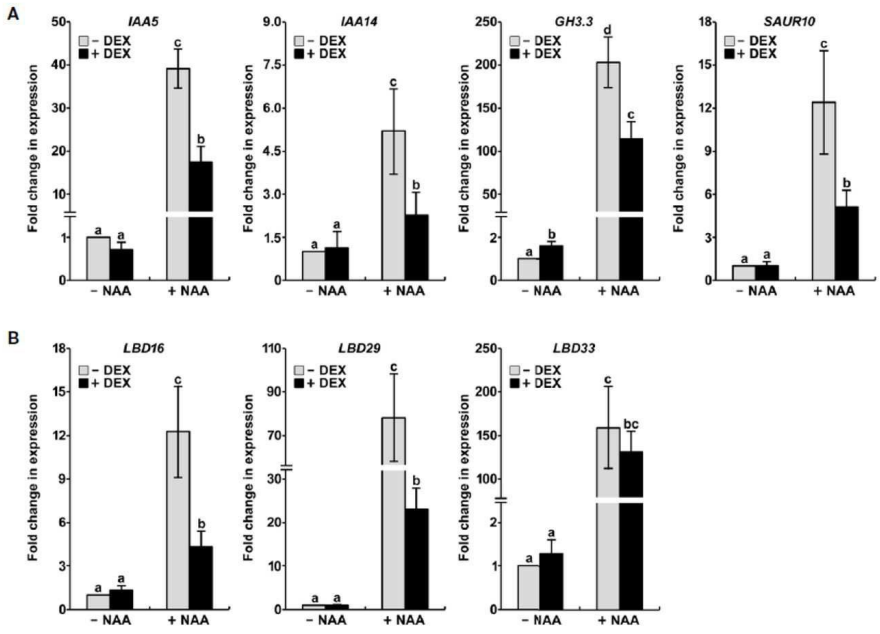
도면1



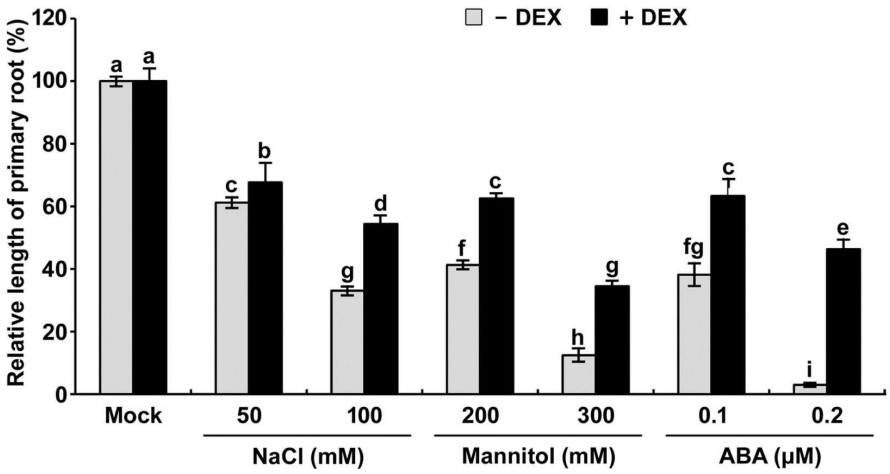
도면2


A
WT
IAA15WT OX
- DEX
+ DEX
B
WT
IAA15P75S OX
- DEX
+ DEX
C
WT
IAA15WT OX
IAA15P75S OX
Prirrary root length (cm)
- DEX
+ DEX
D
WT
IAA15WT OX
IAA15P75S OX
No. of lateral roots
- DEX
+ DEX

도면3


A
IAA5
IAA14
GH3.3
SAUR10
- DEX
+ DEX
Fold change in expression
- NAA
+ NAA
B
LBD16
LBD29
LBD33
- DEX
+ DEX
Fold change in expression
- NAA
+ NAA

도면4



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> IAA15 mutant for increasing environmental stress tolerance of plant and uses thereof

<130> PN21155

<160> 22

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 179

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Ser Pro Glu Glu Tyr Val Arg Val Trp Pro Asp Ser Gly Asp Leu
1 5 10 15

Gly Gly Thr Glu Leu Thr Leu Ala Leu Pro Gly Thr Pro Thr Asn Ala
20 25 30

Ser Glu Gly Pro Lys Lys Phe Gly Asn Lys Arg Arg Phe Leu Glu Thr
35 40 45

Val Asp Leu Lys Leu Gly Glu Ala His Glu Asn Asn Tyr Ile Ser Ser
50 55 60

Met Val Thr Asn Asp Gln Leu Val Gly Trp Pro Pro Val Ala Thr Ala
65 70 75 80

Arg Lys Thr Val Arg Arg Lys Tyr Val Lys Val Ala Leu Asp Gly Ala
85 90 95

Ala Tyr Leu Arg Lys Val Asp Leu Gly Met Tyr Asp Cys Tyr Gly Gln
100 105 110
Leu Phe Thr Ala Leu Glu Asn Met Phe Gln Gly Ile Ile Thr Ile Cys
115 120 125
Arg Val Thr Glu Leu Glu Arg Lys Gly Glu Phe Val Ala Thr Tyr Glu
130 135 140
Asp Lys Asp Gly Asp Leu Met Leu Val Gly Asp Val Pro Trp Met Met
145 150 155 160
Phe Val Glu Ser Cys Lys Arg Met Arg Leu Met Lys Thr Gly Asp Ala

165 170 175
Ile Gly Leu

<210> 2
<211> 540
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 2
atgtcaccgg aggaatacgt tagggtttgg ccggattccg gtgatcttgg aggaactgag 60
ctgaccctag ctttgcctgg cactccgaca aatgcatcgg aaggtccaaa aaagttcggg 120
aacaaacgta gattcctcga gaccgttgat ttaaaactcg gggaagcaca cgagaacaat 180
tatatctcaa gcatggtcac taatgaccag ttggtgggct ggccgccggt agcgacagcg 240
aggaaaacag tgaggcggaa atacgtgaaa gtggcgttgg atggtgcggc ctatctcaga 300

aaggttgatc ttgggatgta cgattgctat ggacagcttt tcaccgctct agaaaacatg 360
tttcagggga taataacaat atgtagagtg acagagttgg agaggaaggg agagtttgtt 420
gctacttacg aggataagga cggtgacttg atgttagtcg gagatgtgcc gtggatgatg 480
tttgtggaat cttgcaaacg tatgaggtta atgaaaaccg gagatgctat tggattatag 540
540

<210> 3
<211> 26
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ggatccatgt caccggagga atacgt 26

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

actagttcac ttacatattg ttatta 26

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

gtgggctggt cgccggtagc gacagcgagg 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

cgctaccggc gaccagccca ccaactggtc 30

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

aagagtcaag ttgtgggttg gc 22

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

aatgcagctc catctacact cact 24

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gaattcatga accttaagga gacgga 26

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

cccgggtgat ctgttcttga acttct 26

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

atggaggagt cgttgaactc tgtg 24

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

aagctccatt attggcgtga aactc 25

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

cgaagtcggt acatcgttcc tatc 24

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

catggagata agagacctga agaaga 26

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

gagagactca tcatcaaacc 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

ctaagagcca aagcctgaag 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

aagttctggg acggttcaac 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

gctgattgaa gctctttgag 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

accaatttcg tcgacgagag 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

tccatgttct ggagccattg 20

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

ccaacaacgt gaaatcgaca g 21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

tcttggtatt gctggtactc t 21