

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0052649 (43) 공개일자 2014년05월07일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)		(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(21) 출원번호 10-2012-0119014		(72) 발명자 김성룡 경기 고양시 일산동구 일산로 205, 212동 1003호 (마두동, 백마마을2단지아파트)
(22) 출원일자 2012년10월25일 심사청구일자 2012년10월25일		(74) 대리인 양부현

전체 청구항 수 : 총 10 항

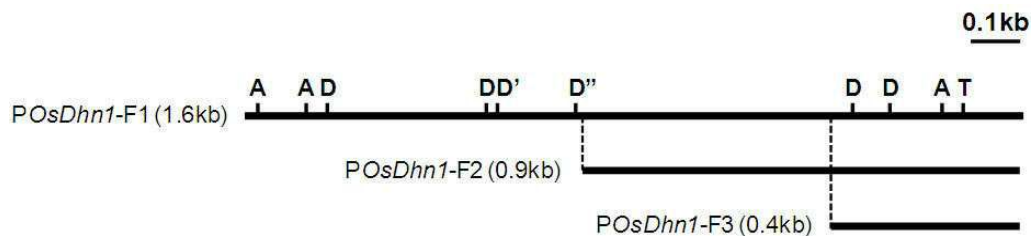
(54) 발명의 명칭 건조 스트레스-유도 프로모터 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 식물 유전자의 건조 스트레스 특이적 발현용 프로모터, 이를 포함하는 식물의 건조 스트레스 내성 유전자 발현용 재조합 벡터 및 이에 의해 형질전환되어 건조 스트레스 내성이 증진된 식물세포 및 식물체에 관한 것이다.

본 발명은 건조 상황 하에서 목적 유전자의 발현을 강하게 유도하는 *OsDhn1* 프로모터 및 이의 일부 절편을 이용함으로써, 식물체 내에서 건조 저항성 유전자가 수분이 부족한 상황 하에서만 발현되도록 하는 건조상황 특이적 유전자 발현 시스템에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008197
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대 바이오그린
연구과제명	환경 스트레스 내성 증진 벼 형질전환체 개발
기 여 율	1/1
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열, 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물 유전자의 건조 스트레스 특이적 발현용 프로모터.

청구항 2

(a) 식물의 건조 스트레스 내성 유전자; (b) 상기 유전자에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있는 제 1 항의 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물의 건조 스트레스 내성 유전자 발현용 재조합 벡터.

청구항 3

제 2 항의 재조합 벡터를 포함하는 식물의 건조 스트레스 내성 증진용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 조성물은 (a) *CBF1*, *OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C*, *OsDREB1D*, *OsDREB1E* 및 *OsDREB2A* 로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자; (b) 상기 유전자에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있고 식물 세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터있는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물 발현용 재조합 벡터를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 유전자는 *CBF1*, *OsDREB1A* 및 *OsDREB1D*로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 2 항의 재조합 벡터로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물세포.

청구항 7

제 2 항의 재조합 벡터로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물체.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드 그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 것을

특징으로 하는 식물체.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 건조 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법:

- (a) 제 2 항의 재조합 벡터를 식물 세포에 도입시키는 단계; 및
- (b) 상기 식물세포로부터 건조 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드 그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 건조 스트레스 하에서 활성이 증가하는 프로모터 및 이를 이용한 건조 스트레스 특이적 식물 유전자 발현조절 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 냉해, 건조 및 고염과 같은 환경적 스트레스는 작물의 생장 및 수확에 악영향을 미친다. 이들 스트레스는 또한 많은 식물에서 다양한 유전자의 발현을 유도하며(Ingram and Bartels, 1996; Thomashow, 1999; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000), 이들 유전자는 스트레스 내성, 다른 유전자들의 발현 조절 및 스트레스 신호 전달에 있어서 중요한 역할을 한다(Xiong et al., 2002; Shinozaki et al., 2003). 이들 유전자 가운데, 디하이드린(dehydrin) 유전자는 LEA 단백질의 D-11 패밀리를 인코딩하며 비생물학적 스트레스에 강하게 반응한다(Dure, 1993; Close, 1996). 디하이드린은 애기장대, 밀, 벼 등과 같은 많은 식물에서 동정되었으며(reviewed by Close, 1997), 단백질, 효소활성, 핵산 및 막 구조를 보호하는 분자 샤페론(chaperon)으로 알려졌다(Bray, 1993; Close, 1996; Koag et al., 2003 Peng et al., 2008; Hara et al., 2009). 따라서, 디하이드린 유전자의 형질도입은 식물 스트레스 내성을 부여하기 위한 접근으로서 시도되어 오고 있다. 예를 들어, 시트러스 디하이드린(citrus dehydrin) 유전자 *CuCOR19*를 과발현하는 형질전환 담배 및 *erd10*, *lti30*, *RcDhn5* 및 *Dhn5*과 같은 디하이드린 유전자를 과발현하는 애기장대가 제작되어 이들의 스트레스 내성이 측정되었다(Hara et al., 2003; Puhakainen et al., 2004 Brini et al., 2007; Peng et al., 2008). 벼에서는 *HVA1*, *PMA80*, *PMA1959* 및 *OsLEA3-1*와 같은 LEA 단백질을 과발현하는 형질전환 벼가 건조 및 염 스트레스에 대한 증가된 내성을 가짐이 보고되었다(Xu et al., 1996; Rohila et al., 2002; Cheng et al., 2002; Xiao et al., 2007).

[0003] 디하이드린은 몇몇 RAB(responsive to abscisic acid) 및 RAB16, COR47 및 WCOR410과 같은 COR(cold-regulated) 단백질을 포함한다(Kusano et al., 1992; Danyluk et al., 1994; Welin et al., 1995; Nylander et al., 2001). 스트레스 상황 하에서 대부분의 RAB 및 COR 유전자의 발현은 *cis*- 및 *trans*-작동 요소에 의해 조절된다. CRT/DRE(C-repeat/dehydration-responsive element), LTRE(low temperature-responsive element), ABRE(ABA-responsive element)가 많은 스트레스 반응성 유전자의 유도에 대한 *cis*-작용 요소로 잘

알려져 있다(Baker et al., 1994; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994; Jiang et al., 1996 Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005). *trans*-작동 요소 중에서, CBF/DREB(CRT/DRE binding factor)가 많은 식물 종에서의 중요한 스트레스 반응성 전사인자로서 잘 알려져 있다. 이들 인자는 스트레스 반응성 유전자의 프로모터의 DRE 서열에 특이적으로 결합하여 유전자의 발현을 활성화 시킨다(Stockinger et al., 1997; Liu et al., 1998; Sakuma et al., 2002; Dubouzet et al., 2003; Qin et al., 2004).

[0004] 벼는 가장 중요한 주요 식용작물임에도 불구하고 스트레스에 대한 민감성으로 인해 생산성이 낮다. 따라서, 식물에서 스트레스에 반응하는 기작을 이해하는 것은 스트레스 내성을 강화하는 데 있어 매우 중요하다. 벼의 스트레스 반응성 유전자 중에서, *OsDhn1*는 애기장대의 COR47/RD17, ERD10 및 밀의 WCOR410와 상동성이 높은 건조-유도 디하이드린을 인코딩하는 것으로 보고되었다(Lee et al., 2005). 본 발명자들은 *OsDhn1*를 조절하는 스트레스 반응 기작을 이해하기 위하여, 트랜스 활성화 어세이 및 형질전환 식물을 이용하여 *OsDhn1* 프로모터의 특성을 조사하였다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 비생물학적 스트레스 하에서 특이적으로 유전자의 발현을 유도하는 발현조절 서열을 발굴함으로써, 스트레스 하에서 이에 대한 내성과 관련된 유전자의 발현을 증가시켜 궁극적으로 식물체에 스트레스 내성을 부여하는 유전자 발현조절 시스템을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 *OsDhn1* 프로모터 및 이의 특정 절편(fragment)이 건조 스트레스 하에서 목적 유전자의 발현을 강하게 유도함을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 식물 유전자의 건조 스트레스 특이적 발현용 프로모터를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 식물의 건조 스트레스 내성 유전자 발현용 재조합 벡터 및 이를 포함하는 식물의 건조 스트레스 내성 증진용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물세포 및 식물체를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 건조 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열, 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물 유전자의 건조 스트레스 특이적 발현용 프로모터를 제공한다.

[0013] 본 발명자들은 비생물학적 스트레스 하에서 특이적으로 유전자의 발현을 유도하는 발현조절 서열을 발굴함으로써, 스트레스 하에서 이에 대한 내성과 관련된 유전자의 발현을 증가시켜 궁극적으로 식물체에 스트레스 내성을 부여하는 유전자 발현조절 시스템을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 *OsDhn1* 프로모터 및 이의 특정 절편(fragment)이 건조 스트레스 하에서 목적 유전자의 발현을 강하게 유도함을 발견하였다.

[0014] 본 발명에 따르면, 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열은 1.6 kb의 *OsDhn1* 프로모터의 뉴클레오타이드 서열(-1493bp ~ +87bp; *POsDhn1*-F1)을 나타내며, 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열은 *OsDhn1* 프로모터의

일부 절편(-316bp ~ +87bp; *POsDhn1*-F3)의 뉴클레오타이드 서열이다.

- [0015] 본 발명자들은 벼의 디하이드린 유전자인 *OsDhn1*의 프로모터가 가뭄 유도성 프로모터로 사용될 수 있음을 확인하고, 트랜스 활성화 분석을 통해 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열 및 이의 일부 절편인 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프로모터가 건조 스트레스가 가해진 상황에서 목적 유전자의 발현을 비약적으로 상승시킨다는 사실을 발견하였다. 따라서, 본 발명의 프로모터는 건조 스트레스가 가해지는 상황에서만 목적 유전자를 발현하는 스트레스 특이적 발현조절 시스템에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 식물의 건조 스트레스 내성 유전자; (b) 상기 유전자에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있는 본 발명의 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물의 건조 스트레스 내성 유전자 발현용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0017] 본 명세서에서 용어 “식물의 건조 스트레스 내성 유전자”는 건조 상황 하에서 식물의 수분 손실을 최소화함으로써 당해 유전자로 형질전환되지 않은 대조군에 비하여 형질전환된 식물이 유의적으로 높은 생존율을 보이게끔 하는 유전자를 의미한다. 건조 스트레스 내성 유전자는 본원 발명자들이 발굴한 *OsDhn1* 유전자를 비롯하여 이제까지 당업계에 건조 스트레스 하에서 식물체의 생존율을 증가시키는 것으로 알려진 여하한 유전자라도 포함된다.
- [0018] 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합”은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.
- [0019] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열은 아그로박테리움 투메파시엔스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것 (NOS 3' end) (Bevan et al. *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385(1983)), 아그로박테리움 투메페이선스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분, CaMV 35S 터미네이터 및 OCS 터미네이터(octopine synthase terminator)서열을 포함한다.
- [0021] 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자(예: 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반할 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제 (예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자 (예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*npt II*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*hpt*), 등)를 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물발현용 재조합벡터는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 바이너리 벡터이다.
- [0023] 본 명세서에서 용어 “바이너리 벡터”는 Ti(tumor inducible) 플라스미드에서 이동에 필요한 부분인 LB(left border)와 RB(right border)를 가지는 플라스미드와 타겟 뉴클레오타이드를 옮기는데 필요한 유전자를 가진 플라스미드를 두 개로 나누어 놓은 벡터를 말한다. 본 발명의 형질전환용 아그로박테리움은 본 발명의 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적합한 것이라면 어느 것이라도 좋고, 특히 본 발명에서 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404이 바람직하다.
- [0024] 본 발명의 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 방법은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있으며, 예를 들면 입자 충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation), 형질감염법(transfection), 리튬아세테이트법(lithium acetate method) 및 열충격법(heat shock) 등이 있다. 바람직하게는 전기천공법을 사용한다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 재조합 벡터를 포함하는 식물의 건조 스트레스 내성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열 및 이들을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

- [0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) *CBF1*(진뱅크 접근번호 AY327040.1), *OsDREB1A*(진뱅크 접근번호 JN561151.1), *OsDREB1B*(진뱅크 접근번호 AAX28958.1), *OsDREB1C*(진뱅크 접근번호 JN806136.1), *OsDREB1D*(진뱅크 접근번호 AY785895.1), *OsDREB1E*(진뱅크 접근번호 AY785896.1) 및 *OsDREB2A*(진뱅크 접근번호 JQ341059.1)로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자; (b) 상기 유전자에 작동적으로 결합(operatively linked)되어 있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터있는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물 발현용 재조합 벡터를 추가적으로 포함한다.
- [0028] 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 본원발명의 프로모터 또는 그의 일부 절편이 다양한 CBF/DREB-유사체와 반응하는 *cis*-작동 요소를 가짐을 발견하였고, 이러한 유전자들을 포함하는 발현 시스템과 본원발명의 재조합 벡터를 대상 식물체의 세포에 공-형질전환(co-transfection)할 경우 목적 유전자를 보다 효율적으로 유도할 수 있음을 실험적으로 입증하였다.
- [0029] 보다 바람직하게는, 본 발명에서 추가적으로 포함되는 식물 발현용 재조합 벡터에 포함되는 유전자는 *CBF1*, *OsDREB1A* 및 *OsDREB1D*로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0030] 본 발명에서 추가적으로 포함되는 재조합 벡터에 적합한 프로모터는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, SP6 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, PM 프로모터, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 콜리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 신타아제 (nos) 프로모터, 피그워트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤멜리나 엘로우 모틀 바이러스 프로모터, 리볼로오스-1,5-비스-포스페이트 카복실라아제 스몰 서브유닛 (ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토솔 트리오포스페이트 이소머라아제 (TPI) 프로모터, 아라비도시스 (Arabidopsis)의 아테닌 포스포리보실트랜스퍼라아제 (APRT) 프로모터 및 옥토파인 신타아제 프로모터를 포함한다.
- [0031] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 *CBF1*, *OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C*, *OsDREB1D*, *OsDREB1E* 및 *OsDREB2A*의 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.
- [0032] 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈 (예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.
- [0033] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물세포를 제공한다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물체를 제공한다.
- [0036] 본 발명의 형질전환 식물세포 및 형질전환 식물체를 제조하기 위하여 당업계에 일반적으로 공지된 방법(*Methods of Enzymology*, Vol. 153, (1987))에 따라 실시될 수 있다. 외래성 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물에 형질전환시킬 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로

사용할 수 있으며(Chilton et al. *Cell* 11:263:271(1977)), 직접 외래성 폴리뉴클레오티드를 식물 세포내로 도입시켜 식물을 형질전환시킬 수 있다(Lorz et al. *Mol. Genet.* 199:178-182;(1985)). 예를 들어, T-DNA 부위를 포함하지 않는 벡터를 이용하는 경우에는 전기천공법(electroporation), 입자충격법(microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake)을 이용할 수 있다.

[0037] 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이 외래성 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 아그로박테리움 투메페이스언스(*Agrobacterium tumefaciens*)로 식물 세포나 종자 등을 감염시키는 방법이다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호). 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물 세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.

[0038] 본 명세서에서, 용어 “식물(체)”는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.

[0039] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 건조 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다:

[0040] (a) 제 2 항의 재조합 벡터를 식물 세포에 도입시키는 단계; 및

[0041] (b) 상기 식물세포로부터 건조 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

[0042] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열 및 이들을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0043] 식물발현용 재조합 벡터를 식물세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 실시될 수 있다.

[0044] 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제(예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물세포는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(npt II) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜트로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).

[0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 이용되는 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택된다.

발명의 효과

[0046] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0047] (a) 본 발명은 식물 유전자의 건조 스트레스 특이적 발현용 프로모터, 이를 포함하는 식물의 건조 스트레스 내성 유전자 발현용 재조합 벡터 및 이에 의해 형질전환되어 건조 스트레스 내성이 증진된 식물세포 및 식물체를 제공한다.

[0048] (b) 본 발명은 건조 상황 하에서 목적 유전자의 발현을 강하게 유도하는 *OsDhn1* 프로모터 및 이의 일부 절편을 이용함으로써, 식물체 내에서 건조 저항성 유전자가 수분이 부족한 상황 하에서만 발현되도록 하는 건조상황 특이적 유전자 발현 시스템에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 *OsDhn1* 프로모터의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸 그림이다. 뉴클레오타이드의 위치는 왼쪽에 표시하

였다. +1은 *OsDhn1* 유전자의 전사 개시지점을 나타낸다. 스트레스 반응성 *cis*-요소로 추정되는 부분은 박스 (ABRE-유사) 및 어두운 박스(DRE-코어)로 표시하였다. TATA 박스로 추정되는 부분은 두줄 밑줄로 표시하고, 번역 개시 코돈은 두꺼운 밑줄로 표시하였다. 각기 다른 프로모터 부위를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머는 한 줄 밑줄로 표시하였다. 이탤릭 문자는 *OsDhn1* cDNA의 5' 부위를 나타낸다.

도 2는 *OsDhn1* 프로모터에서 스트레스 반응성 *cis*-요소로 추정되는 부분 및 그 절편의 모식도를 나타낸 그림이다. 1.6 kb *OsDhn1* 프로모터 (*POsDhn1*-F1)의 *cis*-요소는 실시예에서 서술한 방법으로 웹 툴을 이용하여 탐색하였다. 1.6 kb *POsDhn1*-F1로부터 두 개의 프로모터 절편인 *POsDhn1*-F2 및 *POsDhn1*-F3을 서브클로닝하여 프로모터 분석에 사용하였다. A, ABRE-유사(G/ACGT); D, DRE-코어(gCCGAC); D' , DRE-코어(aCCGAC); D' ' , DRE-코어(tCCGAC); T, 추정 TATA-박스.

도 3은 *OsDhn1* 프로모터의 분석을 위해 구축된 벡터의 모식도를 나타낸 그림이다. 도 3a는 트랜스 활성화 분석에 사용된 이펙터, 리포터 및 내부 대조군 벡터의 모식도이다. 이펙터 및 내부 대조군 벡터는 옥수수 *유비퀴틴* 프로모터 하에서 *CBF1*, *OsDREBs* 및 *Renilla LUC*의 ORF를 이용하여 구축하였다. 리포터는 *OsDhn1* 및 *rd29a* 프로모터 하에서 반딧불 *LUC*를 이용하여 구축하였다. 도 3b는 *OsDhn1::GUS* 벡터를 나타낸 그림이다. 바이너리 벡터 내에서 *POsDhn1*-F1 절편과 유전자를 융합하여 pSK220를 제작하였다. *Pubi*, 옥수수 *유비퀴틴* 프로모터; P35S, CaMV 35S 프로모터; *Tnos*, *nopaline synthase* 유전자의 터미네이터 서열; T7, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자 전사체(7 *hph*)의 터미네이터 서열; RB 및 LB, *A. tumefaciens*의 Ti 플라스미드의 각각 우 경계서열(right border sequences) 및 좌 경계서열(left border sequences)

도 4는 벼 원형질체를 이용한 트랜스 활성화 분석을 통해 *OsDhn1* 프로모터를 분석한 결과를 나타낸 그림이다.

각각의 개별적인 실험에서 1×10^6 개 원형질체를 2 μ g의 리포터, 2 μ g의 이펙터 및 0.5 μ g의 내부 대조군으로 전기천공하였다. 도 4a는 대조군 벡터에 의한 3개의 *POsDhn1-LUC* 리포터의 트랜스 활성화를 나타낸다. 상대적 트랜스 활성화 활성은 *POsDhn1*-F1-*LUC* 대조군 벡터의 상대적 루시페라아제 활성을 1.0으로 정의하여 계산하였다. 도 4b는 대조군 벡터 및 *CBF1*에 의한 3개의 *POsDhn1-LUC* 리포터의 트랜스 활성화를 나타낸다. 상대적 트랜스 활성화 활성은 대조군 벡터의 상대적 루시페라아제 활성을 1.0으로 정의하여 측정하였다. 전기천공 효율을 평균화하기 위하여 *Pubi-Renilla LUC* 벡터를 공배양하였다. 리포터의 트랜스 활성은 반딧불 *LUC/Renilla LUC* (상대적 루시페라아제 활성) 값으로 계산하였다. 그래프의 수직 바(bar)는 표준 편차값을 나타낸다. 모든 실험은 최소 6회 반복하였다.

도 5는 *OsDREB1*를 이용한 *OsDhn1* 프로모터의 트랜스 활성화 분석결과를 나타낸 그림이다. 각각의 개별적인 실험에서 1×10^6 개 원형질체를 2 μ g의 리포터, 2 μ g의 이펙터 및 0.5 μ g의 내부 대조군으로 전기천공하였다(도 5a-5c). 도 5d는 세 개의 *POsDhn1-LUC* 리포터인 *POsDhn1*-F1-*LUC*(도 5a), *POsDhn1*-F2-*LUC*(도 5b) 및 *POsDhn1*-F3-*LUC*(도 5c)의 *CBF1* 및 *OsDREB*에 의한 트랜스 활성화를 나타내었다. 전기천공 효율을 평균화하기 위하여 *Pubi-Renilla LUC* 벡터를 공배양하였다. 각각의 유전자의 트랜스 활성은 반딧불 *LUC/Renilla LUC* (상대적 루시페라아제 활성) 값으로 계산하고, 상대적 트랜스 활성화 활성은 대조군 벡터의 상대적 루시페라아제 활성을 1.0으로 정의하여 계산하였다. 그래프의 수직 바(bar)는 표준 편차값을 나타낸다. 모든 실험은 최소 6회 반복하였다.

도 6은 *OsDhn1::GUS* 형질전환 벼의 서던 블롯팅 결과를 나타낸 그림이다. T1 식물의 5 μ g의 지놈 DNA를 *Hind* III로 절단하고, 프로브로서 *GUS*를 혼성화하였다. *Hind* III-절단 람다 DNA 절편의 위치 및 크기를 kbp로 표시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0051] 실시예

[0052] 실험방법

[0053] *OsDhn1* 프로모터의 동정

- [0054] *OsDhn1* 프로모터를 분리하기 위하여, *OsDhn1*(AY786415 Lee et al., 2005)를 벼 유전자 데이터 베이스 검색의 검색어로 사용하였다. 검색된 지놈 DNA 서열에 기초하여, *OsDhn1* 개시코돈의 약 1.6kb 업스트림 부위를 특이적 프라이머(5'-AACTGCAGATGTGGCTGGCATCAAGTG-3' 및 5'-ACGCGTCGACGGATTTCAGCTAAAGCCTCTCG-3')를 이용하여 PCR 증폭함으로써 클로닝하였다. *Oryza sativa* ssp. *Japonica* cv. Dongjin 의 지놈 DNA를 PCR 주형으로 사용하였다. *OsDhn1* 프로모터로 추정되는 뉴클레오타이드 서열을 시퀀싱으로 확인하였으며, 이의 *cis*-작동 요소를 웹 툴(PlantCARE, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/> PLACE, <http://www.dna.affrc.go.jp/htdoc/PLACE>)을 이용하여 탐색하였다. 프로모터 분석을 위하여, *OsDhn1* 프로모터의 세개의 절편을 1.6kb *OsDhn1* 프로모터로부터 특이적 프라이머(*POsDhn1*-F2, 5'-AACTGCAGCACCAACCAACCAAGACC-3' 및 5'-ACGCGTCGACGGATTTCAGCTAAAGCCTCTCG-3'; *POsDhn1*-F3, 5'-AACTGCAGCTCTCCCTCGGTGACACG-3' 및 5'-ACGCGTCGACGGATTTCAGCTAAAGCCTCTCG-3')를 이용한 PCR을 통해 서브클로닝하고, 시퀀싱을 통해 이들의 뉴클레오타이드 서열을 확인하였다.
- [0055] 벡터의 제작
- [0056] 벼의 원형질체를 이용한 *OsDhn1* 프로모터의 트랜스 활성화 어세이를 위하여, *POsDhn1*-F1, *POsDhn1*-F2 및 *POsDhn1*-F3의 세 개의 절편을 반딧불 루시페라아제(*LUC*) 유전자로 라이게이션하여 *OsDhn1* 프로모터를 위한 리포터 플라스미드를 제작하였다. 작동 플라스미드 제작을 위해 *CBF1* 및 *OsDREBs*의 ORF(open reading frame)을 과발현용 옥수수 유비퀴틴 프로모터, 다중 클로닝 사이트 및 *nos* 유전자의 터미네이터를 가지는 식물 발현 벡터 pGA1611/1991(Kim et al., 2003)에 삽입하였다. *Renilla* *LUC*의 ORF 역시 *Pubi-Tnos*에 삽입하여 전기천공 효율을 표준화하는 내부 대조군으로 사용하였다. *DRE cis*-작동 요소를 포함하는 애기장대의 0.9 kb *rd29a* 프로모터는 반딧불 *LUC*로 라이게이션하여 *rd29a* 프로모터에 대한 리포터 플라스미드를 제작하였다. *OsDhn1* 프로모터의 GUS 어세이를 위하여, *POsDhn1*-F1 절편을 *gus* 유전자로 라이게이션하여 벼 형질전환 벡터 pSK220를 제작하였다 (도 3b).
- [0057] 벼 원형질체를 이용한 트랜스활성화 어세이
- [0058] 부유배양한 벼의 Oc 세포의 원형질체를 이용하여 공지된 소수 변형 방법에 따라 전기천공을 하였다(Kyozuka and Shimamoto, 1991; Hattori et al., 1994). 요약하면, 부유배양된 Oc 세포(계대배양 후 6-7일 경과)에 0.3g 셀룰로오스(Onozuka RS, Yakult Honsha, Japan) 및 0.2g 마세로자임 (macerozyme)(R-10, Yakult Honsha, Japan)을 28℃에서 3시간 동안 처리하고 20μm 포어 필터를 이용하여 여과하였다. 여과된 원형질체를 세척한 뒤 전기 천공에 이용하였다. 각각의 실험에서, 1×10^6 개의 원형질체를 2μg의 리포터, 2μg의 이펙터 및 0.5 μg의 내부 대조군과 함께 Gene-pulser 시스템(Bio-Rad, USA)을 이용하여 300Vcm⁻¹, 500uF 전기용량으로 0.4cm 전극 큐벳에서 전기천공하였다. 28℃에서 2일간 배양한 뒤에 Dual-루시페라아제 리포터 Assay System(Promega, USA) 및 루미노미터(MicroLumat LB96V, Berthold, Germany)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 반딧불 및 바다팬지(*Renilla*)의 루시페라아제 활성을 측정하였다.
- [0059] 벼 형질전환 및 동형접합체의 선정
- [0060] japonica rice cultivar, Dongjin을 아그로박테리움-매개 공배양을 통해 형질전환하고, 40mg/L 하이그로마이신 B-함유 배지에서 재생하였다(Hiei et al., 1994; Lee et al., 1999). 이들 재생 식물은 온실 및 논으로 옮겨 각각의 식물주로부터 종자를 수득하였다. 동형접합체를 선택하기 위하여 T2 자손의 약 20개의 종자를 하이그로마이신 B-함유 여과지에서 Xiong 및 Yang (2003)의 방법에 따라 발아시켰다. 28℃에서 10일간 배양 후, 생존한 종자 수를 측정하고 모든 유모가 생존한 식물주를 동형접합체로 간주하였다.
- [0061] 서던 블롯팅 분석
- [0062] 지놈 DNA를 Chen 및 Roland(1999)의 방법에 따라 앞에서 추출하였다. 37℃에서 12시간 동안 제한효소로 절단한 5μg DNA를 0.8% 아가로스 겔에서 분리하고 Hybond-N 막(Amersham, UK)으로 vacuum transfer system (Hoefer, USA)을 이용하여 옮겼다. DNA 블롯은 무작위 프라이밍 방법(Feinberg and Vogelstein, 1983)으로

방사성 표지 프로브로 혼성화시켰다. 혼성화 후에, 막을 상온에서 15분간 2 SSC 및 0.1% SDS로, 상온에서 15분간 1 SSC, 0.1% SDS로 순차적으로 세척하였다. 혼성화 신호는 상 분석기(BAS-1500, Fuji, Japan)로 검출하고 HyperfilmTM MP (Amersham, UK)에 노출시켰다.

[0063] GUS 분석

[0064] 조직화학 GUS 염색은 염색 용액에 20% 메탄올을 첨가한 점을 제외하고는 Dai 등(1996)의 방법에 따라 수행하였다. 벼의 지엽(flag leaf)을 절개하여 DW를 함유한 96 웰 플레이트에 옮기고 정해진 시간 동안 상처(26℃) 및 냉해(4℃)에 노출시켰다. 건조 스트레스를 가하기 위하여, 잎의 절편을 비어있는 96 웰 플레이트에서 공기 건조하였다. 염 및 ABA 처리를 위하여, 잎 절편을 각각 250mM NaCl 및 100 μM ABA 용액을 함유하는 96 웰 플레이트에서 배양하였다. 스트레스 처리 후에, 잎 절편을 X-gluc 용액에서 배양하고 70% EtOH를 이용하여 클로로필을 제거하였다. GUS-염색 시료를 해부 현미경으로 관찰하였다

[0065] 실험결과

[0066] *OsDhn1* 프로모터의 동정

[0067] *OsDhn1*의 뉴클레오타이드 서열을 검색어로 하여 벼 유전자 데이터베이스로부터 프로모터를 동정하고 PCR 증폭을 통해 클로닝하였다. 뉴클레오타이드 시퀀싱 및 벼 유전자 데이터베이스로부터 상응하는 서열과의 비교를 통해 프로모터의 뉴클레오타이드 서열을 확인하였다. 도 1 및 2에서 보는 바와 같이, 약 1.6kb의 *OsDhn1* 프로모터는 ABRE(ABA responsive element)-유사 서열 및 DRE(drought responsive element)-코어 서열과 같은 다양한 *cis*-작동 요소를 가진다. DRE-코어 서열 중에서, CBF3/DREB1A(Dubouzet al., 2003) 보다 *OsDREB1A*에 대한 결합 친화도가 더 높은 GCCGAC 서열은 5' UTR 말단으로부터 -1333, -1002, -278 및 -204 위치에서 나타났다. 스트레스 반응성 *cis*-작동 요소의 위치에 근거하여, *OsDhn1* 프로모터를 *POsDhn1*-F1, *POsDhn1*-F2 및 *POsDhn1*-F3의 3개 절편으로 나누고 서브클로닝하였다(도 2). 프로모터의 모든 절편은 전사 및 번역의 효율성을 위하여 5' UTR의 87 bp를 포함한다. *POsDhn1*-F1 절편은 세 개의 ABRE-유사 서열 및 6개의 DRE-코어 서열을 포함하는 -1493 bp에서 +87 bp 사이의 프로모터 부위를 포함하고, *POsDhn1*-F2 절편은 한 개의 ABRE-유사 서열 및 2개의 DRE-코어 서열을 포함하는 -816 bp에서 +87 bp 사이의 프로모터 부위를 포함하며, *POsDhn1*-F3 절편은 한 개의 ABRE-유사 서열 및 2개의 DRE-코어 서열을 포함하는 -316 bp에서 +87 bp 사이의 프로모터 부위를 포함한다. 이들 3개의 절편이 본 발명에서 사용되었다.

[0068] 트랜스활성화 분석을 이용한 *OsDhn1* 프로모터의 분석

[0069] *OsDhn1* 프로모터의 활성을 조사하기 위하여 3개의 프로모터 절편을 반딧불 *LUC*와 융합하고(도 3a), 벼 원형질체를 이용한 트랜스활성화 분석에 사용하였다. 원형질체를 각각의 *POsDhn1*-Fs-*LUC* 리포터 및 이펙터와 공-형질 전환(co-transfection)하였다. 이펙터는 *CBF1*에 융합된 옥수수 *유비퀴틴* 프로모터(*Pubi*) 및 CBF/DREB 유전자를 함유하지 않은 대조군 벡터로 이루어졌다. 또한, 형질전환 효율을 조절하기 위하여, *Pubi-Renilla* *LUC* 플라스미드를 리포터 및 이펙터 모두와 함께 전기천공 하였다. 대조군 벡터만이 이펙터로 사용될 경우, *POsDhn1*-F1의 상대적 루시페라아제 활성이 절편들 가운데 가장 높았다(도 4a). *POsDhn1*-F2 및 *POsDhn1*-F3의 상대적 루시페라아제 활성은 *POsDhn1*-F1 활성의 각각 50% 및 20% 였다. 이는 *OsDhn1* 프로모터의 기저 활성이 프로모터 사이즈에 관련되어 있음을 말해준다. 한편, *CBF1*이 이펙터로 사용된 경우, *POsDhn1*-F1 및 *POsDhn1*-F3 사이의 상대적 루시페라아제 활성의 증가는 유사하였다(도 4b). 그러나, *POsDhn1*-F2의 활성은 *CBF1*의 존재 하에서 증가하지 않았다. 이는 *CBF1*에 의한 *OsDhn1* 프로모터의 조절은 프로모터의 크기가 아닌 *OsDhn1* 프로모터의 특정 부위에 의해 좌우됨을 말해준다. 나아가, 이는 *POsDhn1*-F1 및 *POsDhn1*-F3 절편이 *CBF1*에 대한 결합 사이트를 가짐을 말해준다. *OsDREBs*가 벼 세포의 *OsDhn1* 프로모터를 트랜스활성화시킬 수 있는지를 조사하기 위하여, *POsDhn1*-Fs-*LUC* 리포터를 *OsDREBs* 발현 이펙터와 함께 전기천공하였다(도 5). *POsDhn1*-F1-*LUC*의 상대적 루시페라아제 활성은 *CBF1* 또는 *OsDREB1A*의 존재 하에서 대조군 벡터보다 각각 약 2.2배 또는 1.6배 증가하였다(도 5a). 그러나, 다른 *OsDREB1*의 활성은 대조군과 유사하였다. 한편, *POsDhn1*-F2-*LUC*의 상대적 루시페라아제 활성은 *CBF1* 뿐 아니라 어떠한 *OsDREBs*에 의해서도 증가하지 않았다(도 5b). *POsDhn1*-F3-*LUC*의 상대적 루시페라아제 활성은 *CBF1* 및 *OsDREB1*에 의하여 *POsDhn1*-F1-*LUC* 및 *POsDhn1*-F2-*LUC*에 비해 극적으로 변화하

였다(도 5c). CBF1 및 OsDREB1D의 존재 하에서, *POsDhn1-F3-LUC*의 활성은 2배 이상 증가하였다. 나아가, OsDREB1A는 *POsDhn1-F3-LUC* 활성을 대조군에 비하여 1.5배 증가시켰다. 다른 OsDREB1의 활성은 *POsDhn1-F1-LUC* 및 *POsDhn1-F2-LUC*의 경우와 마찬가지로 대조군과 유사 하였다. 이는 OsDREB1 역시 CBF1과 마찬가지로 *OsDhn1* 프로모터 활성을 조절함을 보여준다. *Prd29a-LUC*가 실험 대조군의 리포터로 사용된 경우, 벼의 원형질 체에서 상대적 루시페라아제 활성은 CBF1, OsDREB1A, OsDREB1B 또는 OsDREB1D의 존재 하에 대조군 벼에 비하여 2배 이상 증가하였다(도 5d). 증가의 수준에서 미미한 차이가 있지만, CBF1 및 OsDREB1A에 의한 이러한 증가는 이미 보고된 바와 유사한 경향이다(Dubouzet et al., 2003). 이는 본원 발명자들의 벼를 이용한 트랜스 활성화 분석이 적절하게 이루어졌음을 보여준다.

[0070] *OsDhn1::GUS* 형질전환 벼의 제작

[0071] GUS 어세이를 통해 *OsDhn1*의 발현패턴을 조사하기 위해, 본 발명자들은 *OsDhn1* 프로모터 절편 중 *POsDhn1-F1*이 융합된 *GUS* 리포터 유전자를 포함하는 바이너리 벡터 pSK220을 구축하였다(*OsDhn1::GUS*, 도 3b). 바이너리 벡터는 *아그로박테리움* 매개 공배양 방법으로 벼에 도입하였다. 형질전환 식물을 제작하고 외래유전자의 도입은 서던 블롯팅으로 분석하였다(도 6). *GUS* 프로브를 이용한 서던 블롯팅 수행시 식물주의 T-DNA 삽입 번호는 1에서 5 카피 이상이었다. 10개의 *OsDhn1::GUS* 형질전환 식물주를 제작하여 성체가 될 때까지 배양하였다. 10개 식물주 중 9개가 정상 성장조건에서 외형의 변화를 보이지 않았으며, 이에 GUS 어세이에 이용되었다. 10번 식물주는 외소하고 느린 성장을 보여 이용되지 않았다.

[0072] *OsDhn1::GUS* 형질전환 식물의 GUS 어세이

[0073] *OsDhn1::GUS* 형질전환 식물주의 잎 절편을 이용하여 비생물학적 스트레스 하에서의 *OsDhn1* 프로모터 활성을 조사하기 위한 GUS 어세이를 수행하였다. 9개 식물주 중, 8개가 기저수준의 GUS 발현을 보였다(표 1). 그러나, GUS 발현은 상처, 냉해 고염 및 ABA 처리에 의해서는 증가하지 않고 겨우 유지되는 반면, 건조스트레스에 의해서는 크게 증가하였다. 식물주에서 GUS 발현은 주로 잎 절편의 절단면 및 잎 표피에서 검출하였다. 이는 *OsDhn1* 프로모터가 다른 스트레스보다 건조 스트레스에 대하여 강하게 반응함을 보여준다.

표 1

[0074] 다양한 처리 후 *OsDhn1::GUS* 형질전환 벼의 GUS 분석 결과

식물주	처리 후 1, 3 및 24시간 경과시 잎 절편에서의 GUS 발현				
	상처 ²⁾	냉해 ³⁾	건조 ⁴⁾	염 ⁵⁾	ABA ⁶⁾
No. 1	+, +, + ¹⁾	+, +, +	+, +++, +++	+, +, +	+, +, +
No. 2	+, +, +	+, +, +	+, ++, +++	+, +, +	+, +, +
No. 3	+, +, +	+, +, +	+, +, ++	+, +, +	+, +, +
No. 4	+, +, +	+, +, +	+, ++, +++	+, +, +	+, +, +
No. 5	-, -, -	-, -, -	-, -, -	-, -, -	-, -, -
No. 6	+, +, +	+, +, +	+, ++, +++	+, +, +	+, +, +
No. 8	+, +, +	+, +, +	+, ++, +++	+, +, +	+, +, +
No. 9	+, +, +	+, +, +	+, +, +++	+, +, +	+, +, +
No. 11	+, +, +	-, -, +	-, +, ++	+, +, +	+, +, +

[0075] ¹⁾GUS 활성의 강도는 +++ (강함), ++ (보통), + (약함) 및 (활성없음)으로 표시하였다. 벼의 잎 절편을 지정된 시간동안 상처(26℃)²⁾, 냉해(4℃)³⁾, 가뭄(공기-건조)⁴⁾, 염(250mM NaCl)⁵⁾ 및 ABA (100 μM)⁶⁾로 처리하였다.

[0076] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다.

따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

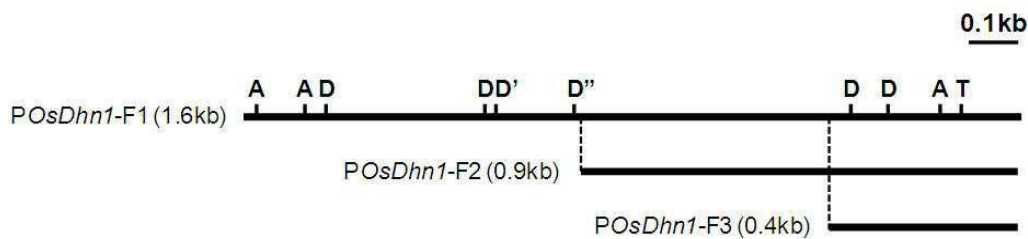
도면

도면1

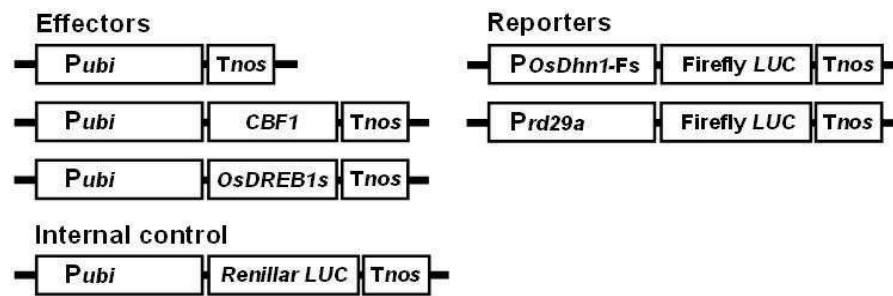
```

-1493 ATGTGGCCTG GCATCAAGTG ATGCGCCGCT CGCGTGCGTC CCGGCTGAAT CGATTCTG
-1433 CGCCCGTGTC CTCTTGCTGG TACAAAAGCC GAAGCCCTG CCGCCCATCC AGGCTCCCC
-1373 CGTACGTGGG ACGCGGGCAC ATCGGGCAGG ATCCGATGTC GCGGACIAGT TTATCCGCAG
-1313 GCTCGCCCGA GTCCCCACGA CGAGGCGAGG CCAGAGGCTC GTCGTGGTAC ACCAGATGCA
-1253 ACGGTTGGAA CACGTCGTCC TCCTTGATTT CGCAACCGTT CCACGTCAGA ACAGTGCTGG
-1193 AAAAGAACGG ATCCATAGAG AGTTCTTCGT GGCCGTCACG ATTTCGCGGC GCCAAATTAC
-1133 CTTGCCCTTA TGGTTAGGGG CGGCATCTTG TGTACCGAAA GTCAATAATG ACTCGAGCTA
-1073 AAACCGTACT ACAGACTAGA GTGTGGCCCC AATGCGTTTC GCAGGACAGG ACGGGCGAAA
-1013 GAAATCAAAA GCGCGACATG CCACCGACAT TTCCCCCAC GAAAGCTATC ATCAGCTATC
-953 ATCAAAGCGA AGGAAAGAAA GAAAAATAAA AGGAAAAGAA CTGGCTGGAA ATTAGAGAAG
-893 CCCCCGACGA CTCGATCTGG GGGTGCGAAA TTAATCAGTG TGATCAACAG GGATAACTTA
-833 TCCCGTCCGA CCAAATCCAC CAACCAAAACC AAGACCCGAT TTGTTAGGCT GTGAAAGACG
-773 GATCAGTGGG ACCCTGATCT ACGGACCCCA TATGTCACCG TCCAGGTCTC TGGATCTCTC
-713 CCGTCGTCTT AATCAGACAC CGCGCGCGCG GTGCCGTCGC TCTCGAGCCG TGTCCCGCTC
-653 CCAACTCGTC ACAAAGCGA TCACAGACTC TTCCTTCCTC TGCTGGGAGA GAAGAAAAAT
-593 TGGCCGCGAT GATGCCGATA AAGAGGAAAA AGGGATGAGA ATCCGATGGA AAAAAACTGA
-533 TGTTAATCTA TCGTACTGTC TGCGCACTAA GACGAATCGT ATCCGAACAA GAAACGCTTA
-473 CGTTACTGTT CCTAAATGGA TCGTCCGCT CATCACTTAA CCAAAAATCG ATTAGGAAAT
-413 TGACGGACAG CGACGCCCCA AGCCAAGTGT CTCGTCGCGT AGGCGTCGAG GCCTCGAAGC
-353 AGAGGGAGCG GAGAGGCGGA CGCGCCGCCC ACGCCTCTC TCCCTCGGTG ACACGGCCGT
-293 CTGGTCCAC ATGGCGCGGA CTCTCCCGA TCGGTCCACC CGTCCCGAGG CACCGCCACG
-233 TCGGAACCAG CCGGCCGCCC CACGCGATTG CCGACACGCG TCGCGCGGCC ACTGGCTCAC
-173 CCGCTGCCTG CCTCTGCCTG CCCCCATCT CGTCGCCATT TCCCGCCAC GCTTCTTGTC
-113 CTCGCGTCGC CTACGCGTAC GTACGATACA AACGCCGCAC CTTTCGATCC CCTCCGCTAT
-53 ATAAGGAGGG CATCTGCCTC GCCACCTTCT TCATCCGAAA GCAAAGCGA CTCGTCACAG
+1
8 CTCAACAAG TCAAGAGCGA ATAGTTCTTG CTGATCTGTT GTTGATTAC TTTAGTTCTC
68 GAGAGGCTTT AGCTGAATCC ATCGATCGAT CATG
  
```

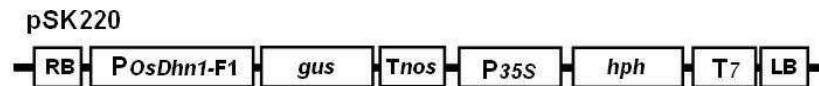
도면2



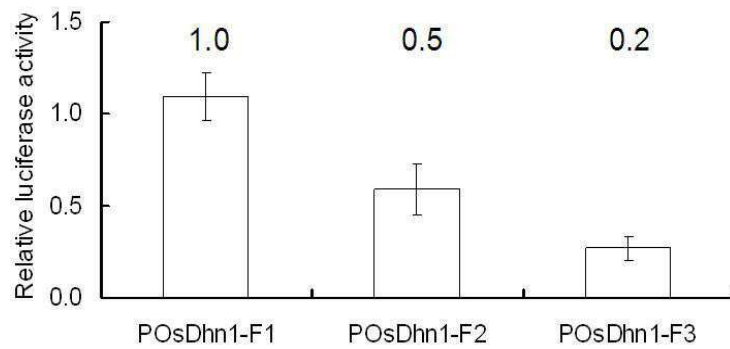
도면3a



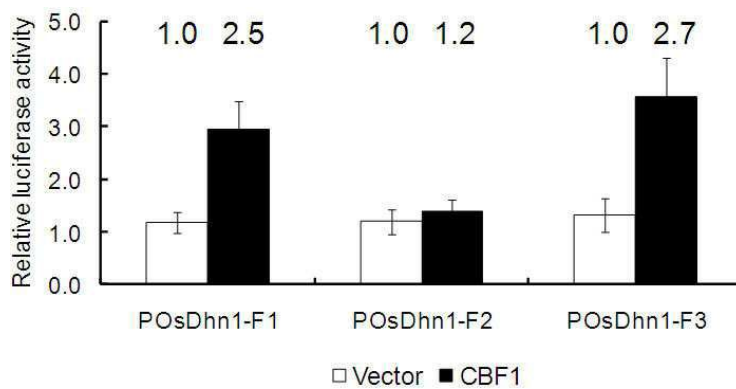
도면3b



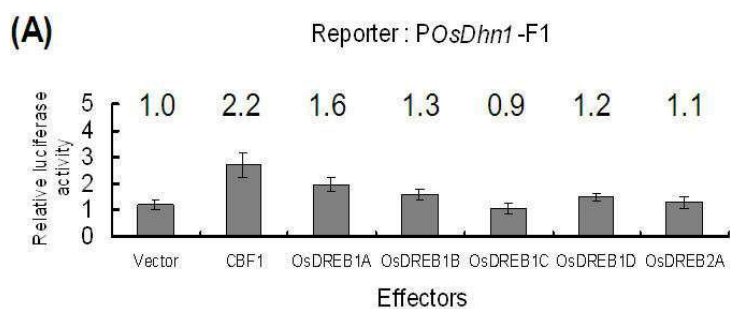
도면4a



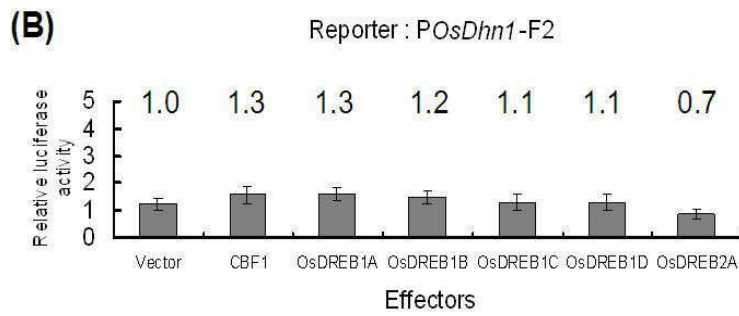
도면4b



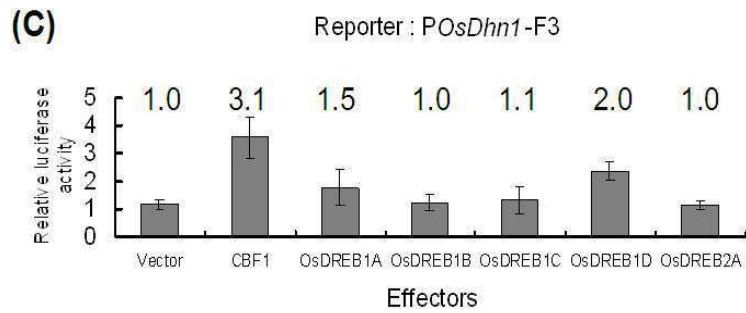
도면5a



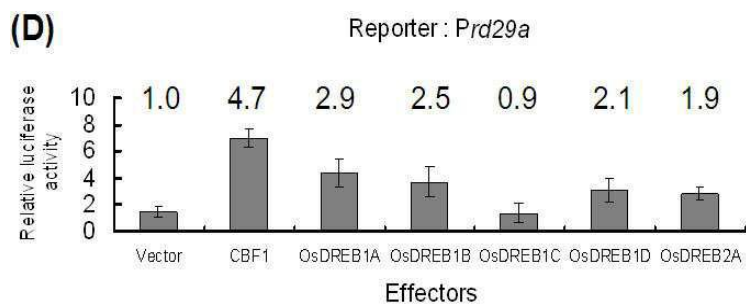
도면5b



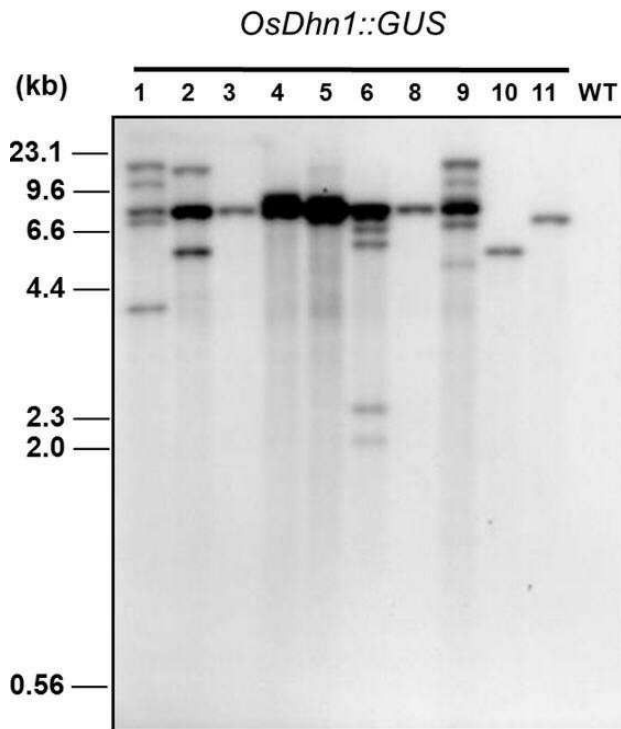
도면5c



도면5d



도면6



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
 <120> Drought Stress-inducible Promoter and Use Thereof
 <130> PN120575
 <160> 2
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 1594
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa
 <400> 1

```

atgtggcctg gcatcaagtg atgcgcccct cgcgtgcctc ccggctgaat cgattcctgg      60
cgcccggtgc ctcttgctgg tacaaaagcc gaagcccttg ccgccaatcc aggtccccc      120
cgtacgtggg acgcgggcac atcgggcagg atccgatgtc gccgactagt ttatccgcag      180
gtcgcgccga gtccccacga cgaggcgagg ccagaggctc gtcgtggtac accagatgca      240

acggttgga cactgctcc tccttgattt cgcaaccgtt ccacgtcaga acagtgtgg      300
aaaagaacgg atccatagag agttcttcgt ggccgtcacg atttcgcggc gccaaattac      360
cttgccctta tggtagggg cgccatcttg tgtaccgaaa gtcaataatg actcgagcta      420
aaccgtact acagactaga gtgtggcccc aatgcgtttc gcaggacagg acgggcgaaa      480
    
```

gaaatcaaaa ggccgacatg ccaccgacat ttccccccac gaaagctatc atcagctatc 540
atcaaagcga aggaaagaaa gaaaaataaa aggaaaagaa ctggctggaa attagagaag 600
ccccggacga ctcgatctgg ggggtggcaaa ttaatcagtg tgatcaacag ggataactta 660

tcccgctcga ccaaattccac caaccaaacc aagaccgat ttgttaggct gtgaaagacg 720
gatcagtggg accctgatct acggacccca tatgtcaccg tccaggtctc tggatctctc 780
ccgtcgtcct aatcagacac cgcgcgcgcg gtgccgtcgc tctcgagccg tgtcccgctc 840
ccaactcgtc acaaaagcga tcacagactc ttcttctctc tgctgggaga gaagaaaaat 900
tggcccgcat gatgccgata aagaggaaaa agggatgaga atccgatgga aaaaaactga 960
tgttaatcta tcgtactgc tgcgcactaa gacgaatcgt atccgaaca gaaacgttta 1020
cgttactgtt cctaaatgga tcgtccgct catcactta ccaaaatcg attaggaaat 1080

tgacggacag cgacgccga agccaagtgt ctcgctcgt aggcgtcgag gcctcgaagc 1140
agagggagcg gagaggcgga cgcgccgcc acgcctctc tccctcgtg acacggccgt 1200
ctggctccac atggcgccga cctctccga tgcgtccacc cgtcccagg caccgccacg 1260
tcggaaccag cggcgccccc caccgattg ccgacacgcg tcgcgcgccc actggtcac 1320
ccgtgcctg cctctgcctg cccccatct cgtcgccatt tcccgccac gcttcttgtc 1380
ctcgctcgc ctacgcgtac gtacgataca aacccgcac ctttcgatcc cctccgctat 1440
ataaggaggg catctgcctc gccaccttct tcacccgaaa gcaaaagcga ctcgtcacag 1500

ctcaacaag tcaagagcga atagtcttg ctgatctgtt gtttgattac tttagtctc 1560
gagagcttt agctgaatcc atcgatgat catg 1594

<210> 2
<211> 417
<212> DNA
<213> Oryza sativa
<400> 2

ctctccctcg gtgacacggc cgtctggctc cacatggcgc cgacctctcc cgatgcgtcc 60
accgtcccg aggcaccgcc acgtcggaac cagccggccg cccacgcga ttgccgacac 120
gcgtcggcg gccactggt caccgctgc ctgcctctgc ctgccccca tctcgtcgcc 180
atttccgcgc caccgttctt gtctctcgct cgctacgcg tacgtacgat acaaacgccg 240

caccttctga tcccctccgc tatataagga gggcatctgc ctgccacct tcttcacccg 300
aaagcaaaag cgactcgtca cagctcaaac aagtcaagag cgaatagttc ttgctgatct 360
gttgtttgat tacttttagt ctcgagaggc tttagctgaa tccatcgatc gatcatg 417