



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0094348
(43) 공개일자 2008년10월23일

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0038685

(22) 출원일자 2007년04월20일

심사청구일자 2007년04월20일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

임채오

경남 진주시 하대동 현대아파트 103동 1203호

홍준기

경남 사천시 사천읍 정의리 188-15번지

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김동완

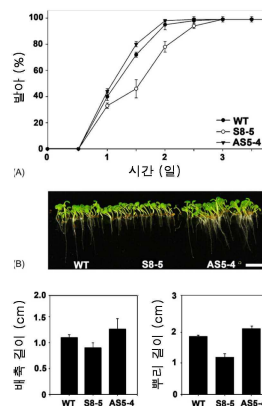
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 파이토시스타틴 유전자 발현에 의한 발아 지연 및 시스테인단백질 분해효소 활성 억제가 가능한 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 파이토시스타틴 유전자 발현에 의한 발아 지연 및 시스테인 단백질 분해효소 활성 억제가 가능한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 배추 꽃눈에서 분리된 파이토시스타틴 cDNA 유전자 클론(GenBank 수탁번호 L41355) 발현에 의한 발아 지연 및 시스테인 단백질 분해효소 활성 억제가 가능한 형질전환 식물체에 관한 것이다.

대표도



(72) 발명자

황정은

경남 진주시 호탄동 613-2번지 204호

정우식

경남 진주시 가좌동 주공그린빌아파트 109동 1702호

이균오

경남 진주시 가좌동 주공그린빌아파트 102동 804호

이상열

경남 진주시 망경동 한보아파트 106동 1806호

특허청구의 범위

청구항 1

브라시카 라파(*Brassica rapa*) 유래 파이토시스타틴 유전자로 형질전환시켜 종자 발아 지연 및 시스테인 단백질 분해효소 활성 저해가 가능한 형질전환 식물체

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 유래 파이토시스타틴 유전자는 GenBank 수탁번호 L41355의 파이토시스타틴 유전자임을 특징으로 하는 형질전환 식물체

청구항 3

제 1항의 형질전환 식물체에 의해 생성된 발아가 지연되는 종자

청구항 4

i) 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 유래 파이토시스타틴 유전자를 포함한 식물 형질전환 발현 벡터 컨스트럭트를 조립하는 단계;

ii) 상기 컨스트럭트를 아그로박테리움 등을 매개로 식물 세포 내에 도입 선별 형질전환 식물 세포를 제조하는 단계;

iii) 상기 형질전환 식물 세포를 생장시키는 단계

로 구성된 종자 발아 지연 및 시스테인 단백질 분해효소 활성 저해가 가능한 형질전환 식물체의 제조방법

청구항 5

제 5항의 방법에 따라 제조된 형질전환 식물체 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 유래 파이토시스타틴 유전자를 과 발현시킴을 특징으로 하는 종자 발아 지연 및 시스테인 단백질 분해효소 활성 저해방법

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 파이토시스타틴 유전자 발현에 의한 발아 지연 및 시스테인 단백질 분해효소 활성 억제에 가능한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 배추 꽃눈에서 분리된 파이토시스타틴 cDNA 유전자 클론 (GenBank 수탁번호 L41355) 발현에 의한 발아 지연 및 시스테인 단백질 분해효소 활성 억제에 가능한 형질전환 식물체에 관한 것이다.
- <8> 시스타틴은 척추동물, 곤충 및 식물에서 확인된 시스테인 단백질 분해효소(cysteine peptidase, CP)의 단백질성 가역적 저해제이다. 식물 시스타틴(파이토시스타틴; PhyCys)은 널리 분포되고 쌀, 옥수수, 동부, 대두, 배추, 보리 및 밀을 포함한 다수의 원료에서 분리되었다. 시스타틴 슈퍼패밀리의 모든 멤버와 공통적으로 파이토시스타틴 단백질은 시스테인 단백질 분해효소 분자와 상호작용하는 3개의 보존된 영역을 포함한다: 아미노(N)-말단 영역 내 글리신 잔기; 첫 번째 헤어핀 루프 내 QVAG 모티프; 및 두 번째 헤어핀 루프 내 PW 모티프. 이들 보존된 서열은 시스테인 단백질 분해효소의 활성 사이트와 상호작용하는 시스타틴의 3별 구조의 형성과 관련된다.
- <9> Margis et al.(Arch. Biochem. Biophys. 359 (1998) 24-30)은 파이토시스타틴 단백질이 동물 시스타틴에 존재하지 않는 N-말단 영역 내 보존된 LARFAVDEHN 서열(α 1-헬릭스)을 보유함을 보고하였다. 이러한 서열은 단백질 데이터뱅크로부터 파이토시스타틴 단백질을 확인하고 슈퍼패밀리의 다른 멤버와 구별하는데 사용될 수 있다.
- <10> 파이토시스타틴 단백질은 내인성 및 이형성 시스테인 단백질 분해효소를 조절하고, 하기를 포함한 다양한 생리

적 과정에 참여하는 것으로 나타났다: 해충 곤충 및 선충의 장 내 소화 효소의 저해에 의한 방어 기작; 단백질체의 우발적 파괴에 의해 분비된 세포내 단백질 분해효소로부터의 세포질 대사 보호; 및 프로그램화된 세포 사멸 동안 단백질 분해효소 활성의 조절. 이들 단백질이 종자 발아 및 발아 동안 저장 단백질 분열에 중요한 시스템인 단백질 분해효소 조절에 관련되기 때문에 이들이 단백질 전환을 저해함으로써 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

<11> 그러나 종자 발아 후 내인성 시스템인 단백질 분해효소에 대한 파이토시스타틴 단백질의 활성은 생체 내 시스템을 이용하여 상세히 조사된 바 없다.

<12> 본 발명은 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 유래 파이토시스타틴 BrCYS1이 종자 발아 동안 저장 단백질의 단백질 가수분해에 관련된 저장된 시스템인 단백질 분해효소의 음성적 조절제임을 발견하고 이에 따라 이형적 형질전환 아라비도시스 시스템 내 발현을 측정하여 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<13> 본 발명에서 이루고자 하는 기술적 과제는 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 유래 파이토시스타틴 BrCYS1이 종자 발아 동안 저장 단백질의 단백질 가수분해에 관련된 저장된 시스템인 단백질 분해효소의 음성적 조절제 여부를 측정기 위해 이형적 형질전환 아라비도시스 시스템 내의 발현을 측정하여 상기 파이토시스타틴 BrCYS1으로 형질전환된 형질전환 식물을 개발코자 한 것이다.

발명의 구성 및 작용

<14> 본 발명의 목적은 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 유래 파이토시스타틴 유전자로 형질전환시켜 종자 발아 지연 및 시스템인 단백질 분해효소 활성 저해가 가능한 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

<15> 또한 상기 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 유래 파이토시스타틴 유전자는 GenBank 수탁번호 L41355의 파이토시스타틴 유전자임을 특징으로 한다.

<16> 또한 본 발명의 또다른 목적은 상기 형질전환 식물체에 의해 생성된 발아가 지연되는 종자를 제공하는 것이다.

<17> 한편 본 발명은 i) 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 유래 파이토시스타틴 유전자를 포함한 식물 형질전환 발현 벡터 컨스트럭트를 조립하는 단계; ii) 상기 컨스트럭트를 아그로박테리움 등을 매개로 식물 세포 내에 도입 선택 형질전환 식물 세포를 제조하는 단계; iii) 상기 형질전환 식물 세포를 생장시키는 단계로 구성된 종자 발아 지연 및 시스템인 단백질 분해효소 활성 저해가 가능한 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

<18> 또한 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 형질전환 식물체 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 유래 파이토시스타틴 유전자를 과발현시킴을 특징으로 하는 종자 발아 지연 및 시스템인 단백질 분해효소 활성 저해방법을 제공한다.

<19> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<20> 본 발명의 파이토시스타틴은 단백질 전환의 내인성 조절, 프로그램화된 세포 사멸 및 곤충 및 병원균에 대한 방어 기작에 관련된 식물 시스템인 단백질 분해효소 저해제이다. 본 발명에서 사용된 파이토시스타틴 BrCYS1(브라시카 라파(*Brassica rapa*) 파이토시스타틴 1)을 암호화하는 cDNA는 배추(*B. rapa* L. ssp. *pekinensis*)의 꽃눈에서 분리되었다.

<21> 본 발명의 파이토시스타틴 BrCYS1 유전자 발현은 종자 발아시 종자 발아 조절 파이토호르몬 GA₄₊₇ 및 ABA의 처리는 각각 BrCYS1 발현의 빠른 감소 및 적은 감소를 유발하였다. 또한 본 발명의 형질전환 식물체인 아라비도시스(*Arabidopsis*)에서 BrCYS1의 구성적 과발현은 발아 및 모종 생장을 지연시켰고 BrCYS1의 억제에 의해 이들은 증가되었다.

<22> 더욱이 상기 형질전환 식물체의 BrCYS1의 과발현은 전체 식물 생장 및 발아의 전반적인 지연을 유발하였고; BrCYS1 발현이 억제된 형질전환 식물에서는 역효과가 관찰되었다. 또한 저장된 시스템인 단백질 분해효소 활성은 형질전환 아라비도시스 내에서 BrCYS1에 의해 억제되었다.

<23> 이러한 본 발명의 형질전환 식물체의 측정 데이터를 기반으로 본 발명의 형질전환 식물체는 BrCYS1이 저장된 시스템인 단백질 분해효소 활성을 조절함으로써 종자 발아 조절이 가능함을 입증한 것이다.

<24> 1. 배추 내 종자 발아 및 모종 생장 동안 BrCYS1의 발현

- <25> 종전 본 발명자는 배추 꽃눈의 cDNA 라이브러리에서 파이토시스타틴을 암호화하는 3개의 cDNA 클론을 확인하였다. 3개의 cDNA 클론은 *BrCYS1*, -2 및 -3으로 명명되었고, 각각 수탁번호 L41355, U51119 및 AF408862로 GenBank 데이터베이스에서 발견될 수 있었다. 먼저 본 발명은 3개의 재조합 *BrCYS1* 단백질에 대한 항-*BrCYS1* 폴리클론 항체의 교차 반응성을 조사하였다. 웨스턴 블롯 분석은 항-*BrCYS1* 폴리클론 항체가 재조합 *BrCYS2*와는 교차-반응하였으나(도 1A) 재조합 *BrCYS3*과는 그렇지 않음을 나타내었다.
- <26> 다음으로 종자 발아시 *BrCYS1*의 가능한 기능을 조사하기 위해 본 발명은 항-*BrCYS1* 폴리클론 항체를 사용하여 표준 생장 조건 후 GA₄₊₇ 또는 ABA 처리로 그의 발현 패턴을 조사하였다. *BrCYS1* 및 *BrCYS2*는 유사한 발현 패턴을 나타내었고(도 1B), 이들이 배추에서 유사한 역할을 하기 때문에 다른 순계 유래의 동일한 *CYS1* 좌위의 대립 유전성 변이체를 나타내는 것으로 판단된다. 물을 이용한 발아 후 *BrCYS1* 수치는 5일 동안 점진적으로 감소하였고 6일째에 완전히 소실되었다. GA₄₊₇ 처리시 *BrCYS1* 수치는 빠르게 감소하였고 5일째에 거의 검출될 수 없는 반면 ABA 처리시 표본채취 기간 동안 다소 감소할 뿐이었고 7일째에도 계속 검출되었다. 웨스턴 블롯 분석은 *BrCYS1* 발현이 GA 및 ABA에 반응함을 나타내나 이들 파이토호르몬에 의해 직접 조절되거나 이들에 의해 조절된 단백질 분해효소에 의해 분해되는지 여부는 불분명하다.
- <27> 이러한 결과는 보리에서 카텝신(cathepsin) B-유사 시스테인 프로테아제 유전자(*CatB*)의 발현이 발아시 호분 내에서 증가되고 파이토시스타틴-암호화 유전자(*Icy*)의 발현이 감소됨을 발견한 Martinez et al.(J. Exp. Bot. 54 (2003) 951-959)에 의한 발견과 일치한다. 이들은 분리된 보리 호분의 GA 처리는 *CatB* 전사체의 항정-상태 수치를 유도하고 *Icy* 발현을 억제함을 발견하였다. 이를 함께 고려하여 이들 발견은 배추 종자 및 모종 내에서 *BrCYS1*이 발아에 조절적인 역할을 하고 시스테인 단백질 분해효소와 상호작용함을 나타낸다.
- <28> 2. *BrCYS1*의 과발현의 종자 발아 및 모종 생장 지연
- <29> 종자 발아 및 모종 생장시 *BrCYS1*의 기능을 정의하기 위해 본 발명은 야생형 아라비도시스 식물(T₀)을 *35S:BrCYS1S* 또는 *35S:BrCYS1AS*로 형질전환되었다(도 2A). T₁ 식물로부터 카나마이신을 함유한 선택 배지 상에서 24개의 독립적 센스 및 안티센스 라인을 선택하였다. PCR 분석은 각각의 선택된 식물 내 *npt II* 및 *BrCYS1* 모두의 존재를 나타내었다(데이터는 나타내지 않음).
- <30> 형질전환 식물 내 *BrCYS1* 복제수를 측정하기 위해 T₁ 식물이 자가수분되었고 자손(T₂)은 선택 배지 상에서 분리되었다. 24개 독립된 형질전환 라인 중에서 6개 라인의 자손(T₂)(센스 라인의 S1, S7 및 S8; 안티센스 라인의 AS2, AS5 및 AS6)은 카나마이신-함유 배지 상에서 3:1 비율로(저항성 대 민감성) 분리되었고, 이는 트랜스유전자가 단일 좌위에 도입되었음을 나타내었다. T₂ 라인의 자가수분 후 단일 *npt II* 및 *BrCYS1* PCR 생성물이 단일 T-DNA 삽입을 포함한 6개 독립적 T₃ 동형접합성 라인(센스 라인의 S1-3, S7-6 및 S8-5, 안티센스 라인의 AS2-9, AS5-4 및 AS6-7)으로부터 생성되었다(도 2B).
- <31> 이들 T₃ 동형접합성 라인의 로제트(rossette) 잎 및 종자 내 단백질 발현은 면역블롯에 의해 분석되었다(도 2C). 로제트 잎에서 *BrCYS1*에 상응하는 단일 23 kDa 밴드가 모든 센스 라인에서 검출되었으나 야생형 또는 안티센스 라인에서는 그렇지 않았다(도 2C, 하위 패널). 종자에서는 2개의 단백질 밴드(ca. 23 및 26 kDa)는 모든 센스 라인에서 검출되었고, 이는 항-*BrCYS1* 폴리클론 항체가 아라비도시스 내 26 kDa 파이토시스타틴 단백질과 교차-반응함을 나타내었다.
- <32> 이들 결과는 이형성 아라비도시스 식물에서 도입된 *BrCYS1*이 로제트 잎에서 발현되었고 종자 내에 축적되었음을 입증한다. 아라비도시스 파이토시스타틴(26 kDa 밴드)의 발현은 야생형 및 센스 라인과 비교시 안티센스 라인 유래의 종자에서 유의적으로 감소되었다(도 2C).
- <33> 다음으로 본 발명은 형질전환 *BrCYS1* 식물을 이용하여 발아율을 분석하였다. 각각의 센스 및 안티센스 라인이 동일한 *BrCYS1* 발현(도 2C) 및 표현형을 나타내었기 때문에 이들 6개 형질전환 라인(S1, S7, S8, AS2, AS5 및 AS6) 중에서 T₃ 동형접합성 센스(S8-5) 및 안티센스(AS5-4) 라인 유래의 종자를 반-강도 MS 배지 상에서 종자를 발아시켰다.
- <34> 센스 라인(S8-5) 종자는 야생형보다 느리게 발아된 반면 안티센스 라인(AS5-4) 종자는 다소 빠르게 발아되었다. 더욱이 센스 라인(S8-5) 모종은 동일한 단계의 야생형과 비교시 감소된 배축 및 뿌리 신장을 나타내어 생장 지연을 나타내었다(도 3B 및 C). 이와는 대조적으로 안티센스 라인(AS5-4) 모종은 야생형보다 다소 빠른 생장을

나타내었다(도 3B 및 C). 이들 데이터는 *BrCYS1*의 도입이 종자 발아 및 초기 모종 생장을 지연시킴을 나타낸다.

- <35> 발아 후 형질전환 식물의 모종은 토양에 심어졌다. 센스 라인(S8-5)의 생장은 야생형과 비교시 발육이 저지된 반면 안티센스 라인(AS5-4)은 동일한 단계에서 증가된 생장을 나타내었다. 생장의 기본 특징을 특성화하기 위해 본 발명은 동일한 배양 조건 하에서 2개의 자엽, 10개의 로제트 잎 및 2개의 줄기 잎을 생성하는 형질전환 *BrCYS1* 식물의 잎 형태를 비교하였다(도 4B). 센스 라인 S8-5에서 로제트 및 줄기 잎은 작았고 줄기 잎은 야생형 및 안티센스 라인과 비교시 더 짧은 잎자루를 지녔다. 15번째 잎이 아라비도시스의 최상의 대표가 되기 때문에 로제트 잎 표현형 분석에 선택되었다. 상세한 조사는 15번째 잎의 잎사귀 폭, 길이 및 잎자루 길이는 센스 라인 S8-5에서 감소됨을 나타내었다(도 4C). 이들 관찰은 종자 발아 및 모종 성장 상의 *BrCYS1* 과발현의 억제 효과가 성숙 식물의 발육 저지를 유발함을 나타낸다. 그러나 본 발명의 데이터는 이러한 발육 저지가 성숙 식물에 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 미치는지 여부는 나타내지 않는다.
- <36> 형질전환 아라비도시스 과발현 *BrCYS1*이 지연된 발아 및 모종 생장을 나타내었기 때문에 본 발명은 이들 종자의 발아가 GA 또는 ABA에 의해 영향을 받는 가능성을 조사하였다. 본 발명은 다양한 농도의 GA₄₊₇ 및 ABA 존재시 야생형 및 형질전환 종자 내 발아율을 분석하였다.
- <37> GA₄₊₇ 존재시 센스 라인 S8-5 종자는 야생형 또는 안티센스 라인 AS5-4 종자보다 낮은 발아율을 나타내었다(도 5A). 50% 발아에 도달하기 위해 센스 라인은 야생형보다 10배 더 높은 농도의 GA₄₊₇을 필요로 하고; 안티센스 라인은 야생형보다 10배 더 낮은 농도의 GA₄₊₇을 필요로 하였다. 100 nM 농도의 GA₄₊₇의 존재시 1일째에 약 95%의 야생형 및 안티센스 라인 AS5-4 종자가 발아한 반면 센스 라인 S8-5 종자의 80%만이 발아하였다(도 5B). *BrCYS1* 트랜스유전자를 지닌 아라비도시스 식물의 발아율은 GA₄₊₇ 농도 증가시 다소 증가되었다(도 5A). 이들 결과는 센스 라인 종자의 부분적인 GA-둔감성 발아 표현형을 나타낸다.
- <38> ABA의 존재시 흡수 1일 후 발아율은 야생형 또는 안티센스 라인 AS5-4보다 센스 라인 S8-5에서 더 낮았다(도 5C). 1 μ M ABA에서 80%의 야생형 종자가 3일 이내에 발아하였으나 센스 라인 S8-5의 발아 성공은 단지 55%이었다(도 5D). 이러한 결과는 아라비도시스 내에서 *BrCYS1*의 과발현이 종자 발아가 ABA에 어느 정도 과민성을 나타내게 함을 암시한다.
- <39> 따라서 *BrCYS1* 트랜스유전자를 발현하는 아라비도시스 종자는 GA 및 ABA 존재시 지연된 종자 발아를 유지하였다. 이는 *BrCYS1*의 대규모 축적이 발아에 저해성 효과를 지님을 나타낸다. *BrCYS1*이 발아 동안 저장 단백질의 동원에 중요한 역할을 하는 저장된 시스테인 단백질 분해효소를 저해하는 것이 가능하다.
- <40> 3. *BrCYS1*의 과발현의 종자 발아 동안 저장된 시스테인 단백질 분해효소 활성 저해
- <41> 시스테인 단백질 분해효소는 발아 동안 대부분의 종자 저장 단백질의 가수분해를 유발하고 그의 활성은 파파인(papain)-유사 시스테인 엔도단백질 분해효소의 저해제에 의해 조절된다. 일부 연구자들은 종자에서 파이토시스타틴을 분리하였고 이들이 저장된 시스테인 단백질 분해효소를 타겟함을 수립하였다. 그러나 파이토시스타틴이 종자 발아를 저해하는 기작은 생체 내에서 아직 완전히 이해되지 않았다. 이러한 관점에 있어서, 본 발명은 *BrCYS1*을 과발현하는 형질전환 식물이 지연된 종자 발아를 나타냈기 때문에 *BrCYS1*이 저장된 시스테인 단백질 분해효소 활성을 저해한다는 가능성을 고려하였다.
- <42> 따라서 본 발명은 형질전환 식물 종자 내 및 종자 발아 동안 내인성 시스테인 단백질 분해효소 활성을 측정하고 정량화하였다(도 6). 센스 라인 종자에서 내인성 시스테인 단백질 분해효소 활성은 야생형 또는 안티센스 라인보다 더 낮았다. 발아 후 내인성 시스테인 단백질 분해효소 효소 활성은 센스 라인에서 다소 증가되었으나 이러한 효소 활성은 야생형 및 안티센스 라인보다 더 낮았다.
- <43> 이러한 다소 낮은 시스테인 단백질 분해효소 효소 활성은 *BrCYS1* 측정에 의한 센스 라인 내 지연된 발아에 의해 유발된 것이다. 이는 *BrCYS1* 과발현이 발아, 지연된 발아 및 초기 모종 성장 동안 저장된 시스테인 단백질 분해효소 활성의 감소를 유발함을 나타낸다. 이는 *BrCYS1*이 생체 내 저장된 시스테인 단백질 분해효소의 조절 및 발아율 조절시 중요한 역할을 함을 나타내는 첫 번째 결론적 증거이다.
- <44> 도 1B 및 2C에서 본 발명은 야생형 배추 및 아라비도시스가 성숙 잎에서 파이토시스타틴을 발현하지 않았으나 아라비도시스 내 *BrCYS1*의 구성적 발현은 잎 생장에 음성적인 영향을 미쳤음을 나타내었다(도 4). 따라서 성장 및 발달의 조절과 같은 다른 생리적 기능을 지닌 식생 발달 동안 내인성 시스테인 단백질 분해효소 작용의 억제가 존재함이 가능하다. 이를 확인하기 위해 배추 내 다양한 내인성 시스테인 단백질 분해효소와 *BrCYS1*의 상호

작용을 정의하는 것이 필요하다.

- <45> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <46> (실시예 1) 종자 발아 및 모종 생장 동안 *BrCYS1* 발현
- <47> 본 발명에 사용된 *BrCYS1* cDNA(GenBank 수탁번호 L41355) 클론은 배추 꽃눈 cDNA 라이브러리에서 확인되었다. 발아-관련 파이토호르몬에 반응한 발아 동안 *BrCYS1* 발현을 조사하기 위해 건조 배추 종자는 10 μ M GA₄₊₇ 또는 ABA(Sigma, St. Louis, MO)로 습윤되거나 그렇지 않은 여과지를 포함한 15 cm 페트리 접시 내에 놓였다. 4℃에서 3일간 인큐베이션 후 발아는 25℃ 내 백색광 16시간 및 22℃ 내 암조건 8시간으로 조절된 배양실 내에서 개시되었다. 발아된 종자는 7일간 인큐베이트되었고; 표본은 이러한 기간에 걸쳐 수집되었다. *BrCYS1* 발현 패턴은 제조사의 지침에 따라 공지된 바와 같이 항-*BrCYS1* 폴리클론 항체(1:50000 희석) 후 퍼옥시다제-권주게이트 염소 항-토끼 IgG(1:50000 희석, Sigma)를 사용한 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정되었다. 단백질 밴드의 혼성화는 ECL 시스템(Amersham Biosciences, Amersham, 영국)을 이용하여 검출되었다.
- <48> (실시예 2) 형질전환 아라비도프시스의 발아
- <49> 본 발명자는 *BrCYS1*의 발현이 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터(35S-P)의 조절 하에서 존재하는 컨스트럭트를 생성하였다. *BrCYS1*의 cDNA의 0.76 kb BamHI 단편은 pBI121(Clontech, Palo Alto, CA) 내의 CaMV 35S-P와 노팔린 신타제 터미네이터(nopaline synthase terminator)(*nos-ter*) 사이에 센스(*BrCYS1-S*) 및 안티센스(*BrCYS1-AS*) 방향으로 삽입되었다(도 2). 재조합 플라스미드는 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 내로 도입되었다. 형질전환된 아라비도프시스(*Arabidopsis thaliana* 생태형 Col-0) 식물은 이들 재조합 플라스미드를 포함한 아그로박테리움을 이용한 플로랄 딥(floral dip) 방법에 의해 획득되었다. 단일 T-DNA 삽입을 포함한 동형접합성 T₃ 라인인 Moon et al.(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (2003) 358-363)에 의해 기술된 바와 같이 유도되었고, 높은 수치의 *BrCYS1* 발현을 지닌 식물이 실험에 선택되었다. 이들 식물은 장일 광주기(16시간 광) 조건으로 주간에는 23℃로, 야간에는 21℃로 유지되었다.
- <50> (실시예 3) 형질전환 식물의 활성 측정
- <51> 형질전환 라인 및 자손 모두에서 트랜스유전자의 존재를 확인하기 위해 Fulton et al.(Plant Mol. Biol. Rep. 13 (1995) 207-209)에 의해 기술된 바와 같이 *npt*(5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3'(서열번호: 1) 및 5'-ATCGGGAGCGCGGATAACGTA-3'(서열번호: 2)) 및 *BrCYS1*(전방 5'-TGATCGCTACTTCCTGCAAC-3'(서열번호: 3); 역방 5'-TTAGTAGTAGCATCAGAAG-3'(서열번호: 4)) 특정 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 94℃에서 1분간, 55℃에서 1분간 및 72℃에서 1분간의 35회 사이클 후 72℃에서 10분간 최종 연장을 이용하여 수행되었다.
- <52> 형질전환 식물 내 *BrCYS1* 발현을 확인하기 위해 잎 및 종자는 얼음 상의 추출 완충액(50 mM 인산나트륨 [pH 6.0], 20 mM NaCl) 내에서 분쇄되었고, 용해질은 원심분리되었고(12,000 rpm, 4℃, 15분) 상청액은 12.5% SDS-PAGE로 분리되었다. 단백질 밴드는 상기 기술된 바와 같이 웨스턴 블롯팅에 의해 검출되었다.
- <53> (실시예 4) 발아 분석
- <54> 동일한 실험 조건이 많은 종자의 비교에 사용되었다. 성숙 장각이 동일한 날에 채취되었고 실온에 보관되었다. 발아 분석을 위해 멸균된 종자가 슈크로스 및 비타민이 부재한 0.8% 파이토아가로 응고된 반-강도 MS 배지 상에 놓였고 장일 조건 하에서 23℃ 배양실로 옮겨지기 전에 3일간 4℃에서 프라임되었다. 발아율은 어린 뿌리의 출현 후 계산되었다. 모종 생장 비교를 위해 식물은 배축 및 뿌리 길이 측정 전 7일간 인큐베이트되었다.
- <55> 본 발명은 처리 당 150~200개 종자의 발아율을 측정함으로써 종자 발아 상의 파이토호르몬 GA 및 ABA의 효과를 측정하였다. 이들은 100 nM GA₄₊₇(Duchefa, Haarlem, 네덜란드) 또는 1 μ M ABA(혼합 이성질체; Sigma)를 함유한 생장 배지 상에서 3반복으로 심어졌다. 특정 GA₄₊₇ 또는 ABA 농도(10^{-9} ~ 10^{-5} M)에서 발아율의 직접적 비교를 위해 각각의 파이타트레이(phytatrays)가 세분되고 비교되는 모든 종자 라인은 동일한 파이타트레이 상에 심어졌다.
- <56> (실시예 5) 내인성 시스테인 단백질 분해효소 활성의 측정
- <57> 종자 발아 및 모종 생장 동안 내인성 시스테인 단백질 분해효소 활성이 *BrCYS1*의 구성적 과발현에 의해 저해되는지 여부를 측정하기 위해 본 발명은 소수 변형으로 He and Hermode(Plant Mol. Biol. 52 (2003) 729-744)에

따라 시스테인 단백질 분해효소 활성 측정을 수행하였다. 단백질은 4℃에서 추출 완충액(50 mM 인산나트륨 [pH 6.0], 20 mM NaCl, 1 μM β -머캅토에탄올 및 0.1% Triton X-100)을 포함한 유리 균질화기 내에서 분쇄함으로써 형질전환 식물 종자에서 추출되었다. 용해성 단백질은 원심분리(12,000 rpm, 4℃, 15분)에 의해 회수되었다. 상청액은 청결한 시험관으로 옮겨졌고 단백질 농도는 표준물질로서 우혈청 알부민을 이용한 Bradford 단백질 분석 키트(BioRad, Hercules, CA)를 이용하여 측정되었다. 내인성 시스테인 단백질 분해효소 활성은 색소원 기질로서 α -N-벤조일-DL-아르기닌-2-나프틸아민(BANA; Sigma)를 사용하여 측정되었다. 반응은 200 μL 의 단백질 추출물 및 200 μL 의 1 mM BANA를 사용하여 수행되었고 37℃에서 20분간 인큐베이트된 후 2% (v/v) HCl/에탄올 1 ml로 처리되었다. 착색된 생성물은 0.06% (v/v) p-디메틸-아미노신남알데하이드(Sigma)/에탄올의 첨가로 현상되었고 540 nm에서 흡광도가 측정되었다. 반응 속도는 $\Delta_{A540} \text{ ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 표기되었다.

<58> (실시예 6) 젤라틴-PAGE를 이용한 내인성 시스테인 단백질 분해효소 활성의 분석

<59> 아라비도시스 내 *BrCYS1*의 구성적 과발현이 종자 내 내인성 시스테인 단백질 분해효소 활성 감소를 유도하는지 여부를 측정하기 위해 본 발명은 He and Hermode(Plant Mol. Biol. 52 (2003) 729-744)에 기술된 바와 같이 전기영동 분석을 수행하였다. 상기 기술된 바와 같이 제조된 비가열 단백질 일정량(10 μg)은 젤라틴/PAGE 로딩 완충액(50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 10% (v/v) 글리세롤, 2% (w/v) SDS 및 0.01% (w/v) 브로모페놀 블루)에 첨가되었고 0.1% (v/v) 젤라틴(소 피부 유래 타입 B, Sigma)을 함유한 10% SDS-PAGE 겔 내 4℃에서 분리되었다. 전기영동후 겔은 2.5% Triton X-100 내에서 1시간 동안 복원된 후 50 mM 아세트산나트륨(pH 5.5) 및 5 mM DTT 내의 37℃에서 밤새(16~20시간) 전개되었다. 활성은 쿠마시 블루로 겔을 염색한 후 0.25% 아세트산을 함유한 25% 메탄올 내에서 탈색함으로써 검출되었다.

발명의 효과

<60> 본 발명의 효과는 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 유래 파이토시스타틴 *BrCYS1*이 종자 발아 동안 저장 단백질의 단백질 가수분해에 관련된 저장된 시스테인 단백질 분해효소의 음성적 조절제임을 확인하고 이형적 형질전환 아라비도시스 시스템 내의 발현을 측정하여 상기 파이토시스타틴 *BrCYS1*으로 형질전환된 식물을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 항-*BrCYS1* 폴리클론 항체를 이용한 외인성 발현 및 내인성 *BrCYS1*의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 것이다. 도 1A는 정제된 재조합 *BrCYS*의 면역블롯 검출을 나타낸다. 3개 *BrCYS* cDNA의 코딩 영역은 6× His-태그된 재조합 단백질로서 대장균 내 그의 발현을 가능하게 하는 플라스미드 pRSET 내로 클론되었다. 정제된 재조합 *BrCYS*는 15% SDS-PAGE(좌측 패널) 및 웨스턴 블롯팅(우측 패널) 분석되었다. 레인: 레인 1, *BrCYS1*; 레인 2, *BrCYS2*; 레인 3, *BrCYS3*. 분자량 마커는 각 패널의 좌측에 나타나 있다(레인 M). 도 1B는 배추 종자의 발아 동안 파이토호르몬에 반응한 *BrCYS1* 및 *BrCYS2* 발현의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 총 단백질은 나타낸 시점(충화 후 일자, das)에서 물(상단 패널), 10 μM GA₄₊₇(중간 패널) 또는 10 μM ABA(하단 패널)으로 처리된 종자에서 제조되었다.

<2> 도 2는 형질전환 아라비도시스 식물 내 *BrCYS1*의 발현을 나타낸 것이다. 도 2A는 *BrCYS1*의 발현을 위한 35S:*BrCYS1S* 컨스트럭트의 구조를 나타낸다. 노팔린 신타제 유전자 프로모터(*nos-pro*) 및 3'-터미네이터(*nos-ter*)에 의해 조절되는 박테리아성 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 II(*npt II*)을 암호화하는 유전자는 아라비도시스 형질전환에 대한 선택 마커로 작용한다. *BrCYS1*은 CaMV 35S 프로모터(35S-P)에 의해 조절된다. LB 및 RB는 각각 좌측 및 우측 T-DNA 경계를 나타낸다. 도 2B는 대조군 및 형질전환 아라비도시스의 PCR 분석을 나타낸다. *npt II*(상단 패널) 및 *BrCYS1*(하단 패널)의 존재는 유전자-특이적 프라이머를 이용한 PCR 증폭에 의해 검증되었다. 레인: M, 분자 크기 마커; N, 음성적 대조군(이중-중류수); V, 35S:*BrCYS1S* 벡터; WT, 형질전환되지 않은 야생형; 레인 1-3, 센스 라인 S1-3, S7-6 및 S8-5; 레인 4-6, 안티센스 AS2-9, AS5-4 및 AS6-7. 화살촉 표시는 *npt II* 및 *BrCYS1* 앰플리콘(amplicon)의 위치를 나타낸다. 도 2C는 형질전환 식물의 로제트 잎(상단 패널) 및 종자(하단 패널) 내 *BrCYS1*의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. WT, 형질전환되지 않은 야생형; 레인 1-3, 센스 라인 S1-3, S7-6 및 S8-5; 레인 4-6, 안티센스 AS2-9, AS5-4 및 AS6-7.

<3> 도 3은 형질전환 *BrCYS1* 식물 내 발아 및 모종 생장의 비교를 나타낸 것이다. 도 3A는 형질전환되지 않은 야생형(WT), 센스(S8-5) 및 안티센스(AS5-4) 라인의 신선하게 채취된 종자에 대한 증화후 일자(das)의 시간 경과에 따른 발아를 나타낸다. 각 실험에 사용된 종자는 동일한 종자 배치에서 유래하였다. 유사한 발아 동력학이 3개

의 독립된 실험에서 획득되었다. 도 3B는 WT, S8-5 및 AS5-4 라인의 모종 생장을 나타낸다. 사진은 5일에 촬영되었다. 바 = 1 cm. 도 3C는 각 라인 내 12개 식물의 배측(좌측 패널) 및 뿌리(우측 패널) 길이를 나타낸다. 식물은 대조군 배지에서 성장되었고 5일 후 계산되었다. 데이터는 3회 이상의 독립적 실험 유래의 평균 $\pm$ 표준편차를 의미한다. WT, 형질전환되지 않은 야생형; S8-5, 센스; AS5-4, 안티센스.

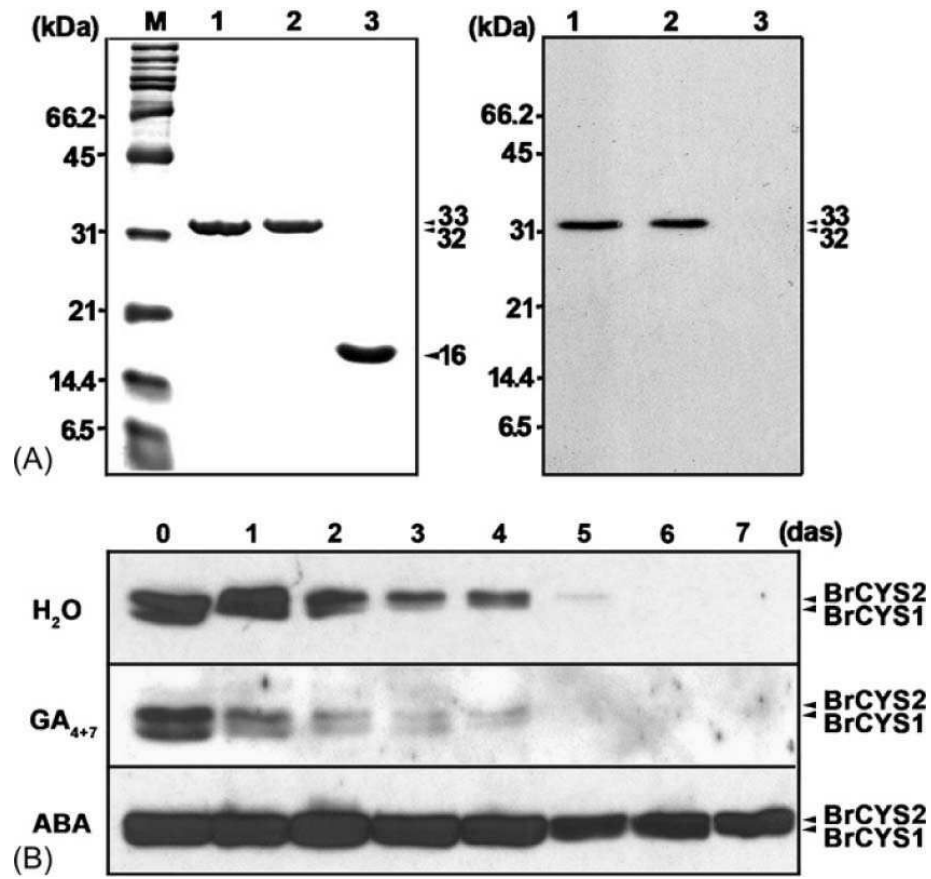
<4> 도 4는 형질전환 *BrCYS1* 식물의 표현형을 나타낸 것이다. 도 4A는 동일한 연령에서 토양-생장된 식물의 비교를 나타낸다. 모종은 동일한 펠트리 접시에서 5일간 성장된 후 토양에 이식되어 22일 후 촬영되었다. 센스(S8-5) 라인의 전체-식물 형태는 약간의 발육 저지를 나타내었다. 안티센스(AS5-4) 라인은 긴 추대를 나타내었고 개화를 시작한 반면 대부분의 야생형 및 S8-5 라인 식물은 추대현상을 개시하기 시작하였다. 도 4B는 WT, S8-5 및 AS5-4 라인의 잎 형태를 나타낸다. 각 라인 유래 잎은 일렬로 진열되었다. 좌측에서 우측으로: 2개의 자엽, 10개의 로제트 잎 및 2개의 줄기 잎. 잎은 충분히 신장된 후 수집되었다. 도 4C는 초생 개시부터 전체 신장까지 WT, S8-5 및 AS5-4 라인 유래 4주령 15번째 로제트 잎의 크기를 나타낸다. 모든 측정은 각 라인의 > 12 표본 상에서 수행되었다. 데이터는 3회 이상의 독립적 실험 유래의 평균 $\pm$ 표준편차를 의미한다. WT, 형질전환되지 않은 야생형; S8-5, 센스; AS5-4, 안티센스. 바 = 1 cm.

<5> 도 5는 형질전환 *BrCYS1* 식물 내 종자 발아 상의 GA_{4+7} 및 ABA의 효과를 나타낸 것이다. 도 5A는 $GA_{4+7}(10^{-9} \sim 10^{-5}$ M) 존재시 1일째에 계산된 발아 백분율을 나타낸다. 도 5B는 100 nM GA_{4+7} 존재시 야생형 및 형질전환 식물 종자의 시간 경과에 따른 발아를 나타낸다. 데이터는 3회 이상의 독립적 실험 유래의 평균 $\pm$ 표준편차를 의미한다. WT, 형질전환되지 않은 야생형; S8-5, 센스; AS5-4, 안티센스. 도 5C는 $ABA(10^{-9} \sim 10^{-5}$ M) 존재시 1일째에 계산된 발아 백분율을 나타낸다. 도 5D는 1 μ M ABA 존재시 야생형 및 형질전환 식물 종자의 시간 경과에 따른 발아를 나타낸다. 데이터는 3회 이상의 독립적 실험 유래의 평균 $\pm$ 표준편차를 의미한다. WT, 형질전환되지 않은 야생형; S8-5, 센스; AS5-4, 안티센스.

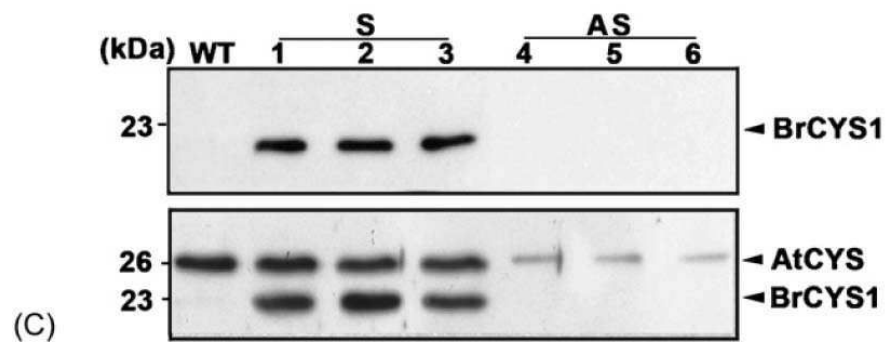
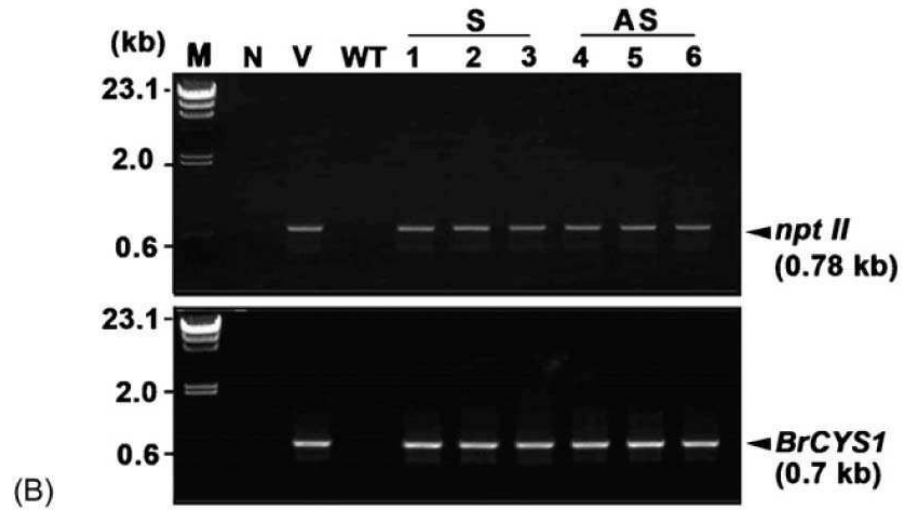
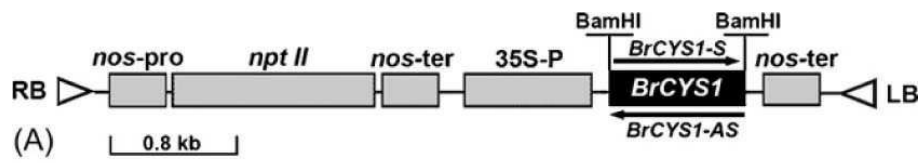
<6> 도 6은 발아 동안 및 그 후 형질전환 *BrCYS1* 종자 내 내인성 시스테인 단백질 분해효소 활성의 측정을 나타낸 것이다. 도 6A는 종자 발아 및 모종 성장 동안 내인성 시스테인 단백질 분해효소 활성의 분석을 나타낸다. 1 mM BANA가 기질로 사용되었다. 내인성 시스테인 단백질 분해효소 활성은 다른 단계의 종자에서 추출된 단백질에서 측정되었다. 0, 건조 숙성 종자; 1-3, 발아 배지 상에서 1~3일간 인큐베이트된 건조 숙성 종자. 데이터는 3회 이상의 독립적 실험 유래의 평균 $\pm$ 표준편차를 의미한다. WT, 형질전환되지 않은 야생형; S8-5, 센스; AS5-4, 안티센스. 도 6B는 인-겔(in-gel) 단백질 분해효소 활성 분석을 나타낸다. 다른 단계의 형질전환 식물 종자에서 제조된 단백질 추출물(10 μ g)은 0.1% 젤라틴 존재하의 SDS-PAGE 상에서 분리되었다. 0일, 건조 숙성 종자; 2일, 발아 배지 상에서 2일간 인큐베이트된 건조 숙성 종자. 화살촉 표시는 저해된 단백질 분해효소 활성을 나타낸다. WT, 형질전환되지 않은 야생형; S8-5, 센스; AS5-4, 안티센스.

도면

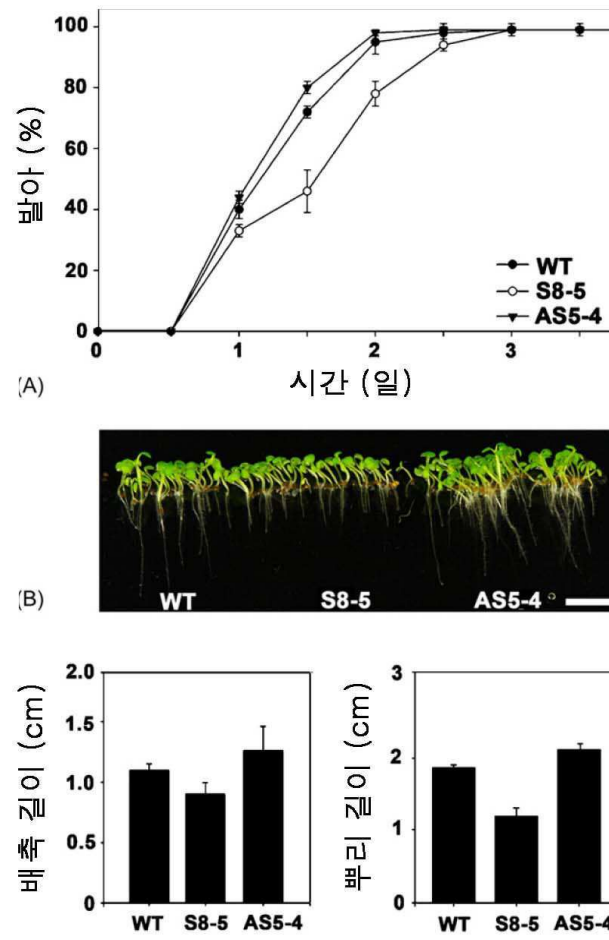
도면1



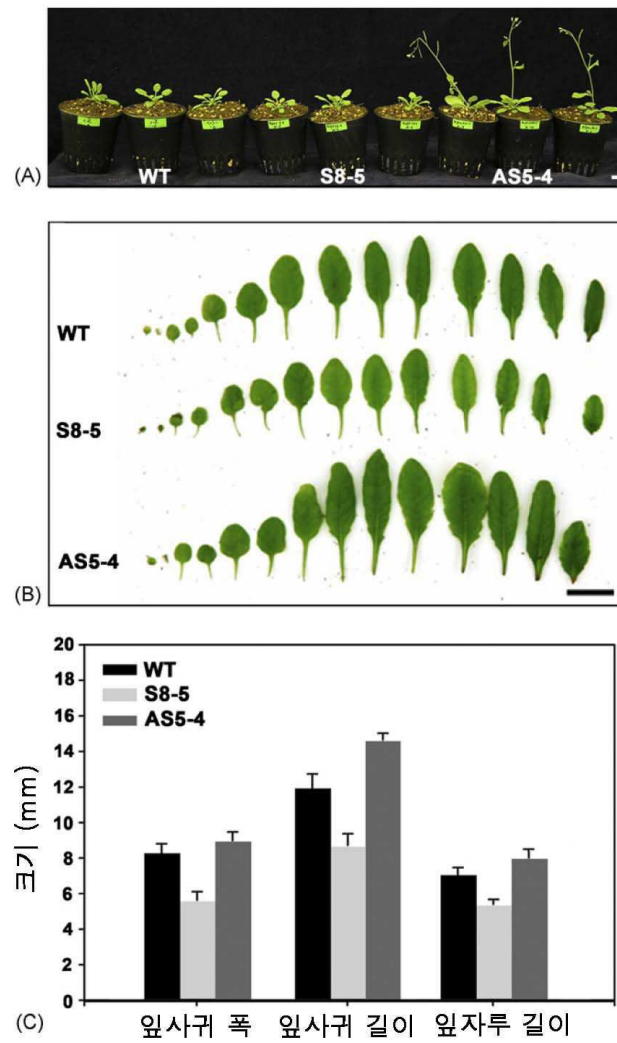
도면2



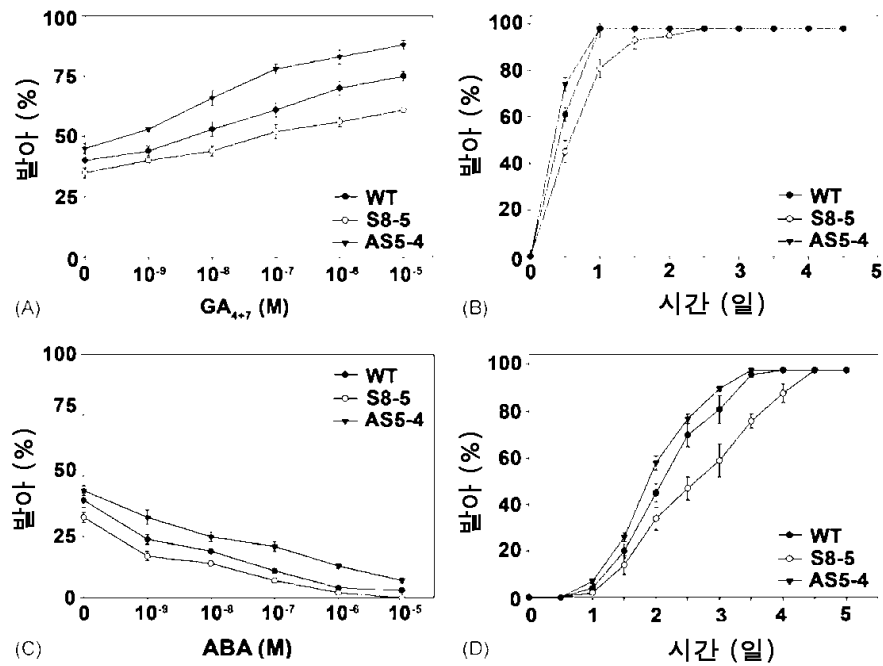
도면3



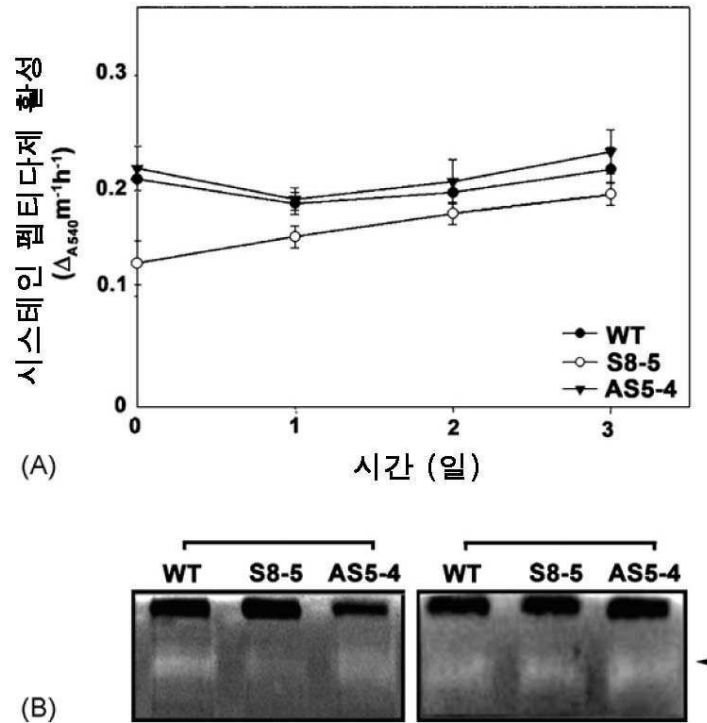
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> Transgenic plant for retardation of seed germination and

inhibition of cysteine peptidase activity by over-expression of
phytoecystatin gene

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 1

gaggctattc ggctatgact g

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

atcgggagcg gcgataacgt a

21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

tgatcgctac ttctgcaac

20

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 4
ttagtagtag catcagaag

19