

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0128182

(43) 공개일자 2024년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)*A01H 6/46* (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8231 (2013.01)*A01H 5/10* (2022.05)

(21) 출원번호 10-2023-0020943

(22) 출원일자 2023년02월16일

심사청구일자 2023년02월16일

(71) 출원인

부산대학교 산학협력단

부산광역시 금정구 부산대학교로63번길 2 (장전동, 부산대학교)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김유진

경상남도 밀양시 삼랑진읍 삼랑진로 1268-50

정기홍

경기도 수원시 영통구 영통로154번길 56

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인정진

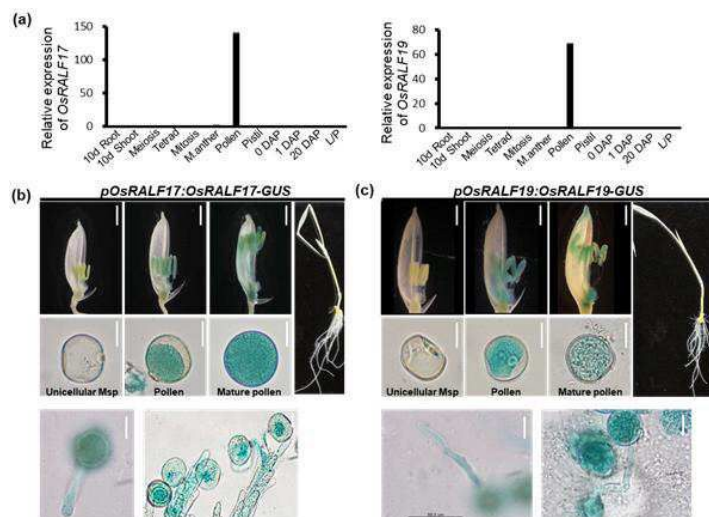
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 벼 유전자 유래 화분 특이적 발현 프로모터 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 화분 특이적 발현을 보이는 벼 유전자 유래 프로모터에 대한 것으로, 본 발명에 따른 프로모터를 포함하는 벡터를 이용하여 형질전환된 벼 식물체는 특이적으로 화분에서만 유전자 발현을 보이는 바, 이를 이용해 벼를 포함하는 주요 곡물 내지 단자엽 식물체의 화분 발달의 개선 또는 융성불임 식물체의 육성을 통한 생산성 증대 작물을 육성하는데 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A01H 6/4636 (2022.05)

C12N 15/8289 (2013.01)

김지현

경상남도 밀양시 삼랑진읍 삼랑진로 1268-50

(72) 발명자

김의정

경기도 용인시 수지구 풍덕천로 76, 909동 804호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711142938
과제번호	2019R1C1C1002636
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	작물 생산량 증가를 위한 벼 화분관 발달 조절 연구
과제수행기관명	부산대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395072806
과제번호	PJ01661002
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대농작물신육종기술개발사업
연구과제명	유전자교정 기술을 이용한 벼 변이집단 개발 및 분석 거점 구축(2공동)
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711197931
과제번호	00217064
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	작물 반수체 유도 · 기작규명 기초연구실
과제수행기관명	부산대학교산학협력단
연구기간	2023.06.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 식물의 화분 특이적 발현 프로모터.

청구항 2

제 1항에 따른 프로모터를 포함하는 식물의 화분 특이적 발현 벡터.

청구항 3

제 2항의 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포.

청구항 4

제 2항의 발현 벡터 또는 상기 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포로 형질전환된 식물체.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 식물체는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환된 식물체.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 단자엽 식물은 벼, 갈대, 옥수수, 잔디, 보리, 밀, 조, 수수, 귀리, 호밀, 사탕수수, 피, 대나무, 강아지풀, 난, 갈대, 부들, 억새풀, 마늘, 튼립, 군자란, 붓꽃, 백합, 기장, 울무, 바랭이, 달개비, 범부채, 용설란, 홍죽, 관음죽, 산마늘, 꽃제비, 비짜루 및 박새로 이루어진 군 중에 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 형질전환된 식물체.

청구항 7

제 4항의 형질전환 식물체의 종자.

청구항 8

제 1항에 따른 화분 특이적 발현 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 식물체에 도입하는 단계;를 포함하는 화분 특이적 발현을 보이는 식물 형질전환체의 제조 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 벡터가 도입되어 화분에서 특이적으로 유전자가 발현되는 식물 형질전환체를 선별하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 10

제 1항에 따른 화분 특이적 발현 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 식물체에 도입하는 단계;를 포함하는 식물체 화분 특이적으로 외래 유전자를 발현시키는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 외래 유전자 발현은 화분 발달 중기 내지 후기 단계에 유도되는 것을 특징으로 하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벼 유전자 유래 화분 특이적 발현을 보이는 프로모터 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 벼(*Oryza sativa* L.)는 세계에서 가장 중요한 식량작물의 하나로 과거 20여년 동안 꾸준히 수량 증대에 힘써왔다. 그러나 벼가 재배되는 농지는 세계 각국의 공업화현상으로 갈수록 줄어들고 육종의 소재가 되는 새로운 유전자원은 고갈되어 외래 유용유전자의 도입이 요구되고 있다. 다행히 분자생물학의 발달로 외래 유용유전자의 분리 및 조작이 가능하게 되어 유용 유전자를 벼를 비롯한 많은 식물세포에 형질전환하여 새로운 유전자가 조합된 형질전환체를 얻음으로서 여러 가지 생명현상을 규명하는 유전자발현 연구는 물론 육종의 좋은 소재가 되고 있다.

[0004] 이러한 형질전환을 이용한 신품종 생산은 고부가가치 산업으로 대두됨은 물론이며 인류의 가장 큰 문제점으로 부각되는 식량문제 해결에 기여할 수 있을 것으로 예상된다.

[0005] 현재까지 알려진 형질전환 방법에 있어서, 80년대에는 원형질체에 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol, PEG)과 전기충격법(electroporation)으로 형질전환하는 방법이 이용되었다. 90년대 후반에는 유전자총 이용법이 보편화되었으며 최근에는 쌍자엽식물에서 널리 이용되어 왔던 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 이용법도 많이 이용되고 있다. 그밖에 화분관법(pollen tube pathway), 미세주사(microinjection) 방법 등이 있다.

[0006] 프로모터(promoter)는 형질전환 목적에 따라 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신 또는 특별한 조직에만 국한시킬 수 있으며, 그 기능에 따라서 다음과 같이 분류할 수 있다.

[0007] 첫째로 전신발현 유도 프로모터를 들 수 있다. 식물 전신발현 유도 프로모터로는 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus, CaMV)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 쌍떡잎식물용 프로모터로 사용되고 있다. 벼 등의 외떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자 프로모터들이 주로 이용되어 왔으며, 최근 벼 시토크롬 C 유전자(OsOcl)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다(한국등록번호 제10-0429335 참고). 이들은 식물형질전환 기본 운반체 내에 선발마커로 이용되는 항생제나 제초제 저항성 유전자 및 리포터 유전자의 발현을 유도하기 위해 이미 내재되어 있으며, 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체 내 기능을 밝히고자 시도할 때 우선적으로 고려되는 프로모터들이다.

[0008] 둘째로, 종자 특이적 프로모터를 들 수 있다. 대표적인 예로서 벼 주요 저장 단백질 유전자의 프로모터들로서 황금쌀(golden rice) 개발에 사용된 벼 글루테린(glutelin) 프로모터가 현재까지 외떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는 경우에 많이 사용되고 있다. 쌍떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는데 주로 사용되는 프로

모터로는 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 및 애기장대의 종자에서 감마 토코페롤 메틸기 전이효소(γ -tocopherol methyl transferase, γ -TMT) 유전자 발현을 유도함으로써 비타민 E 생성을 증진시킨 연구에 사용된 당근 유래 DC-3 프로모터, 들깨 유래 올레오신(oleosin) 프로모터의 종자 특이발현 유도에 대한 특허(한국등록특허 제10-0685520 참고)가 있다. 상기 종자 특이적 프로모터들은 주로 종자 자체가 식량이나 식품 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 작물에서 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 주로 사용되고 있다.

[0009] 셋째로, 뿌리 특이 발현 프로모터이다. 애기장대 퍼옥시다제(oxidase, prxEa)가 분리되어 뿌리 특이적 발현을 확인하였고, 최근 고구마 유래의 매즈 유전자(ibMADS)와 당 유도성 에이디피 글루코즈 파이로포스파타제(ADP-glucose pyrophosphatase, AGPase) 유전자가 분리되어 해당 프로모터가 뿌리에서 특이 발현을 유도하며 당근, 무에서 뿌리 특이적 일시적 발현을 유도함을 확인한 기술(한국등록특허 제10-0604186호, 제 10-0604191호 참고)이 있다.

[0010] 넷째로 잎 등의 기타 조직 특이 프로모터를 들 수 있다. 잎 등의 광합성 조직에서만 강력한 유전자의 발현을 유도하는 벼와 옥수수 유래의 알비씨에스(ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit, rbcS) 프로모터, 아그로박테리움 유래의 식물 뿌리 발현을 유도하는 RoID 프로모터, 감자 유래 괴경 특이 발현 유도 파타틴(patatin) 프로모터, 토마토 유래의 과일 성숙 특이 발현 유도 피디에스(phytoene synthase, PDS) 프로모터 등이 있다.

[0011] 한편, 성숙 화분으로의 발달 과정은 웅성 배우자를 만드는 식물의 생식세대에 속하고 비교적 짧은 주기이나 종자식물의 존재 여부에 근간이 되는 중요한 생물학적 과정이며, 이러한 발생과정에 관여하는 유전자들은 농업적 활용도가 매우 크다. 특히, 화분 조직에서만 특이적으로 발현하는 프로모터를 포함하는 형질전환용 벡터를 제작함으로써 화분의 활성이 증가된 형질전환체를 육성하는데 이용될 수 있다. 이와 같은 방식으로 육성된 개체는 벼를 비롯한 주요작물에서 화분의 활성을 증가 생산성을 증대시키는 등 농업적 활용도가 매우 크다.

[0012] 하지만 다른 조직 특이적 프로모터와 대비하여 화분 특이적으로 작용할 수 있는 프로모터에 관한 연구가 매우 부족한 실정이다. 화분의 발달은 온도와 밀접한 관계를 맺고 있으며 특히 저온 또는 고온에서는 화분의 발달이 저해된다. 현대는 지구의 기후변화로 인해 작물이 고온이나 이상 저온에 노출될 위험이 크며 그로 인해 화분 발달 장애로 인한 생산성 감소가 발생할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 화분에서의 유전자 발현을 조절할 수 있는 프로모터의 개발은 중요하다. 그러므로 개발자의 의도에 따라 보다 정밀하게 화분에서의 발현을 조절할 수 있는 새로운 프로모터에 대한 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명자들은 식물의 화분에서만 특이적으로 발현되는 프로모터에 대해 연구하던 중, 벼 *Os01g10470* 또는 *Os05g11330* 유전자 유래 프로모터 및 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제작하여 이를 식물체에 형질전환시킨 결과, 상기 외래 유전자가 꽃밥을 비롯한 다른 조직에서는 발현되지 않고 화분에서만 특이적으로 발현됨을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0015] 따라서 본 발명의 목적은 식물의 화분 특이적 발현 프로모터를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 식물의 화분 특이적 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 형질전환된 형질전환 세포를 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 형질전환 식물체의 종자를 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 화분 특이적 발현을 보이는 식물 형질전환체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은 식물체 화분 특이적으로 외래 유전자를 발현시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0023] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 식물의 화분 특이적 발현 프로모터를 제공한다.
- [0024] 또한 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 프로모터를 포함하는 식물의 화분 특이적 발현 벡터를 제공한다.
- [0025] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포를 제공한다.
- [0026] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 발현 벡터 또는 상기 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포로 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0027] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 형질전환 식물체의 종자를 제공한다.
- [0028] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 화분 특이적 발현 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 식물체에 도입하는 단계;를 포함하는 화분 특이적 발현을 보이는 식물 형질전환체의 제조 방법을 제공한다.
- [0029] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 화분 특이적 발현 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 식물체에 도입하는 단계;를 포함하는 식물체 화분 특이적으로 외래 유전자를 발현시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명에 따른 벡 유전자 유래 프로모터를 포함하는 벡터를 이용하여 형질전환된 벡 식물체는 특이적으로 화분에서만 유전자 발현을 보이는 바, 이를 이용해 벡를 포함하는 주요 곡물 내지 단자엽 식물체의 화분 발달의 개선 또는 융성불임 식물체의 육성을 통한 생산성 증대 작물을 육성하는데 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 본 발명의 벡 유전자 유래 프로모터를 포함하는 벡터의 벡터맵이다.
- 도 2는 본 발명의 벡 유전자 유래 화분 특이적 발현 프로모터를 포함하는 발현 벡터의 벡터맵이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 벡 유전자 유래 프로모터 및 GUS(beta-glucuronidase)를 포함하는 벡터를 이용하여 형질전환된 벡 식물체에서의 발현을 qRT-PCR 분석(도 3(a)) 및 GUS 염색(도 3(b) 및 도 3(c))을 이용하여 확인한 결과이다. 도 3(a)에 있어 상대적인 발현량은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 참조 유전자 *OsUbi5*(*Os01g22490*)을 이용하여 산출하였다. 발현 값은 세 가지 생물학적 복제의 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시하였다. 더불어 도 3(b)에 있어 Msp는 소포자(Microspore)를 의미한다. 도 3(c)의 하얀색 바(bar)에 있어서, 꽃의 경우 2cm를 의미하고, 화분립(pollen grain)에 있어 20 μ m를 의미한다.
- 도 4는 본 발명에 따른 벡 유전자 유래 프로모터를 포함하며, RFP(red fluorescent protein)를 발현하는 벡터로 형질전환된 벡 식물체 화분립의 공초점(confocal) 이미지이다. 도 4(a) 및 도 4(b)는 화분립에서의 *OsRALF17* 발현을 확인한 결과이고, 도 4(c)는 화분관(pollen tube)에서의 *OsRALF17* 발현을 확인한 결과이다. 도 4(d) 및 도 4(e)는 화분립에서의 *OsRALF19* 발현을 확인한 결과이고, 도 4(f)는 화분관에서의 *OsRALF19* 발현을 확인한 결과이다. 상기 도 4(c) 및 도 4(f)에 있어, 흰색 화살촉(White arrowheads)은 정점 영역(apical zone)에서 화분관의 원형질막(plasma membrane)을 나타낸다. 도 4(a), 도 4(c), 도 4(d) 및 도 4(f)에 있어, 바는 20 μ m를 나타내고, 도 4(b) 및 도 4(e)에 있어, 바는 10 μ m를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0035] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 식물의 화분 특이적 발현 프로모터를

제공한다.

- [0036] 상기 서열번호 1로 표시되는 염기서열은 벼 *Os01g10470* 유전자 유래 프로모터이며, 벼 *Os01g10470* 유전자의 2000bp의 염기서열에 해당한다. 본 발명에 있어서, *pOsRALF17* 로 명명되었다.
- [0037] 상기 서열번호 2로 표시되는 염기서열은 벼 *Os05g11330* 유전자 유래 프로모터이며, 벼 *Os05g11330* 유전자의 2000bp의 염기서열에 해당한다. 본 발명에 있어서, *pOsRALF19* 로 명명되었다.
- [0038] 더불어 본 발명의 프로모터는 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열 뿐만 아니라 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열의 일부 염기가 치환, 결실 또는 부가된 변형서열로서 화분에서 특이적으로 프로모터 활성을 나타내는 염기서열을 포함한다.
- [0039] 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열 및 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 서열번호 1로 표시되는 염기서열 및 이를 구성하는 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더욱 더 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 염기 서열에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 염기 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참조 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일실시예에 따르면, 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터와 형광 단백질을 포함하는 벡터를 이용하여 형질전환한 식물체에서 형광 단백질의 화분 특이적인 발현을 확인하였다.
- [0041] 한편, 화분의 발달 단계를 보면 다음과 같다: 수술의 화분낭에서는 각 화분 모세포가 감수분열을 거쳐 반수체 상태의 사분체를 형성한다. 이후 사분체는 수술의 용단조직에서 분비되는 칼라아제(callase)의 작용에 의해 소포자로 분리된다(1핵기). 각각 분리된 소포자들은 비대칭적인 유사분열을 거쳐 큰 영양 세포와 작은 생식 세포로 구성된 소포자로 발달한다(2핵기). 영양핵 세포는 더 이상의 유사분열 과정을 거치지 않고 정핵을 운반하는 통로인 화분관 신장에 필요한 영양분을 공급해 주는 역할을 한다. 생식핵 세포는 또 한 번의 유사분열을 거쳐 2개의 정세포를 만든다(3핵기).
- [0042] 본 발명의 일실시예에 따르면, 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터와 형광 단백질을 포함하는 벡터를 이용하여 형질전환한 식물체의 형광 단백질의 발현은 화분 발달 중기 내지 후기 단계인 2 핵기 화분, 3 핵기 화분에서 성숙된 화분에 이르기까지 강한 발현을 보임을 확인하였다.
- [0043] 따라서 본 발명의 프로모터는 화분 발달 과정 중 중기, 후기 단계인 2 핵기 내지 3 핵기에서 특히 강한 발현을 보이는 것을 특징으로 한다.
- [0044] 본 발명에서 용어 “특이적”은 프로모터의 발현 활성이 동일한 식물체 내의 적어도 하나 이상의 다른 조직보다 특정한 조직내에서 더 높다는 것을 의미한다. 프로모터의 발현 활성의 수준은 일반적으로 사용되는 방법을 이용하여 미리 측정된 조직 내에서의 프로모터의 발현수준을 다른 조직 내에서의 것과 비교함으로써 평가된다. 일반적으로 프로모터의 발현 수준은 프로모터의 조절 하에서 발현된 유전자 생성물, 예를 들어 단백질 및 RNA 등의 생성량에 의해 측정될 수 있다.
- [0045] 본 발명에 있어서, “프로모터(promoter)”는 일반적으로 전사를 개시하는 지점을 포함하는 암호화 부위의 상류쪽에 위치하는 유전자 부위로, 흔히 유전자 발현을 조절하는 TATA 박스, CAAT 박스 부위, 외부 자극에 반응하여 유전자 발현에 영향을 주는 부위 및 위치와 방향에 상관없이 거의 모든 유전자의 발현을 촉진하는 인핸서 등을 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 “인핸서(Enhancer)”란 전사 개시 복합체의 다른 단백질과 결합하여 그것의 관련 프로모터에 의해 진행되는 전사 개시를 촉진하는 서열이다.
- [0047] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 식물의 화분 특이적 발현 프로모터를 포함하는, 식물의 화분 특이적 발현 벡터를 제공한다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 “벡터”는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된(operably linked) 유전자의 염기서열을 함유하는 유전자 적제물을 의미하는 것이다. 상기

조절 서열은 작동가능하게 연결된 유전자의 전사/번역에 영향을 줄 수 있는, 전사 개시 부위의 상류 또는 하류에 존재하는 임의의 핵산서열을 말한다. 예컨대 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 인핸서, 전사를 조절하기 위한 오퍼레이터 서열, 폴리아데닐화 시그널, 리보솜 결합 부위, 복제 개시점, 전사 종결 서열 등을 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

[0050] 본 발명에 따른 화분 특이적 발현 벡터는 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여 본 발명의 식물의 화분 특이적 발현 프로모터를 삽입하고 상기 프로모터의 다운스트림(downstream) 쪽으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열인 목적 유전자를 삽입함으로써 제조할 수 있다. 이에 추가적으로 전사 종결 서열이 도입된 형태일 수 있다. 본 발명의 화분 특이적 발현 벡터의 한 예로서, 화분 특이적 발현 프로모터를 포함하는 벡터맵을 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0051] 본 발명의 벡터는 식물체 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않고 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 예로서 pCambia계열, pGA계열, pGWB계열, 예컨대, pGA3519, pGA3427, pGA3426, pGA3383, pCambia3301, pCambia3300, pGA3426, pGA3780, pGWB12, pGWB14와 같은 Ti-plasmid 및 이에 파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 사용할 수 있다. 더불어 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 벡터도 사용할 수 있다.

[0052] 본 발명의 일실시예에서는 pGA3519 이원 벡터를 사용하였다. 상기 pGA3519 벡터는 GUS(beta-glucuronidase) 리포터 유전자가 포함된 벡터로, GUS 리포터 유전자는 외래 유전자의 한 예로서, 본 발명의 프로모터를 상기 외래 유전자 앞에 위치하도록 하여 화분 특이적 벡터인 *pOsRALF17:OsRALF17-GUS* 또는 *pOsRALF19:OsRALF19-GUS*를 제조하였다.

[0053] 본 발명의 다른 일실시예에서는 pGA3427 이원 벡터를 사용하여, 외래 유전자인 RFP(red fluorescent protein) 앞에 본 발명의 프로모터가 위치한 화분 특이적 벡터인 *pOsRALF17:OsRALF17-mRFP* 또는 *pOsRALF19:OsRALF19-mRFP*를 제조하였다.

[0054] 본 발명에 있어서, 상기 "다운스트림(downstream)"은 참고 뉴클레오티드 서열의 3' 쪽에 위치한 뉴클레오티드 서열을 말한다. 구체적으로, 다운스트림 뉴클레오티드 서열은 전사의 개시 포인트 뒤에 오는 서열과 일반적으로 관련된다. 예를 들면, 유전자의 번역 개시 코돈은 전사의 개시 부위의 다운스트림에 위치한다.

[0055] 본 발명에 있어서, 상기 "목적 유전자"는 목적하는 생성물을 암호화하는 일정 길이의 핵산 서열로서, 화분에서 발현을 원하는 유전자로 외래 유전자와 동등한 의미를 가진다. 목적하는 생성물은 그 자체가 생물학적으로 활성인 단백질이거나 전사 후 특정 유전자의 불활성에 관여하는 RNA(예컨대 RNAi에 관여하는 siRNA)일 수 있다. 이러한 목적 유전자는 일반적으로 센스 방향으로 벡터 내에 존재할 것이지만, 특정 유전자를 불활성화시키기 위하여 안티센스 방향으로 존재할 수도 있다. 목적 유전자가 생물학적으로 활성인 단백질을 암호화하는 유전자라면 그 유전자는 통상 5'UTR, 코딩 서열 및 3'UTR을 포함할 것이다. 또한 목적 유전자는 절단된 형태의 단백질, 융합된 형태의 단백질, 태그된 형태의 단백질을 암호화하는 서열일 수 있으며, cDNA 또는 게놈 DNA일 수 있고, 천연 형태의 생성물을 암호화하는 서열이거나 원하는 돌연변이 형태의 생성물을 암호화하는 서열일 수 있다. 이러한 목적 유전자는 그 목적 생성물이 인간에게 직접적 또는 간접적으로 유용한 것이라면 임의의 것이라도 무방하다. 또한 이러한 목적 유전자는 임의의 것으로부터 기원할 수 있는데, 예컨대 식물, 세균, 동물, 바이러스 등으로부터 기원할 수 있다.

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 "목적 유전자의 발현"은 상기 목적 유전자를 발현시켜 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 생산하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서 목적 유전자를 발현하는 방법은 상기 목적 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체(숙주 세포)를 배양하여 상기 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 발현시키는 방법일 수 있으며, 이를 통해 상기 단백질이 관여되는 생합성 경로의 최종산물을 제조할 수 있다.

[0057] 본 발명의 화분 특이적 발현 벡터는 바람직하게는 형질전환된 식물체의 선별을 가능 또는 용이하게 하기 위하여 선택 마커 유전자를 하나 이상 포함하거나, 발현시키고자 하는 목적 유전자의 발현 여부를 정성적 및/또는 정량

적으로 분석하기 위하여 리포터 유전자를 하나 이상 포함할 수 있다. 이러한 선택 마커 유전자나 리포터 유전자는 당업계에 공지된 것을 사용할 수 있다.

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 “리포터 유전자(또는 검출용 유전자)”는 상기 유전자의 효과에 기초하여 동정될 수 있는 동정하는 인자를 코딩하는 염기를 말하며, 여기서 상기 효과는 관심 염기의 유전을 추적하거나 관심 염기를 물려 받은 세포나 유기체를 동정하기 위해, 및/또는 유전자 발현 유도 또는 전사를 측정하기 위해 사용된다. 공지되고 당해 기술에서 사용되는 리포터 유전자의 예는 하기를 포함한다: GUS(beta-glucuronidase), YFP(yellow fluorescent protein), GFP(Green fluorescent protein), RFP(Red Fluorescent Protein), Luc(Luciferase)와 같은 형광 단백질, 클로로암페니콜 아세틸전이효소(Chloramphenicol acetyltransferase, CAT), 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase, LacZ) 등.

[0059] 또한 본 발명의 화분 특이적 발현 벡터는 상기 마커 유전자로서 암피실린(ampicilin), 테트라사이클린(tetracyclin), 카나마이신(kanamycin), 클로람페니콜(chloroamphenicol), 스트렙토마이신(streptomycin) 및 네오마이신(neomycin)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 항생제 저항성 유전자를 추가로 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명에 있어서, 상기 “항생제 저항성 유전자”는 항생제에 대하여 저항성을 가지는 유전자로서, 이것을 가지고 있는 세포는 해당 항생제를 처리한 환경에서도 생존하므로, 대장균에서 대량으로 플라스미드를 얻는 과정에 선별 마커로서 유용하게 사용된다. 본 발명에서 항생제 저항성 유전자는 본 발명의 핵심적 기술인 벡터의 최적의 조합에 따른 발현 효율에 크게 영향을 미치는 요소가 아니므로, 선별 마커로서 일반적으로 사용되는 항생제 저항성 유전자를 제한없이 사용할 수 있다.

[0061] 또한 본 발명의 화분 특이적 발현 벡터는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트린(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자를 포함할 수 있다.

[0062] 또한 본 발명에 있어서, 해독의 종결을 조절하는 서열인 터미네이터는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터 및 아그로박테리움 튜메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) 옥토판인(Octopine) 유전자의 터미네이터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 통상의 터미네이터를 사용할 수 있다.

[0063] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 식물의 화분 특이적 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포를 제공한다.

[0064] 본 발명의 화분 특이적 발현 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피무리움 세포 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 본 발명에서는 식물 세포인 것이 바람직하다. 식물의 형질전환에 이용되는 “식물 세포”는 임의의 식물 세포가 이용가능하다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양세포의 어떤 형태도 가능하다. “식물 조직”은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 제한되는 것은 아니나, 줄기, 잎, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다.

[0066] 상기 형질전환 세포는 통상의 배지에서 생육될 수 있다. 상기 “배양”은 식물 또는 식물 세포를 인공적으로 적당한 환경으로 조절된 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 상기 배지는 특정 식물 세포를 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 식물 세포가 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.

[0067] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 화분 특이적 발현 벡터 또는 상기 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포로 형질전환된 식물체를 제공한다.

[0068] 본 발명에 있어서, 상기 식물체는 단자엽 식물(Monocotyledoneae)일 수 있다. 상기 단자엽 식물은 현화 식물 중 속씨 식물의 대군의 하나로 배가 단 하나의 떡잎을 갖춘 식물을 의미하며 외떡잎식물로도 명명된다. 상기 단자엽 식물은 창포목(Acorales), 택사목(Alismatales), 페트로사비아목(Petrosaviales), 마목(Dioscoreales), 판다누스목(Pandanales), 백합목(Liliales), 비짜루목(Asparagales), 종려목(Arecales), 벼목(Poales), 생강목(Zingiberales) 및 닭의장풀목(Commelinales)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 식물일 수 있다. 상기 단자엽 식물의 예로서 벼, 갈대, 옥수수, 잔디, 보리, 밀, 조, 수수, 귀리, 호밀, 사탕수수, 피, 대나무, 강아

지풀, 난, 갈대, 부들, 억새풀, 마늘, 튕립, 군자란, 붓꽃, 백합, 기장, 울무, 바랭이, 달개비, 범부채, 용설란, 홍죽, 관음죽, 산마늘, 꽃제비, 비짜루 및 박새가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 있어서, 보다 바람직하게는 벼(*Oryza sativa*)일 수 있다.

- [0069] 본 발명에서 용어 “벼”는 학명이 *Oryza sativa* L.이며, 일년생 초본식물이고, 본 발명에서의 벼는 자포니카(Japonica)형, 인디카(Indica)형 및 자바니카(Javanica)형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0070] 더불어 상기 식물체는 전체 식물, 식물 기관(예: 잎, 줄기, 꽃, 뿌리 등), 종자 및 식물 세포(조직 배양 세포 포함) 및 이의 자손을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 식물의 부류는 일반적으로 형질전환 기술에 적용 가능한 고등 식물의 부류, 및 조류와 같은 특정의 하등 식물과 같이 광범위하다. 이는 배수체, 이배체 및 반수체를 포함하는 각종의 배수성 수준의 식물을 포함한다.
- [0071] 따라서 본 발명은 본 발명에 따른 형질전환 식물체의 종자를 제공한다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 상기 “형질전환”은 DNA의 세포내로의 도입을 말한다. 세포는 “숙주 세포”로 명명되며, 이는 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 대표적인 원핵 숙주 세포는 *E. coli*의 각종 균주를 포함한다. 도입된 DNA는 일반적으로 DNA가 삽입된 조각을 함유하는 벡터의 형태이다. 도입된 DNA 서열은 숙주 세포와 동일한 종, 또는 숙주 세포와는 상이한 종으로부터 기원할 수 있거나, 또는 이는 숙주 종으로부터 기원한 일부 DNA 및 일부 외부 DNA를 함유하는 하이브리드 DNA 서열일 수 있다.
- [0073] 상기 형질전환 방법은 당업계에 공지된 식물체에 도입할 수 있는 방법이라면 어떤 방법이든 제한없이 가능하다. 예를 들어 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Plant Mol. Biol. 8, 363-373 참고), 원형질체의 전기천공법(1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102 참고), 식물 요소로의 현미주사법(Mol. Gen.Genet. 202, 179-185 참고), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Nature 327, 70 참고), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(유럽특허 EP 0301316호 참고) 등으로부터 선택될 수 있다.
- [0074] 아그로박테리움 벡터에 의한 식물체의 형질전환을 위한 최적 절차는 형질전환될 식물체의 종류에 따라 다양하다. 아그로박테리움 매개 형질전환을 위한 대표적인 방법은 멸균된 묘목 및/또는 작은 식물체로부터 유래된, 배측, 정단(shoot tip), 줄기, 잎 또는 꽃 조직의 외식편의 형질전환을 포함한다. 그와 같은 형질전환된 식물체는 유성생식으로 또는 세포 또는 조직 배양에 의해 번식될 수 있다. 아그로박테리움 매개 형질전환은 이전에 다수의 상이한 종류의 식물체를 위해 명명되었으며 그와 같은 형질전환을 위한 방법은 당업계에 공지된 문헌에서 찾을 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 이용되는 어떠한 균주라도 사용이 가능하다.
- [0075] 더불어 본 발명은 본 발명에 따른 화분 특이적 발현 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 식물체에 도입하는 단계;를 포함하는 화분 특이적 발현을 보이는 식물 형질전환체의 제조 방법을 제공한다.
- [0076] 상기 제조 방법은 상기 벡터가 도입되어 화분에서 특이적으로 유전자가 발현되는 식물 형질전환체를 선별하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0077] 본 발명에 따른 제조 방법을 통해 제조된 식물 형질전환체는 본 발명에 따른 화분 특이적 발현 프로모터에 의해 상기 외래 유전자가 화분에서 발현되며, 이에 따라 화분 발달의 개선 또는 융성불임을 보일 수 있다.
- [0078] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 화분 특이적 발현 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 식물체에 도입하는 단계;를 포함하는 식물체 화분 특이적으로 외래 유전자를 발현시키는 방법을 제공한다.
- [0079] 상기 외래 유전자 발현은 화분 발달 중기 내지 후기 단계에 유도되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0081] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0083] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0085] 실시예 1. 벼 식물체 준비 및 화분 발아 조건

[0086] 야생형 벼(Wild-type(WT)), (*Oryza sativa* L. spp. *japonica* cv. Dongin)와 형질전환 계통(Dongin 벼 기반)을 성장 챔버(growth chamber)에서 28℃(16시간 광(Light))/22℃(8시간 암(dark)) 및 70% 습도 조건하에서 온실 또는 LMO(living modified organism)-규제 환경의 논에서 재배하였다. 반강도(half-strength) MS(Murashige 및 Skoog) 배지에서 자란 10일된 묘목을 추가 성장을 위해 토양으로 옮겼다.

[0087] 화분 발아는 공지된 문헌의 방법을 참고하여 수행하였다(BMC plant biology 20.1 (2020): 1-15. 참고). 먼저 열개된 벼의 수술에서 화분을 고체 발아배지에 수집하였다. 이를 위하여 20% 수크로스(sucrose), 10% PEG(Poly Ethylene Glycol), 3 mM 질산칼슘(calcium nitrate), 40 mg/L 붕산(boric acid), 10 mg/L 비타민 B1(vitamin B1) 및 1% 아가(agar)를 포함하는 고체 배지를 사용하였다. 수집된 화분은 28℃의 인큐베이터에서 10분 내지 30 분 정도 놓아두어 발아를 유도하였다.

[0089] 실시예 2. 벼 *RALF17* 유전자(*Os01g10470*) 또는 *RALF19* 유전자(*Os05g11330*)의 프로모터 영역 클로닝 및 염기서열 분석

[0090] 화분 특이적 발현 프로모터의 구축을 위해, 벼 *RALF17* 유전자(*Os01g10470*, *OsRALF17*로 명명) 또는 *RALF19* 유전자(*Os05g11330*, *OsRALF19*로 명명)의 시작 코돈으로부터의 2,000bp 업스트림(upstream) 영역을 본 발명에 따른 프로모터 서열로 사용하였다(각각 *pOsRALF17* 또는 *pOsRALF19*로 명명).

[0091] PCR 반응의 정확도를 높이기 위하여 PrimeSTAR[®] GXL DNA 폴리머라아제(polymerase)를 사용하였으며, 증폭된 염기서열은 생어 염기서열 분석(Sanger sequencing) 방법을 통하여 분석하였다. 분석된 염기서열은 In-fusion[®] HD PCR 클로닝 키트(In-fusion[®] HD PCR cloning Kit)를 사용하여 각각의 벡터에 클로닝하였다. 클로닝이 완료된 플라스미드는 생어 염기서열 분석방법을 이용하여 염기분석하였다.

표 1

[0093] pRALF17:RALF17-pGA3519-F	TACCGTTAACGAGCTCTAGAtctgtagcaagtggagat
pRALF17:RALF17-pGA3519-R	TCGGAGGAGGCCATTCTAGAGTTGGTATTGCGAGCGCAT
pRALF19:RALF19-pGA3519-F	TACCGTTAACGAGCTCTAGActaatgtgtgtcgacagt
pRALF19:RALF19-pGA3519-R	TCGGAGGAGGCCATTCTAGAGTTCATGTTGCGGGAGCAGC

[0095] 실시예 3. 화분 특이적 발현용 벡터 구축

[0096] 상기 벼 *OsRALF17* 또는 *OsRALF19* 유래 프로모터와 GUS(β -glucuronidase) 또는 RFP(red fluorescent protein)를 포함하는 재조합 벡터를 구축하였다.

[0097] RALF 프로모터 구동 GUS 융합 벡터(*pOsRALF17:OsRALF17-GUS* 또는 *pOsRALF19:OsRALF19-GUS*)를 구성하기 위해 상기 실시예 2에서 준비한 프로모터 영역을 PCR을 사용하여 증폭하고 In-Fusion HD PCR 클로닝 키트(Takara Bio Inc.)를 사용하여 BamHI 처리된 pGA3519 이원 벡터(binary vector)에 결찰시켰다. 더불어 형광 단백질 융합 벡터(*pOsRALF17:OsRALF17-mRFP* 또는 *pOsRALF19:OsRALF19-mRFP*)를 구성하기 위해 상기 실시예 2에서 준비한 프로모터 영역을 증폭하고 HindIII/SpeI 처리된 pGA3427 이원 벡터에 결찰시켰다.

표 2

pRALF17:RALF17-RFP_pGA3427-F	TACCTATTTCCGCCCGGATCC tctgtagcaagtggagatat
pRALF17:RALF17-RFP_pGA3427-R	GCGTTGTACACGTACGAAGCTT GTTGGTATTGCGAGCGCATC
pRALF19:RALF19-RFP_pGA3427-F	TACCTATTTCCGCCCGGATCC gctaattgttgcacgtg
pRALF19:RALF19-RFP_pGA3427-R	GCGTTGTACACGTACGAAGCTT GTTCATGTTGCGGAGCAGC

[0101] 실시예 4. 벼 형질전환(transformation)

[0102] 캘러스(callus)를 이용한 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*, *A. tumefaciens*) 매개 공동 배양(co-cultivation)를 통하여 동진벼의 형질전환을 수행하였다.

[0103] 상기 실시예 3에서 구축한 화분 특이적 발현 벡터 *pOsRALF17:OsRALF17-GUS*, *pOsRALF19:OsRALF19-GUS*, *pOsRALF17:OsRALF17-mRFP* 또는 *pOsRALF19:OsRALF19-mRFP* 2 μ g를 아그로박테리움 컴피턴트 셀(competent cell)(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404)과 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서 액체질소에 75초간 넣은 후, 37 $^{\circ}$ C 오븐에서 5분 동안 방치하고, 이에 1 ml의 LB(Luria-Bertani broth) 액체 배지를 넣은 다음 3시간 동안 28 $^{\circ}$ C의 진탕배양기(Shaking incubator)에서 배양하였다. 그 후 테트라사이클린(Tetracycline) 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간후 생성되는 콜로니를 PCR을 통해 확인하였다.

[0104] 상기 생성된 형질전환된 아그로박테리움을 벼의 형질전환 실험에 사용하였다. 28 $^{\circ}$ C 생장실에서 동진벼 종자를 N6D 고체 배지에서 7일 정도 키워서 벼의 캘러스(callus)를 생성하였다. 생성된 캘러스와 72시간동안 배양한 pGA2707 식물 발현용 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 세포를 혼합하고, 22 $^{\circ}$ C 암실의 생장실에서 N6D-아세트 시린곤(N6D-Acetosyringone)을 포함하는 배지에서 배양하였다.

[0105] 아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 세척한 후 N6D 고체 배지하에서 1차 (hygromycin 30 mg/L), 2차 (hygromycin 40 mg/L)에 걸친 계대 배양을 통해 하이그로마이신(hygromycin) 선발을 진행하였다. 상기 하이그로마이신 선발은 28 $^{\circ}$ C 생장실에서 4주 동안 이루어졌다(각 차수마다 2주씩 수행). 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR (hygromycin 40 mg/L 포함) 고체배지에 옮겨 4주 28 $^{\circ}$ C 광조건 생장실에서 재분화를 유도한 후, 식물체를 MS 고체 배지로 옮기고 7일 28 $^{\circ}$ C 광조건 생장실에서 키운 후 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

[0107] 실시예 5. 벼 형질전환체의 발현 확인

[0108] 5-1. GUS 염색

[0109] GUS 염색을 이용한 조직화학적(histochemical) 염색을 통해 상기 실시예 4에 따른 벼 형질전환체의 각 조직의 발현을 분석하였다. 7일된 묘종과 여러 단계의 소수(spikelet)를 포함한 조직을 GUS 염색 용액에 침지하였다(J. Plant Biol. 62, 82-91. 참고). 상기 조직을 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양한 후, 엽록소(chlorophyll)를 70% 에탄올을 이용하여 제거하였다. 상기 샘플을 SZX61 현미경, Canon 카메라 및 Olympus BX61 현미경을 이용하여 촬영하였다.

[0111] 5-2. qRT-PCR(quantitative real time-PCR)

[0112] 성숙한 화분 및 발달중인 종자를 포함하는 다양한 샘플을 액체 질소에서 즉시 동결시켰다. 그 후, TRIZOL 시약(Invitrogen)이 결합된 RNase Plant Mini kit(Qiagen) 및 DNase 처리를 통하여 총 RNA를 추출하였다. 첫 번째 가닥 cDNA(first-strand cDNA)는 MMLV 역전사 효소(Reverse Transcriptase (Promega)) 및 올리고(dT)(Oligo(dT)) 15 프라이머로 합성되었다. 이를 이용하여 기존 공지된 방법으로 qRT-PCR을 수행하였다. 이때 하기 표 3의 프라이머를 사용하였다.

표 3

RALF17-qRT-F	GACGAACAGGTACGTGAGCT
RALF17-qRT-R	AGTTGGTATTGCGAGCGCAT
RALF19-qRT-F	AAGCCGACGAACCGGTACGT
RALF19-qRT-R	TCAGTTCATGTTGCGGGAGC

[0113]

[0115]

5-3. 화분관내 국소화 분석

[0116]

RFP 형광 분석을 통한, 성장하는 화분관에서의 국소화는 레이저 스캐닝 공초점 현미경(laser scanning confocal microscope) LSM510(Carl Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 확인하였다.

[0118]

5-4. 형질전환 벼 식물체의 화분관(pollen tube)에서의 특이적 발현 확인

[0119]

qRT-PCR 및 조직화학적 GUS 분석을 수행하여 형질전환체 조직 및 발달 발현 패턴(developmental expression pattern)을 확인하였다(도 2(a) 및 도 2(b)). qRT-PCR 분석은 10일된 뿌리(10d Root로 표시), 10일된 새싹(10d shoot로 표시), 감수분열(meiosis), 테트라드(tetrad), 유사분열(mitosis), 성숙한 꽃밥(M.anther로 표시) 등의 다양한 발달 단계의 꽃밥, 화분, 무수분된(Non pollinated) 암술(pistil로 표시), 수분(pollination, DAP) 후 0일(0 DAP로 표시), 수분 후 1일(1 DAP로 표시), 수분 후 20일(20 DAP로 표시)된 암술, 성숙한 꽃밥 단계의 이삭(L/P로 표시)의 외화영(lemma) 및 속겨(palea) 등의 샘플을 이용하여 수행하였다.

[0120]

qRT-PCR 분석 결과, *OsRALF17*와 *OsRALF19* 유전자는 다른 조직에서의 발현 검출이 되지 않았고, 성숙한 꽃밥((mature anther)(3세포 화분(tricellular pollen)과 약벽을 포함한 조직))에서 발현이 약하게 검출되었고, 성숙한 화분에서 특이적으로 높은 발현을 검출할 수 있었다. *OsRALF17*의 경우, 화분에서 *OsRALF19*보다 약 2배의 발현 수준을 보였다(도 3(a)).

[0121]

조직 화학적(histochemical) GUS 분석 결과도 이와 유사한 발현 패턴을 나타내었다(도 3(b) 및 도 3(c)). *OsRALF17*과 *OsRALF19*는 묘목, 속겨(palea), 외화영(lemma) 및 단세포 미세포자(unicellular microspore)에서는 발현되지 않았지만 성숙한 꽃밥과 화분에서는 발현함을 확인하였다. 보다 구체적으로, *OsRALF17*과 *OsRALF19*는 2 세포 화분 단계에서 발현되었으며, 3세포 화분 및 화분 발아 단계에서 가장 높은 발현을 보였다. 발아된 화분에서, GUS는 화분립뿐만 아니라 화분관에서도 발현되었다. 또한 화분이 암술머리(stigma)에 부착되는 동안의 GUS 발현과 화분관 신장은 *OsRALF17*과 *OsRALF19*가 화분 발아 및 화분관 신장 단계에서 기능을 가질 수 있음을 시사하였다.

[0122]

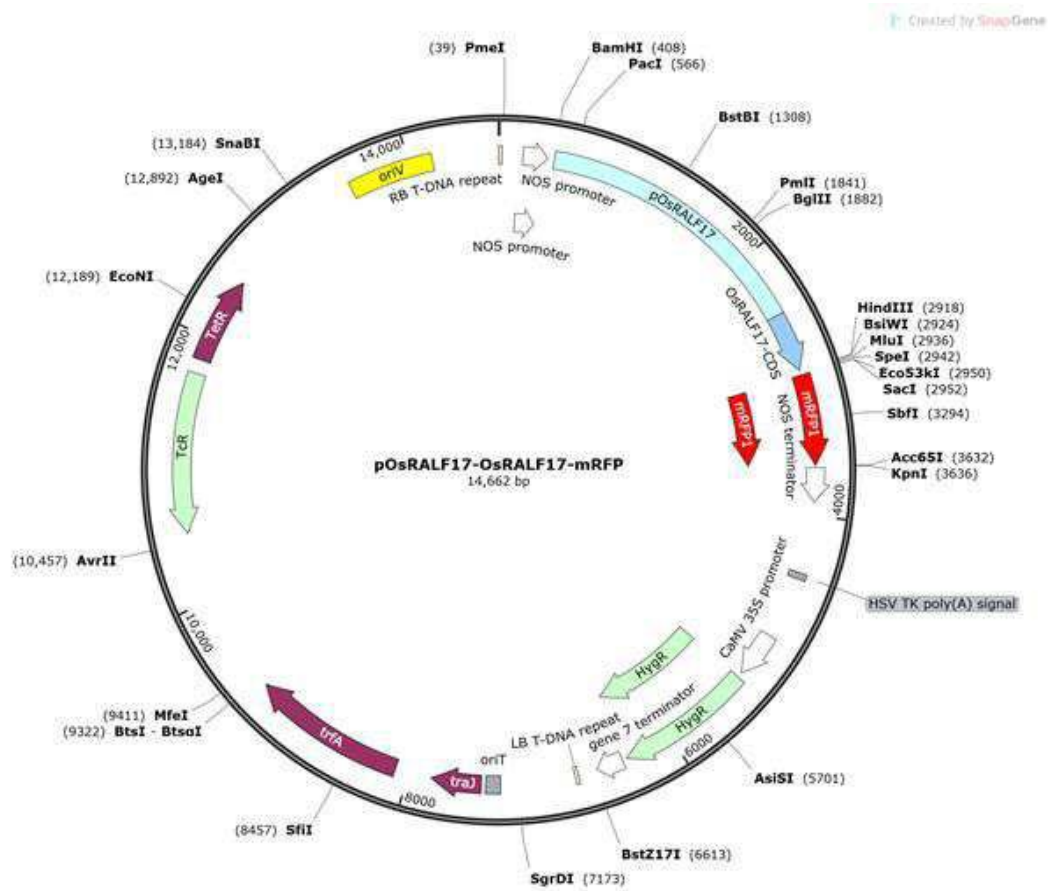
더불어 벼 화분관 성장동안 *OsRALF17* 및 *OsRALF19*의 국소화를 확인하였다. *OsRALF17*(도 4(a), 도 4(b)) 및 *OsRALF19*(도 4(d), 도 4(e))의 RFP 신호는 화분립과 화분관에서 관찰되었고 특히 발아 후 화분관에서 더 강한 신호를 나타내었다(도 4(c), 도 4(f)). 이를 통해 두 *OsRALF*가 분비 경로에 들어갈 수 있음을 확인하였고, *OsRALF17*와 *OsRALF19*의 과발현은 화분 발아 또는 화분관 성장에 결함을 야기하지 않음을 확인하였다. 또한 *OsRALF17-mRFP*는 화분관의 정단부 세포질(subapical cytosol)과 정단부 PM(plasma membrane)에서 균일한 분포를 보인 반면(도 4(c)), *OsRALF19-mRFP*는 성장하는 화분관의 정단부 PM에 매우 국한되어 있었다(도 4(f)).

[0124]

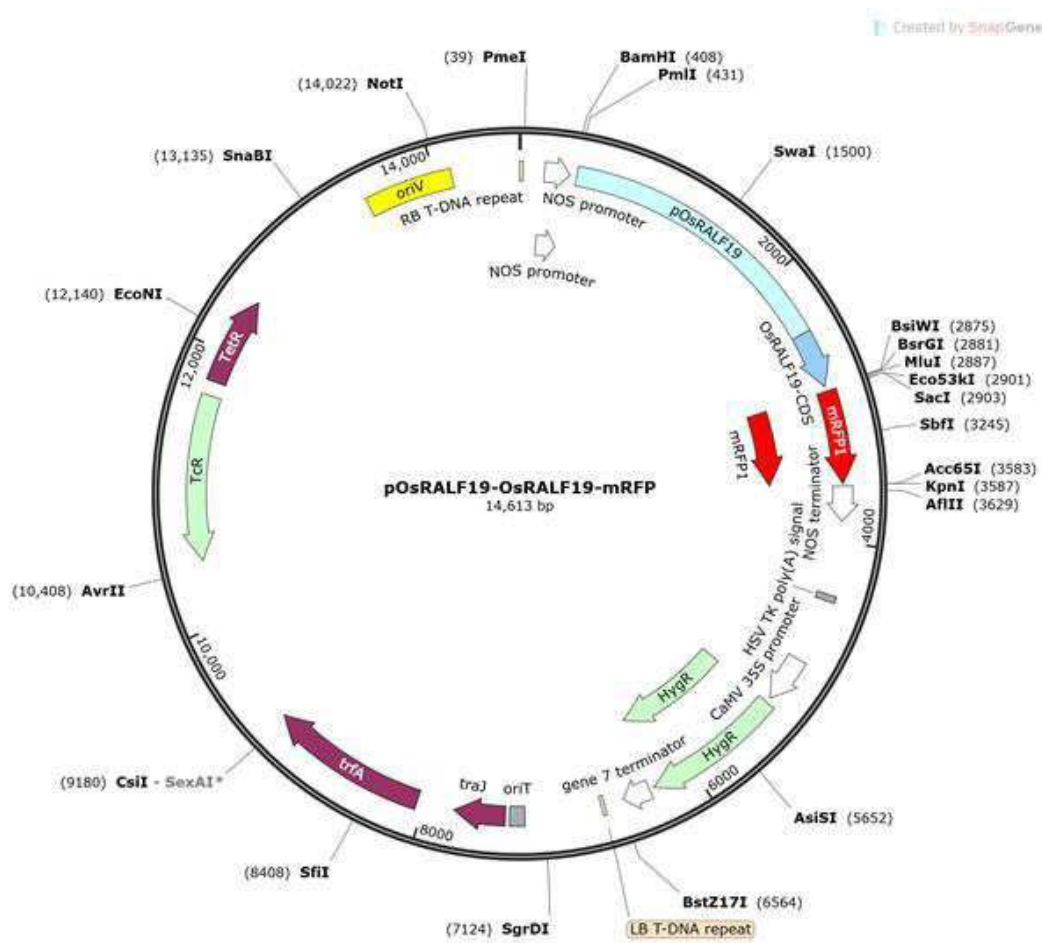
종합적으로 본 발명에 따른 벼 유전자 유래 프로모터를 포함하는 벡터를 이용하여 형질전환된 벼 식물체에 있어서, 화분관, 성숙한 꽃밥 및 화분에서만 특이적으로 높은 발현을 보임을 확인하였다. 따라서 본 발명의 프로모터를 포함하는 벡터는 화분 특이적 발현을 보이는 바, 이를 이용해 벼를 포함하는 주요 곡물 내지 단자엽 식물체의 화분 발달의 개선 또는 융성불임 식물체의 육성을 통한 생산성 증대 작물을 육성하는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면

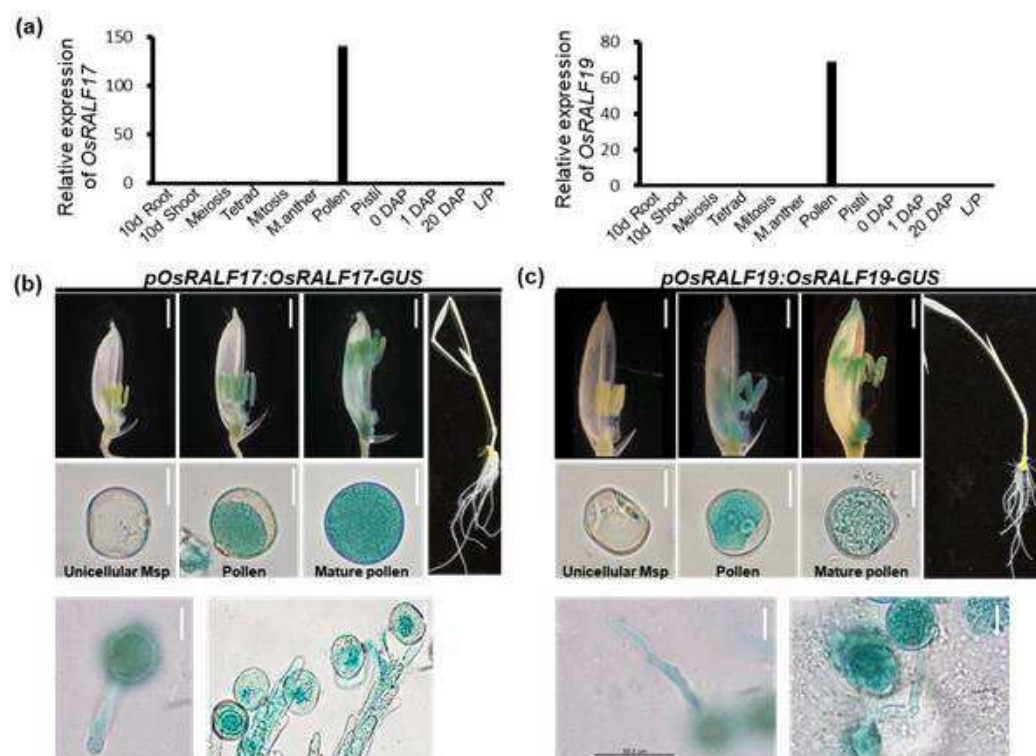
도면1



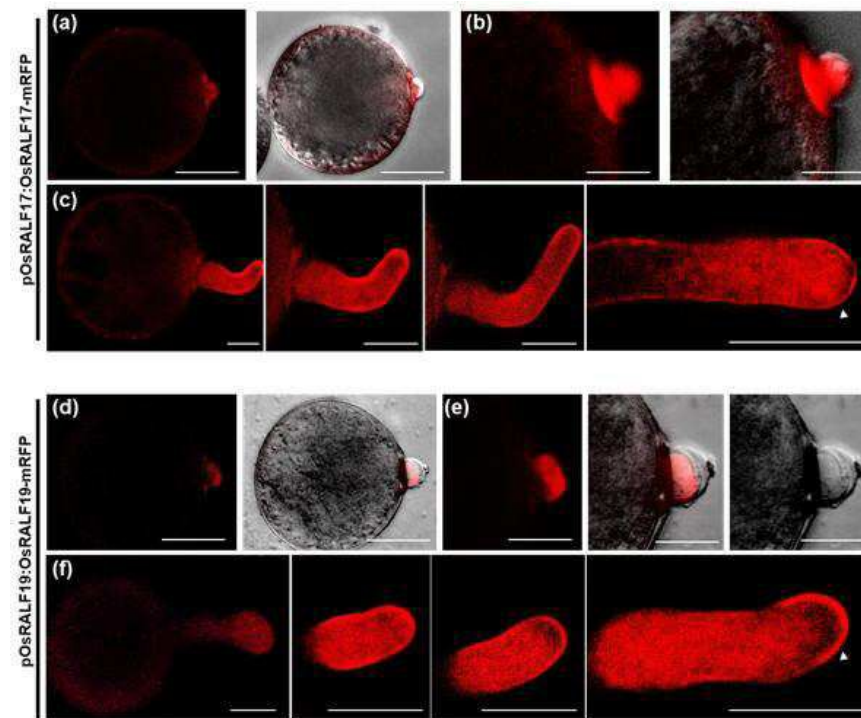
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.