

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 1월 12일 (12.01.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/007067 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/82 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/010640
- (22) 국제출원일: 2015년 10월 8일 (08.10.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0095135 2015년 7월 3일 (03.07.2015) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: **하선화 (HA, Sun Hwa)**; 16333 경기도 수원시 장안구 정자천로 133 번길 26 554 동 1402 호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 하나 (HANA IP LAW FIRM); 06235 서울시 강남구 테헤란로 20 길 10 6 층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

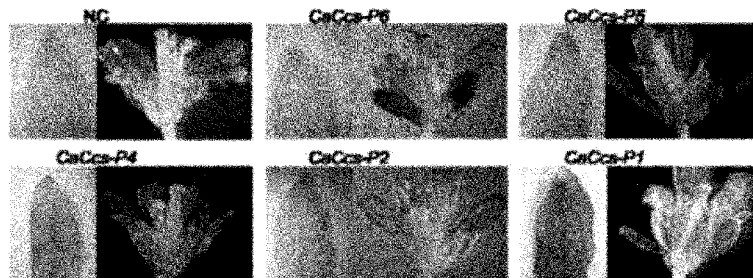
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PLANT CONSTITUTIVE PROMOTER DERIVED FROM RED PEPPER CAPSANTHIN-CAPSORUBIN SYNTHASE GENE

(54) 발명의 명칭 : 고추 캡산틴 캡소루빈 합성효소 유전자 유래의 식물체 전신 발현 프로모터



(57) Abstract: A plant constitutive promoter is disclosed. More specifically, disclosed are a plant constitutive promoter derived from the red pepper capsanthin-capsorubin synthase gene, a recombinant vector for inducing constitutive expression comprising the promoter, and a transgenic plant transformed with the recombinant vector for inducing constitutive expression. The constitutive promoter according to the present invention can express a target gene in the overall tissues of the plant, and thus the constitutive promoter can be favorably used in the selection of transformants and the development of transgenic plants producing medically and industrially useful materials using an antibiotic- or herbicide-resistant gene at the time of transformant construction.

(57) 요약서: 식물체 전신 발현 프로모터(constitutive promoter), 보다 상세하게는 고추 캡산틴-캡소루빈 합성효소 유전자 유래의 식물 전신 발현 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 전신 발현 유도용 재조합 벡터 및 상기 전신 발현 유도용 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체가 개시된다. 본 발명에 따른 전신 발현 프로모터는 식물체의 전 조직에서 목적 유전자를 발현할 수 있으므로, 형질전환체 제작 시 항생제 또는 제초제 저항성 유전자를 이용한 형질전환체 선발 및 의료, 산업용 유용 물질 생산 형질전환 식물체 등의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.



WO 2017/007067 A1

명세서

발명의 명칭: 고추 캡산틴 캡소루빈 합성효소 유전자 유래의 식물체 전신 발현 프로모터

기술분야

- [1] 본 발명은 식물체 전신 발현 프로모터(constitutive promoter), 보다 상세하게는 고추 캡산틴-캡소루빈 합성효소 유전자 유래의 식물 전신 발현 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체에 관한 것이다. 본 발명에 따른 전신 발현 프로모터는 식물체의 전 조직에서 목적 유전자를 발현할 수 있으므로, 형질전환체 제작 시 항생제 또는 제초제 저항성 유전자를 이용한 형질전환체 선발 및 의료, 산업용 유용 물질 생산 형질전환 식물체 등의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

[2]

배경기술

- [3] 작물분자유종은 모든 종(種)의 유전자를 재료로 사용할 수 있으며 기존의 게놈 단위로만 가능하던 육종기술을 유전자 단위로 끌어내려 무한대의 육종 효과를 미세하게 조절할 수 있다는 측면에서 차세대 농업을 이끌어 갈 핵심적인 기술이다. 이러한 작물분자유종 기술을 이용한 유전자변형 작물의 재배면적과 재배량이 전 세계적으로 지속적으로 증가하고 있다. 상업화된 유전자변형 신종자의 세계 시장 규모는 2002년 40억 달러에서 2010년 100억 달러(종자와 기술료 포함)로 전체 세계 종자 시장규모 300억 달러 대비 15% 수준이며 종류로는 대두, 옥수수, 면화, 유채가 주 시장을 형성하고 있다. 유전자변형 작물의 향후 시장 규모에 대한 전망은 장기적으로 유전자변형 작물 시장이 바이오산업에서 가장 큰 영역을 차지할 것이라고 예측하면서 2020년 시장규모를 Astra-Zeneca 등 생명과학 기업들은 750억 달러, 일본의 미쓰비시 연구소는 1,375억 달러에 달할 것으로 전망하였다. 이와 함께 유전자 변형 가공식품도 2010년 1,360억 달러, 2020년에는 1,590억 달러의 거대 시장을 형성하여 21세기 최대의 바이오산업으로 부상할 것으로 예측하였다.

[4]

- [5] 유전자변형 작물(Genetically Modified Organism, GMO)의 효과를 극대화하기 위해서는 외부에서 삽입된 유전자의 발현을 가장 효과적으로 조절할 수 있어야 하며 이를 위해 다양한 프로모터의 개발이 이루어져야 한다. 이에 1980년대 초반부터 식물 유전자의 발현을 조절하는 프로모터에 대한 연구가 진행되어 왔다. 꽃양배추 모자이크 바이러스(*Cauliflower mosaic virus*) 유래 프로모터가 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도할 것이라는 가능성이 제시되고(Hohn et al., 1982, Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96: 193-236), 상기 프로모터의 염기서열이 밝혀지고(Odell et al., 1985, Nature 313:810-812), 식물체 내에서 강한 발현이

증명되었다(Sanders et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 1543-58). 그 후 *CaMV* 35S (특허번호: JP1993192172-A1) 프로모터는 식물에서 가장 많이 쓰이는 항상성(universal) 프로모터가 되었다. 그러나, 바이러스 유래 프로모터에 의한 GMO가 환경에 미치는 잠재적 위험성, 즉, 도입 유전자가 표적 및 비표적 생물체로 전이될 가능성, 잡초화, 생태계 교란 등에 대한 안전성 시비가 끊임없이 대두되고 있는 실정이다. 따라서, 이러한 문제점을 극복하기 위한 방법으로서, 식물 유래의 프로모터 사용에 대한 사회적인 요구가 지속적으로 있어 왔다.

- [6] 식물 유래의 프로모터로는 애기장대 식물체의 유비퀴틴(ubiquitin) 프로모터(Callis et al., 1990, Journal of Biological Chemistry, 265: 12486-12493), 담배 식물체의 NeIF-4A 프로모터(Mandel et al., 1995, Plant Molecular Biology, 29: 995-1004), 애기장대 식물체의 액틴(actin) 프로모터(An et al., 1996, Plant Journal, 10: 107-121), 담배 식물체의 tCUP 프로모터(Foster et al., 1999, Plant Molecular Biology, 41: 45-55; Wu et al., 2001, Molecular Genetics and Genomics 265: 763-770; Malik et al., 2002, Theor Appl Genet, 105: 505-514) 등이 개발되어 왔으나, *CaMV*35S 프로모터에 훨씬 못 미치는 활성을 보이는 문제점이 있었다.

[7]

- [8] 한편, 고추 캡산틴-캡소루빈 합성효소 유전자(capsanthin-capsorubin synthase gene, *CaCcs*)는 열매의 유색체(chromoplast) 성숙 동안 특이적으로 발현되는 유전자로서, *CaCcs*는 과일이 익으면서 동시에 강하게 발현되지만, 잎, 줄기 및 뿌리를 포함하는 다른 기관 및 생 과일에서는 발현되지 않는다. 또한, *CaCcs*의 전사는 고추를 빨강게 익게 하는 색소 성분인, 캡산틴 및 캡소루빈의 생합성 경로의 장애로 인해 숙과색이 노란색을 나타내는 고추 품종에서는 관찰되지 않는다. 이와 같은 *CaCcs* 발현의 특성으로 인해 유색체-특이적 프로모터의 우수한 후보 유전자로 여겨지고 있다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 이에 본 발명자는 식물 유래 전신 발현 프로모터를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 고추 캡산틴-캡소루빈 합성효소 유전자(capsanthin-capsorubin synthase gene, *CaCcs*) 프로모터(-2,279 ~ +30)가 유색체-특이성을 나타내는 것으로 알려져 있지만, 상기 *CaCcs* 프로모터의 절단체(-367 ~ +30)만을 이용하는 경우 전신 발현이 가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 본 발명은 서열번호 1의 1913 내지 2309(-367 내지 +30) 부위의 염기서열을 포함하는 고추 캡산틴-캡소루빈 합성 효소 유전자 유래 식물 전신 발현 프로모터를 제공하고자 한다. 예를 들면, 상기 고추 캡산틴-캡소루빈 합성 효소

유전자 유래 식물 전신 발현 프로모터는 서열번호 2의 염기서열을 포함할 수 있다.

- [13] 본 발명은 또한 서열번호 1의 1913 내지 2309(-367 내지 +30) 부위의 염기서열을 포함하는 고추 캡산틴-캡소루빈 합성 효소 유전자 유래 식물 전신 발현 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 제공하고자 한다.
- [14] 본 발명은 또한 서열번호 1의 1913 내지 2309(-367 내지 +30) 부위의 염기서열을 포함하는 고추 캡산틴-캡소루빈 합성 효소 유전자 유래 식물 전신 발현 프로모터를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공하고자 한다. 상기 형질전환 식물체 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물을 포함할 수 있다. 예를 들면 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근, 셀러리, 유채, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 또는 양파를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [15] 본 발명은 또한 서열번호 1의 1913 내지 2309(-367 내지 +30) 부위의 염기서열을 포함하는 고추 캡산틴-캡소루빈 합성 효소 유전자 유래 식물 전신 발현 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 식물체 전 조직에서 고발현시키는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공하고자 한다.
- [16] 본 발명은 또한 서열번호 1의 1913 내지 2309(-367 내지 +30) 부위의 염기서열을 포함하는 고추 캡산틴-캡소루빈 합성 효소 유전자 유래 식물 전신 발현 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및
- [17] 상기 형질전환된 식물체의 전 조직 내에서 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법을 제공하고자 한다.
- [18] 본 발명에 따라 제조된 서열번호 1의 1913 내지 2309 (-367 내지 +30) 부위의 염기서열을 포함하는 *CaCcs* 프로모터는 유색체 조직인 수술의 꽃밥과 암술대뿐만 아니라 비-유색체 조직인 잎과 꽃받침에서도 유전자 발현을 유도할 수 있다(실시예 1 참고). 본 발명에 따른 *CaCcs* 프로모터는 종래 35S 프로모터에 비해 3배 내지 31배의 발현 활성을 가질 수 있다(실시예 2 참고). 본 발명에 따른 *CaCcs* 프로모터는 종래 35S 프로모터 보다 강한 활성으로 모든 기관에서 유전자 발현을 유도할 수 있다(실시예 3 참고). 따라서, 본 발명에 따른 *CaCcs* 프로모터는 종래 35S 프로모터 보다 더 강한 전신 발현 프로모터로서, 형질전환체 제작 시 항생제 또는 제초제 저항성 유전자를 이용한 형질전환체 선발 및 의료, 산업용 유용 물질 생산 형질전환 식물체 등의 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.
- [19]

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 형질전환 애기장대 식물체에서 전장 *CaCcs* 프로모터(*CaCcs-6*) 및 그의 절단체 프로모터(*CaCcs-P5*, *P4*, *P3*, *P2* 및 *P1*)의 활성을 비교하기 위한 벡터의 모식도를 나타낸다.
- [21] 도 2는 *CaCcs-P6*, *P5*, *P4*, *P2* 및 *P1*로 형질전환된 애기장대 식물체의 잎(왼쪽) 및 꽃(오른쪽)에 대한 조직화학적 GUS 염색 결과를 나타낸다.
- [22] 도 3은 3주 유묘 단계의 *d35S-P:Gus* 및 *CaCcs-P1:Gus* 형질전환 애기장대에 대한 조직화학적 GUS 염색 결과를 나타낸다.
- [23] 도 4는 *d35S-P* 및 *CaCcs-P1*가 형질전환된 애기장대 식물체에서 형광 MUG 분석을 이용한 GUS 활성 수준을 정량화한 결과를 나타낸다.
- [24] 도 5는 2개의 다른 성장 단계(4주 및 5주)에서 *d35S-P* 및 *CaCcs-P1*가 형질전환 애기장대 식물체의 전체 기관에서 수행한 조직화학적 GUS 염색 결과를 나타낸다.
- [25] 도 6은 *CaCcs-P1*가 형질전환 애기장대 식물체의 각각의 기관에서 GUS 전사체를 반-정량적 RT-PCT한 결과를 나타낸다.
- [26] 도 7은 2개의 *CaCcs-P1*가 형질전환 애기장대 식물체에서 GUS 효소 활성을 측정하기 위한 MUG 검사 결과를 나타낸다.
- [27] 도 8은 형질전환 담배 식물체에서 *d35S-P* 및 *CaCcs-P1*의 프로모터 활성을 비교한 결과를 나타낸다.

[28]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [29] 본 발명은 특정 방법 또는 프로토콜로 제한되지 않음을 이해하여야 한다. 또한, 본원에서 사용되는 용어는 단지 특정 구현 예를 설명하기 위한 것으로서 본 발명의 범위를 제한하고자 의도되지 않고, 본 발명의 범위는 첨부되는 청구의 범위에 의해서만 제한될 것임을 이해하여야 한다. 본원 명세서 및 첨부되는 청구의 범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 이와 다른 의미로 분명하게 언급되지 않으면 복수형을 포함함을 알아야 한다. 따라서, 예를 들어, "벡터"에 대한 언급은 하나 이상의 벡터에 대한 언급이고, 당업자에게 알려진 그의 균등물을 포함한다. 용어 "약"은 대략, 어림잡아, ~쯤, 또는 그 범위 내를 의미하기 위해 본원에서 사용된다. 용어 "약"이 수치 범위와 함께 사용될 때, 이 용어는 제시된 수치 범위의 상한 및 하한을 연장함으로써 그 범위를 변경한다. 일반적으로, 용어 "약"은 수치값을 언급된 값의 위 및 아래로 20%, 바람직하게는 10% 증가 또는 감소한 (더 높거나 또는 더 낮은) 변동치 만큼 변경하기 위해 본원에서 사용된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "또는"은 특정 목록의 임의의 하나의 구성원을 의미하고, 상기 목록의 구성원의 임의의 조합도 또한 포함한다. 용어 "이루어지다", "이루어지는", "포함하다" 및 "포함하는"은 본원 명세서 및 하기 청구의 범위에서 사용될 때 하나 이상의 언급된 특징부, 정수,

성분 또는 단계의 존재를 구체화하는 것이 의도되지만, 하나 이상의 다른 특징부, 정수, 성분, 단계 또는 이들의 군의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.

[30]

[31] 본 발명은 고추 캡산틴-캡소루빈 합성효소 유전자 유래의 식물 전신 발현 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공하고자 한다.

[32]

[33] 1. 프로모터

[34] 제1구현 예에 따르면, 서열번호 1의 1913 내지 2309 부위의 염기서열을 포함하는 고추 캡산틴-캡소루빈 합성효소 유전자(capsanthin-capsorubin synthase gene, *CaCcs*) 유래 식물 전신 발현 프로모터가 제공된다. 예를 들면, 상기 *CaCcs* 유래 식물 전신 발현 프로모터는 서열번호 2의 염기서열을 포함할 수 있다.

[35] 본 명세서에서 사용된 용어 "프로모터(promoter)"는 유전자의 전사 개시 부위의 전사 방향과 관련하여 상류(5')에 위치하고(전사 개시점을 서열의 위치 +1로 나타내고, 그와 관련하여 상류에 있는 임의의 뉴클레오티드는 음수를 사용하여 나타낸다), DNA-의존 RNA 중합효소에 대한 결합 부위, 전사 개시 부위, 전사 인자 결합 부위, 억제 인자 및 활성 인자 단백질 결합 부위, 및 프로모터로부터 전사량을 직접 또는 간접적으로 조절하는 작용을 하는 것으로 당업자에게 알려져 있는 임의의 다른 뉴클레오티드 서열을 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 다른 DNA 도메인(cis-acting 서열)의 존재에 의해 구조적으로 동정되는, 하나 이상의 유전자의 전사를 제어하는 기능을 갖는 핵산 단편을 나타낸다. 전사 개시점(+1) 상류에 있는 진핵생물의 시스 작용 서열의 일 예로는 TATA 박스, CAAT 박스, 5' 인핸서 또는 침묵 인자 요소 등을 포함한다.

[36] 본 명세서에서 사용된 용어 "전신(constitutive)" 또는 "구성적" 프로모터는 대부분의 생리학적 및 발생학적 조건 하의 대부분의 조직(또는 기관)에서 활성인 프로모터를 의미한다. 더욱 바람직하게, 전신 프로모터는 모든 주요 기관, 예를 들면, 잎, 줄기, 뿌리, 종자, 열매 및 꽃에서 본질적으로 모든 생리학적 및 발생학적 조건 하에 활성이다. 가장 바람직하게는, 전신 프로모터는 대부분 생리학적 및 발생학적 조건 하의 모든 기관에서 활성이다. 한편, "유도성" 프로모터는 생리학적으로(예를 들면, 특정 화합물의 외적 작용) 또는 발생학적으로 조절되는 프로모터를 의미한다. "조직 특이성" 프로모터는 조직 특정 유형의 조직 또는 세포에서만 활성인 프로모터를 의미한다. 그러므로, 식물체 또는 식물 세포에서 "전신 프로모터" 또는 "전신 활성을 갖는 프로모터"는 대부분의 생리학적 및 발생학적 조건 하에 식물에서 또는 대부분의 조직(또는 기관) 중 식물 세포에서 전사할 수 있는 핵산 서열을 나타낸다.

[37]

[38] 상기 구현 예에 따른 *CaCcs* 유래 식물 전신 발현 프로모터는 서열번호 1의 1913 내지 2309 부위의 염기서열 또는 서열번호 2의 염기서열과 70% 이상의

상동성(homology)를 나타내고, 상기 프로모터와 동등한 프로모터 활성을 가지는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다

- [39] 본 명세서에서 사용된 용어 “상동성”은 야생형(wild type) 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 상기 상동성의 비교는 육안 또는 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

[40]

- [41] 상기 구현 예에 따른 *CaCcs* 유래 식물 전신 발현 프로모터는 꽃양배추 모자이크 바이러스 35S(Cauliflower Mosaic Virus 35S, *CaMV35S*)에 비해 향상된 발현 활성을 가질 수 있다.

- [42] 본 명세서에서 사용된 용어 “향상된 발현”은 본 발명에 따른 프로모터를 도입 후의 식물에서 핵산 분자의 수준이 본 발명에 따른 프로모터를 도입하기 전의 식물에서의 발현 수준 또는 참조 식물에 비해 더 높다는 것을 의미한다. 본 발명에서 사용된 용어 “향상된” 또는 “증가된”은 동의어이고, 발현되는 핵산 분자의 보다 높은, 바람직하게는 유의하게 더 높은 발현을 의미한다. 상기 용어 “발현”은 세포 내에서 유전자 생성물의 생합성, 바람직하게는 뉴클레오티드 서열, 예를 들면, 내인성 유전자 또는 이종성 유전자의 전자 및/또는 번역을 의미한다.

- [43] 본 명세서에서 사용된 용어 “향상된 전신 발현 프로모터”는 식물에서 전신 발현을 유도하는 프로모터를 의미하고, 여기서 각각의 프로모터의 제어 하의 핵산 분자로부터 유래된 RNA의 축적 또는 합성 속도 또는 RNA의 안정성은 *CaMV35S* 프로모터에 비해 50% 이상, 예를 들면, 100% 이상, 바람직하게는 200% 이상, 보다 바람직하게는 300% 이상, 가장 바람직하게는 400% 이상 증가한다.

[44]

[45] 2. 발현 벡터

- [46] 제2구현 예에 따르면, 상기 제1구현 예에 따른 *CaCcs* 유래 식물 전신 발현 프로모터를 포함하는 전신 발현 유도용 발현 벡터가 제공된다.

- [47] 본 명세서에서 사용된 용어 “발현 벡터”는 본 발명에 따른 프로모터 및 상기 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 식물체의 전신 발현 프로모터 및 상기 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다.

- [48] 본 명세서에서 사용된 용어 “작동 가능하게 연결됨(operably linked)”은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합할 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로

연결되는 것을 의미한다. 또한, 용어 "발현 조절 서열(expression control sequence)"은 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 상기 본 발명에 따른 발현 벡터로는 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여 본 발명의 재조합 프로모터를 삽입하고 상기 프로모터의 하류(downstream) 쪽으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 삽입함으로써 제조할 수 있다. 따라서 본 발명에 사용될 수 있는 벡터로 다양한 클로닝 부위를 가지고 있는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 및 Ti 플라스미드 등의 플라스미드가 있고, 식물 바이러스 벡터가 있으며, pCHF3, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 그러나 당업자라면 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다.

- [49] 본 명세서에서 사용된 용어 "목적 단백질"은 본 발명의 프로모터에 의해 식물체의 전 조직에서 고 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 단백질을 의미하며, 바람직하게는 외인성 단백질이거나 또는 내인성 단백질 및 리포터 단백질일 수 있다. 상기 외인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연으로 존재하지 않는 단백질을 말하며, 상기 내인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연으로 존재하는 유전자에 의해 발현된 단백질을 말한다. 또한, 상기 리포터 단백질은 리포터 유전자에 의해 발현된 단백질로서 그 존재에 의해서 세포 내에서의 그의 활성을 알려주는 표지 단백질을 말한다. 일 예로서, 본 발명의 식물 전신 발현 프로모터에 의해 발현되는 목적 단백질 유전자는 형질전환 대상 식물체가 유채, 들깨 및 참깨 등의 유지작물인 경우 지방산 생합성 및 조절 관련 유전자 등을 들 수 있고, 단백질의 생성 및 축적량이 다른 식물에 비해 상대적으로 높은 콩 및 알팔파 등의 두과식물인 경우 경제적으로 부가가치가 높은 항체 유전자 등을 들 수 있고, 사료작물로 대표적인 옥수수의 경우 돼지 설사병, 구제역 바이러스 등의 경구 백신(edible vaccine) 유전자 등을 들 수 있고, 뿌리로 장기간 보관, 유통되는 대부분의 작물의 경우 수확 후 저장성을 높이도록 각종 병 저항성에 관련된 유전자 등을 들 수 있으며, 그 외에도 토코페롤, 베타카로틴 등과 같이 특정 영양 성분을 작물의 뿌리에서 강화하려는 경우에는 관련 물질대사경로의 생합성 유전자 등을 들 수 있으나, 여기에 한정되지 않고, 본 발명의 전 조직 고 발현 프로모터를 사용하여 조절될 수 있는 각종 목적 단백질을 코딩하는 유전자들이 포함될 수 있다. 그러므로 본 발명의 프로모터를 이용한다면 식물체의 전 조직을 섭취하는 작물의 경우, 유용한 목적 단백질을

식물체의 전 조직에서 발현시킴으로써 식물체와 함께 목적 단백질을 함께 섭취할 수 있는 작물을 개발할 수 있다. 또는, 식물체 내에서 생산된 목적 단백질을 당업계에 알려진 적절한 방법에 따라 추출하여 사용할 수도 있다.

[50]

[51] 3. 형질전환된 식물체

[52] 제3구현 예에 따르면, 상기 제2구현 예에 따른 전신 발현 유도용 발현 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체가 제공된다.

[53] 본 발명에서 사용된 용어 "식물체"는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물일 수 있다. 상기 쌍자엽 식물은 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근, 셀러리 및 유채를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 단자엽 식물은 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[54] 본 명세서에서 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 상기 형질전환 방법으로는 염화칼슘(CaCl_2) 및 열 쇼크(heat shock) 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공(electroporation), PEG(Polyethyleneglycol)에 의한 침전법 및 아그로박테리움 매개법(*Agrobacterium*-mediated)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[55]

[56] 추가 구현 예에 따르면,

[57] 제1구현 예에 따른 식물 전신 발현 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는 목적 단백질을 식물체 전 조직에서 고발현시키는 형질전환 식물체의 제조 방법이 제공된다.

[58]

[59] 또 다른 추가 구현 예에 따르면,

[60] 제1구현 예에 따른 식물 전신 발현 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및

[61] 상기 형질전환된 식물체의 전 조직 내에서 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법이 제공된다.

[62]

발명의 실시를 위한 형태

[63] 이하, 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시 예를 제시한다. 하기 실시 예는 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 발명의 보호범위가 하기 실시 예에 한정되는 것은 아니다.

[64]

[65] <재료 및 방법>

[66] 1. *Capsicum Ccs* 프로모터의 5'-상류 조절 영역 클로닝

[67] 고추 캡산틴-캡소루빈 합성효소 유전자(*Capsicum Ccs*)의 프로모터 영역을 분리하기 위하여 한국산 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. NocKwang)의 게놈 라이브러리를 이용하였다. 32-P 표지된 *CaCcs* 전장(full length) cDNA를 프로브로 하여 약 10^5 플라크를 스크리닝하였다. 추정 *CaCcs* 게놈 클론을 *EcoRI* 제한효소를 이용하여 자른 후, *CaCcs* cDNA의 N-말단 영역의 32 P-200bp 단편으로 Southern blotting을 수행하여 확인된 2.5kb의 DNA 밴드를 pBluescript SK (+)(Stratagene)에 서브클로닝하였다. *CaCcs*의 N-말단 코딩 영역의 246bp 영역을 제거하여 생성된 2.3kb PCR 산물(-2,279 ~ +30)을 pBluescript KS (+)(Stratagene)의 *EcoRI* 및 *XbaI* 부위에 클로닝하였다. *CaCcs*의 ATG 개시 코돈으로부터 5'-상류 2,309kb 영역을 전장 *CaCcs* 프로모터로서 서열번호 1로 나타내었으며, 이를 "*CaCcs*-P6"로 명명하였다.

[68]

[69] 2. *Capsicum Ccs*의 5'-상류 조절 영역 절단체의 제작

[70] 하기의 표 1의 제한 효소를 이용하여 2.3kb *CaCcs* 프로모터로부터 2.0kb, 1.4kb, 1.0kb, 0.7kb 및 0.4kb의 프로모터 영역을 갖도록 *CaCcs* 프로모터 절단체를 제조하였다:

[71] 표 1

[Table 1]

프로모터	제한효소	크기
<i>CaCcs</i>-P6		-2279 ~ +30 (전장)
<i>CaCcs</i> -P5	<i>EcoRV</i> 및 <i>ScaI</i>	-1971 ~ +30
<i>CaCcs</i> -P4	<i>EcoRV</i> 및 klenow 단편-처리된 <i>AvaII</i>	-1349 ~ +30
<i>CaCcs</i> -P3	<i>ClaI</i> 및 <i>TaqI</i>	-954 ~ +30
<i>CaCcs</i> -P2	<i>EcoRV</i> 및 <i>StuI</i>	-531 ~ +30
<i>CaCcs</i>-P1	<i>EcoRV</i> 및 klenow 단편-처리된 <i>AvaII</i>	-367 ~ +30

[72] 그 다음, pBI221의 Gus:Tnos를 동일한 *XbaI* 및 *SacI* 부위를 사용하여 상기 6개의 프로모터를 갖는 벡터에 삽입하였다. 6개의 *CaCcs*-P의 제어 하에 Gus를 발현하는 벡터를 "pKS-*CaCcs*-P1-6:Gus:Tnos"로 명명하였다.

[73]

[74] 3. 식물 형질전환용 운반체의 제작

[75] 식물체 내에서 *CaCcs*-P를 발현시키기 위하여, *CaCcs*-P1-6:Gus:Tnos를 함유하는 각각의 카세트를 *SalI* 및 *EcoRI*로 절단하여 pCAMBIA 2300(Cambia,

Australia)에 리게이션하였다. *Bar* 발현 카세트의 2kb 단편을 각각의 플라스미드에 추가 도입하여 6개의 *CaCcs* P1-6를 갖는 바이너리 벡터를 제작하였다. 상기 제작된 벡터를 아그로박테리움(*Agrobacterium* strain EHA105)에 냉-해동(Freeze-thaw) 방법으로 도입한 후, 플로랄 딥(floral dip) 방법을 이용하여 애기장대(*Arabidopsis*) 생태형 Columbia(Col-0)에 도입하였다. *CaCcs*-P1 구조체는 아그로박테리움(*Agrobacterium* strain GC3101)에 추가 형질전환시키고 리프 디스크(leaf disc) 방법을 이용하여 형질전환 담배 식물체를 생성하였다. 상기 프로모터의 활성을 비교하기 위한 대조로서, 35S 프로모터를 포함하는 형질전환 애기장대(*s35S*-P-형질전환 애기장대), *d35S*-P-형질전환 애기장대 및 *d35S*-P-형질전환 담배를 사용하였다. 상기 형질전환 식물체를 0.3% Basta® 스프레이를 살포하여 선별하고 16시간 광주기의 배양기(22°C 낮, 18°C 밤)에서 배양시켰다.

[76]

[77] 4. 조직화학적 염색 분석 및 GUS 발색 분석

[78] GUS 조직화학적 분석을 수행하기 위하여 애기장대 식물체를 1% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide(X-Gluc) 용액으로 염색한 후 디지털 카메라(Olympus)가 장착된 광학 현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다. GUS 발색 활성을 측정하기 위하여, 애기장대 및 담배 식물체를 이용하여 4-methyl umbelliferyl- β -D-glucuronide(MUG) 분석을 수행하였다. Qubit 형광계(Invitrogen, CA) 및 FluorAce™ β -glucuronidase Reporter Assay Kit(Bio-Rad, CA)를 이용하여 GUS 단백질의 정량화 및 효소 활성을 측정하였다.

[79]

[80] 5. RT-PCR 분석

[81] Plant RNA Purification Reagent(Invitrogen)을 사용하여 준비된 애기장대의 다양한 조직으로부터 전체 RNA를 첫번째-가닥 cDNA로 전환시키고 mRNA Selective PCR Kit(Takara, Japan)를 이용하여 반정량적(semi-quantitative) PCR을 시작하였다. 상기 반응은 *Gus*-특이적 프라이머 세트(5'-ACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGC-3'/5'-CTCCCTGCTGCGGTTTTTCA-3')를 사용하여 25 사이클로 수행하였다. 애기장대 연장 인자-1 유전자(*Arabidopsis* elongation factor 1 gene)에 특이적인 프라이머 세트(*AtEF1 α* : 5'-GTTACATTAACATTGTGGTCATT-3'/5'-CAGGTACCAGTGATCATGTTCTTG-3')를 이용하여 총 RNA로 표준화하였다. 478bp 및 305bp의 크기를 갖는 2개의 PCR 산물이 생성되었다. PCR 밴드 강도는 농도계 및 QuantiTone 소프트웨어(Bio-Rad, CA)를 이용하여 정량적으로 분석하였다.

[82]

[83] 6. 수치적 해석

[84] *CaCcs*1-P의 -367 ~ +30 영역을 포함하는 5'-상류 DNA 서열을 하기의 웹 사이트를 사용하여 cis-acting element를 탐색하기 위하여 분석하였다: PLACE

(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>), PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), 및 Softberry(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter>).

[85]

[86] <실시예>

[87] 실시예 1: 형질전환 애기장대 식물을 이용한 *CaCcs* 프로모터 및 그의 절단체의 발현 양상과 활성 분석

[88] 형질전환 토마토 식물체의 열매(fruit)와 종자(anther)에서는 강한 발현을 나타내지만 꽃잎(petal)에서는 약한 발현을 나타내는 5' 상류 2.3kb *CaCcs* 프로모터의 유색체(chromoplast)-특이성을 바탕으로, 형질전환 애기장대 식물체의 꽃 기관에서 유색체-특이성에 필요한 조절 영역을 확인하기 위하여, GUS 리포터 유전자와 6개의 *CaCcs* 프로모터, 2,309bp(P6), 2,001bp(P5), 1,379bp(P4), 984bp(P3), 661bp(P2) 및 397bp(P1)를 포함하는 발현 벡터를 제작하였다(도 1). 10개의 형질전환 식물체를 생성하고 전장 *CaCcs*-P6 및 절단체 *CaCcs*-P5, *CaCcs*-P4, *CaCcs*-P2 및 *CaCcs*-P1로 유도된 발현양상을 확인하기 위해 조직화학적 GUS 분석을 수행하였다. 한편, *CaCcs*-P3에 의해 형질전환 식물체는 얻지 못하였다.

[89] 조직화학적 GUS 분석은 β -glucuronidase(GUS)가 발현된 조직에 기질인 X-gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide)과 반응시키게 되면, 청색(insoluble blue)을 띠므로써 GUS 유전자의 발현으로 프로모터의 발현 양상을 육안으로 쉽게 확인할 수 있다. 먼저 각각의 조직을 채취한 후, GUS 염색액에 조직을 침지시켜 37°C에서 하룻밤 배양한 후, 100% 에탄올로 고정하였다.

[90] 그 결과, 토마토 꽃에서 관찰되는 것과 달리, *CaCcs*-P6를 이용한 경우, GUS는 수술의 꽃밥 부위(anther)에서 약하게 발현되었으나, 꽃받침(sepal)에서는 높게 발현되었다. *CaCcs*-P5 내지 *CaCcs*-P2를 이용한 경우, GUS는 수술의 꽃밥에서 매우 강하게 발현되었으나 꽃받침에서는 거의 발현되지 않는 것으로 확인되었다. 한편, *CaCcs*-P1을 이용한 경우, GUS는 꽃받침뿐만 아니라 수술의 꽃밥(anther)과 수술대(filaments) 및 암술대(styles)에서도 강하게 발현되었다. 게다가, *CaCcs*-P1를 이용한 경우, 잎에서 진한 청색이 관찰됨으로써, 다른 프로모터에 비해 형질전환 애기장대 잎에서 GUS를 강하게 발현시키는 것으로 확인되었다. 이로써 *CaCcs*-P1가 비-유색체 조직인 잎과 꽃받침에서뿐만 아니라 유색체 조직인 수술의 꽃밥과 암술대에서도 GUS의 발현을 유도하는 전신 고발현 프로모터임이 입증되었다(도 2).

[91]

[92] 실시예 2. 형질전환 애기장대 식물체에서 *CaCcs*-P1과 *d35S*-P의 활성 비교[93] *CaCcs*-P1과 *d35S*-P의 전신 발현 활성을 비교하기 위하여, *CaCcs*-P1:Gus를 갖는

12개의 애기장대 식물체와 *d35S-P*를 갖는 15개의 식물체(T1)를 X-Gluc 용액을 이용하여 염색하였다. 모든 형질전환 식물체는 전체 기관 영역에서 GUS가 발현되기 때문에 유사한 정도의 청색을 나타내었다(도 3). 그 중에서 각각의 프로모터에서 가장 강한 청색을 띄는 5개의 라인을 선택하여 추가 성장 시킨 후(T2) GUS 활성 분석을 수행하였다. 그 결과, *CaCcs-P1*을 이용한 경우, GUS 유전자는 *d35S-P*에 비해 3 내지 31배 더 높은 발현 활성을 가지는 것으로 확인되었다(도 4).

- [94] 또한, *CaCcs-P1*에 의한 강한 전신 발현이 식물의 전체 성장 기간 동안 유지될 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 2개의 라인(*CaCcs-P1-4* 및 *CaCcs-P1-12*)의 4 및 5주 추가 성장 단계에서 조직화학적 GUS 염색을 수행하고 *d35S-P-5* 라인 및 *s35S-P-1* 라인을 이용한 경우와 비교하였다. *CaCcs-P1*을 이용하여 유도된 GUS 효소 활성 결과와 마찬가지로, 2개의 *CaCcs-P1* 라인(라인 4 및 12)에서 GUS 염색이 잎, 줄기, 뿌리 및 꽃을 포함하는 식물체 전체에서 식물 성장 3단계 동안 *d35S-P-5*에 비해 매우 강하게 관찰되었다(도 5).

[95]

[96] 실시에 3. 형질전환 애기장대 식물체에서 *CaCcs-P1*에 의한 전신 발현 분석

- [97] 기관 특이성을 바탕으로 프로모터 특성을 확인하기 위하여, *CaCcs-P1*에 의한 GUS 발현 활성을 반정량 RT-PCR 방법을 이용하여 *CaCcs-P1:Gus* 형질전환 애기장대 식물체의 각각의 기관, 잎(RL: rosette leave, C: cauline leave), 줄기(St: stem), 뿌리(R: root), 꽃(F: flower), 종자 꼬투리(Si: young siliqua), 및 성숙 종자(Se: mature seed)에서 비교하였다. 추가로, 로세트 잎에서 *CaCcs-P1*에 의한 GUS 전사체 수준을 *d35S-P-10* 라인 및 *d35S-P-5* 라인과 비교하였다.

- [98] 그 결과, *CaCcs-P1-4*에 의한 GUS mRNA의 발현 수준은 *d35S-P-10*에 비해 4배 이상 높은 것으로 확인되었다. *CaCcs-P1*의 활성은 식물체의 각각의 기관 중에서 줄기에서 가장 높은 것으로 확인되었으며, 그 다음 잎, 꽃, 뿌리, 종자 꼬투리 및 성숙 종자 순으로 나타났다(도 6).

- [99] 한편, *CaCcs-P1-4*와 *CaCcs-P1-12*에 대해 동일한 기관으로 GUS 분석을 수행한 결과, 약간의 차이는 있지만 두 프로모터 모두 거의 모든 기관에서 GUS 효소 활성을 증가시키는 것으로 확인되었다(도 7). 이로써, *CaCcs-P1*는 *d35S-P* 보다 강한 활성으로 모든 기관에서 외래 유전자 발현을 유도할 수 있으므로, 매우 효과적으로 사용될 수 있는 전신 발현 프로모터임이 입증되었다.

[100]

[101] 실시에 4. 형질전환 담배 식물체에서의 *CaCcs-P1*와 *d35S-P*의 활성 비교

- [102] 다른 식물체 시스템에서도 *CaCcs-P1*가 강한 프로모터로서 작용하는지 여부를 확인하기 위하여 안정하게 형질전환된 담배 식물체에서 이소성 GUS 발현을 수행하였다. *d35S-P*와 *CaCcs-P1*를 갖는 각각 12개 및 17개의 형질전환 식물체의 잎 절편(leaf disc)에서, 조직화학적 GUS 염색을 통해 보통의 발현을 나타내는 4개 및 8개 라인을 선택하여 그들의 GUS 효소 활성을 MUG 검사로 측정하여

비교하였다.

- [103] 그 결과, CaCcs-P1에 의한 GUS의 발현이 *d35S-P*에 비해 평균 1.4배 높은 것으로 확인되었으며, 이로써 *CaCcs-P1*이 애기장대 및 담배 식물체와 같은 다양한 쌍떡잎 식물에서 *d35S-P* 보다 더 강한 전신 프로모터로서 잠재성을 가짐이 입증되었다(도 8).

[104]

- [105] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[106]

서열목록 Free Text

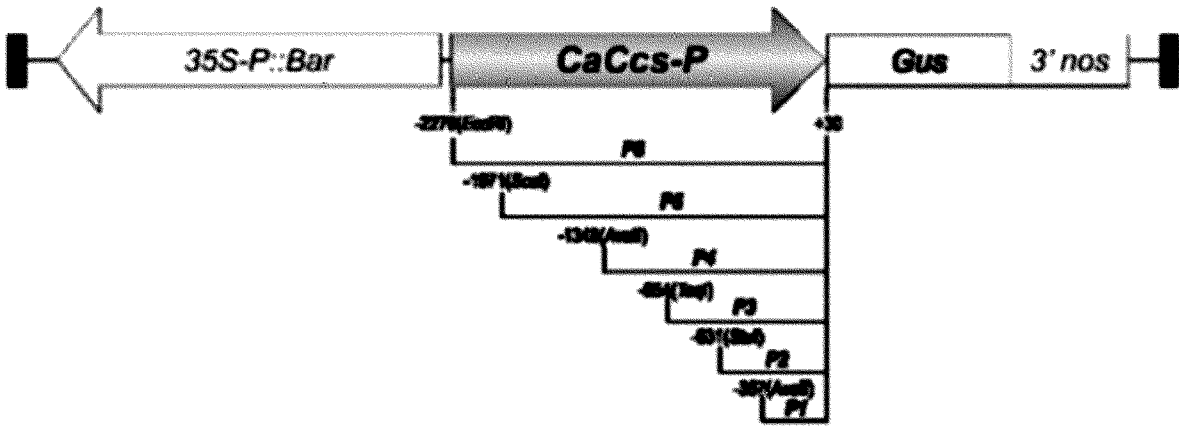
- [107] 서열번호 1: CaCcs-P6 염기서열

- [108] 서열번호 2: 서열번호 1의 1913 내지 2309(-367 내지 +30) 부위의 염기서열

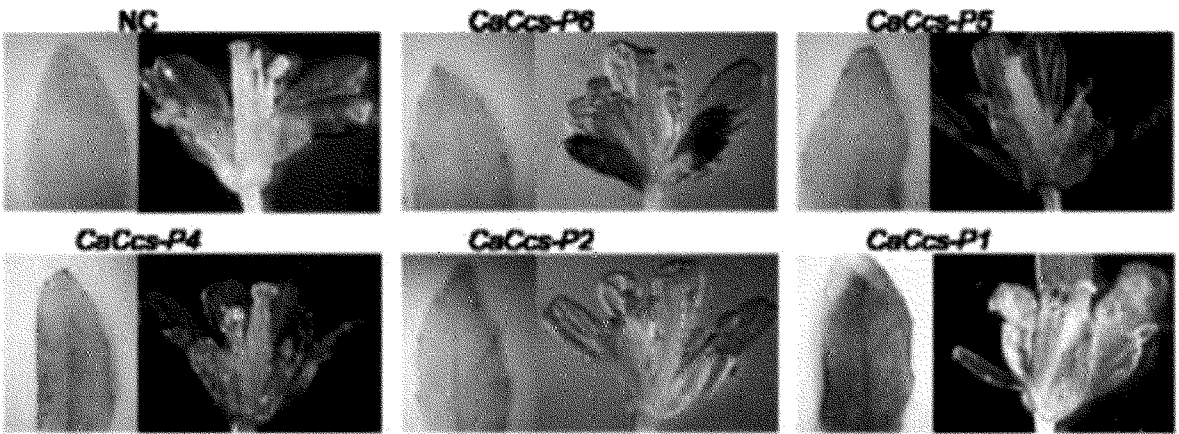
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 1913 내지 2309(-367 내지 +30) 부위의 염기서열을 포함하는 고추 캡산틴-캡소루빈 합성 효소 유전자(capsanthin-capsorubin synthase gene) 유래 식물 전신 발현 프로모터.
- [청구항 2] 제1항에 따른 식물 전신 발현 프로모터를 포함하는 발현 벡터.
- [청구항 3] 제2항에 따른 발현 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 형질전환 식물체는 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근, 셀러리, 유채, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것인, 형질전환 식물체.
- [청구항 5] 제1항에 따른 식물 전신 발현 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 식물체 전 조직에서 고발현시키는 형질전환 식물체의 제조 방법.

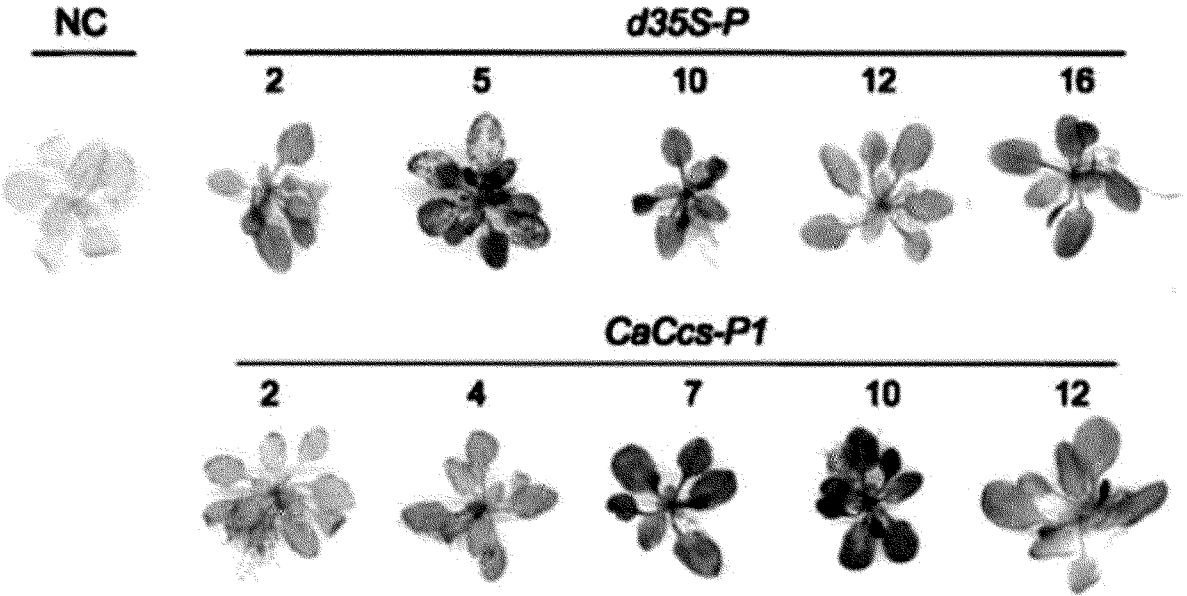
[Fig. 1]



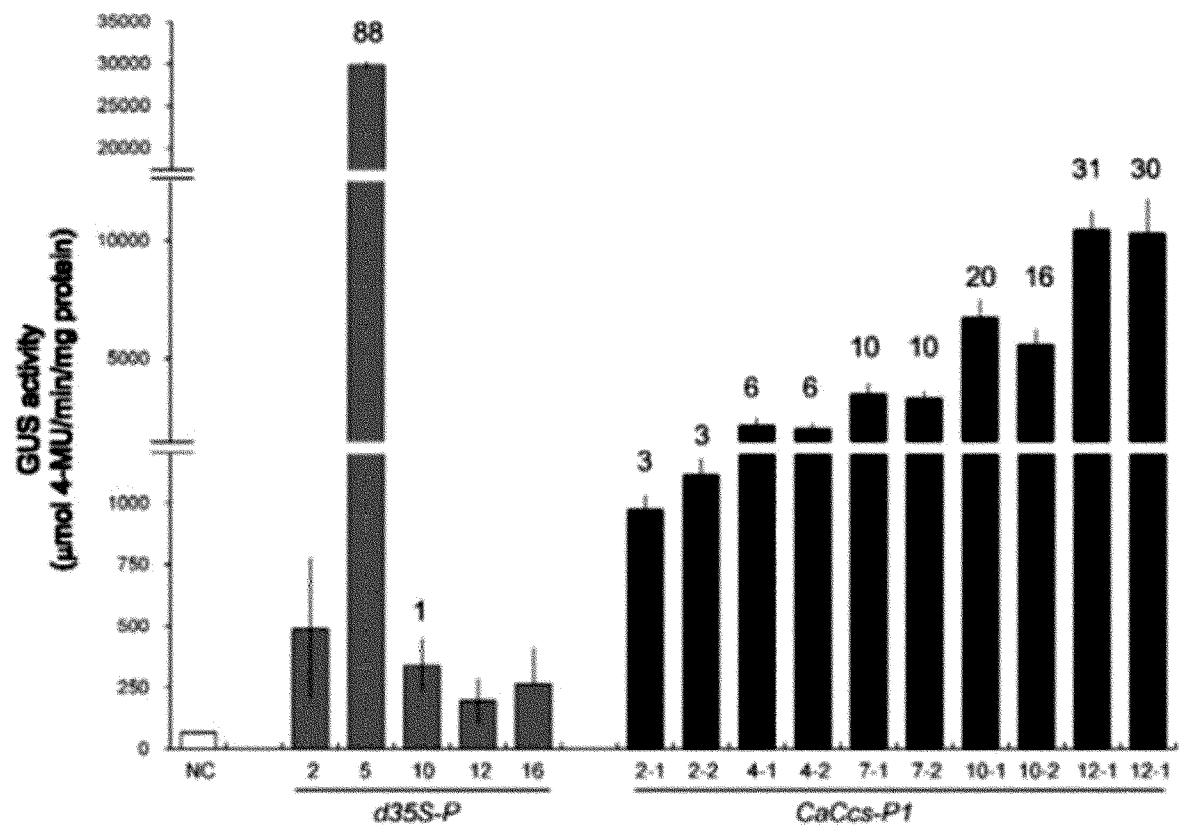
[Fig. 2]



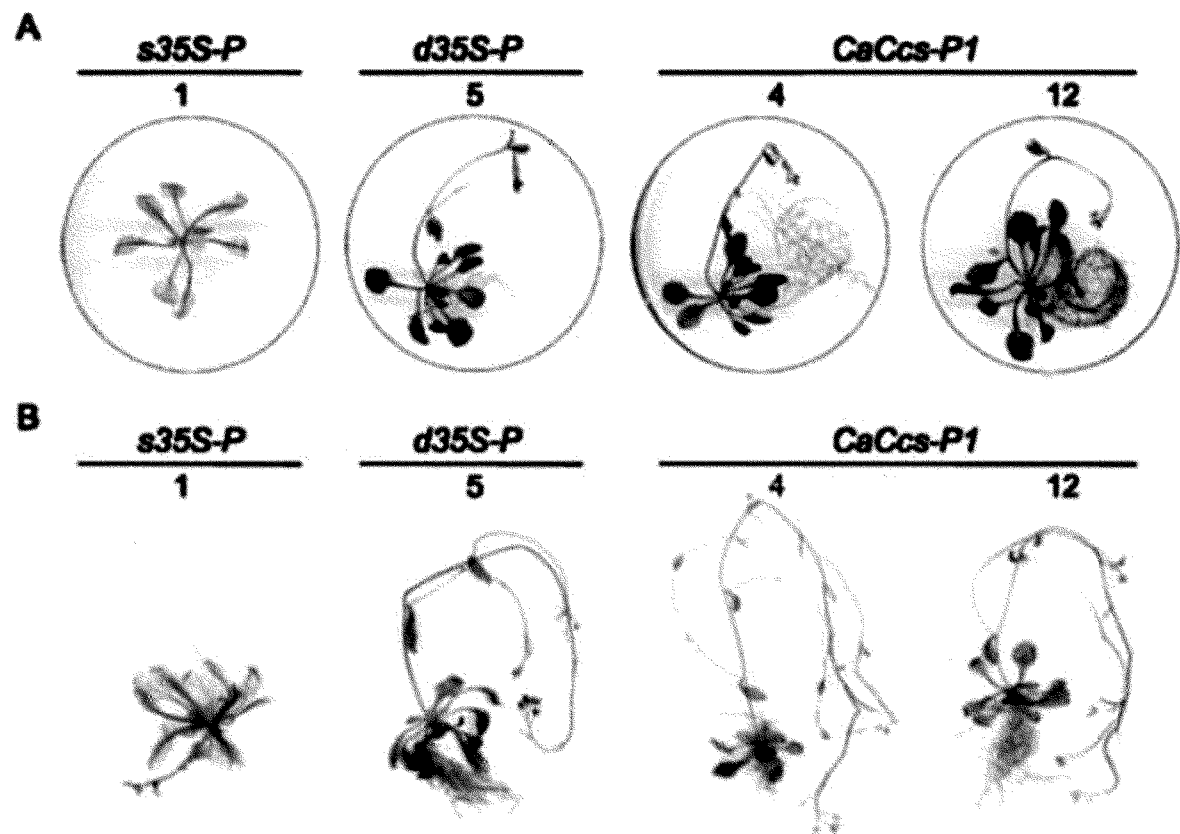
[Fig. 3]



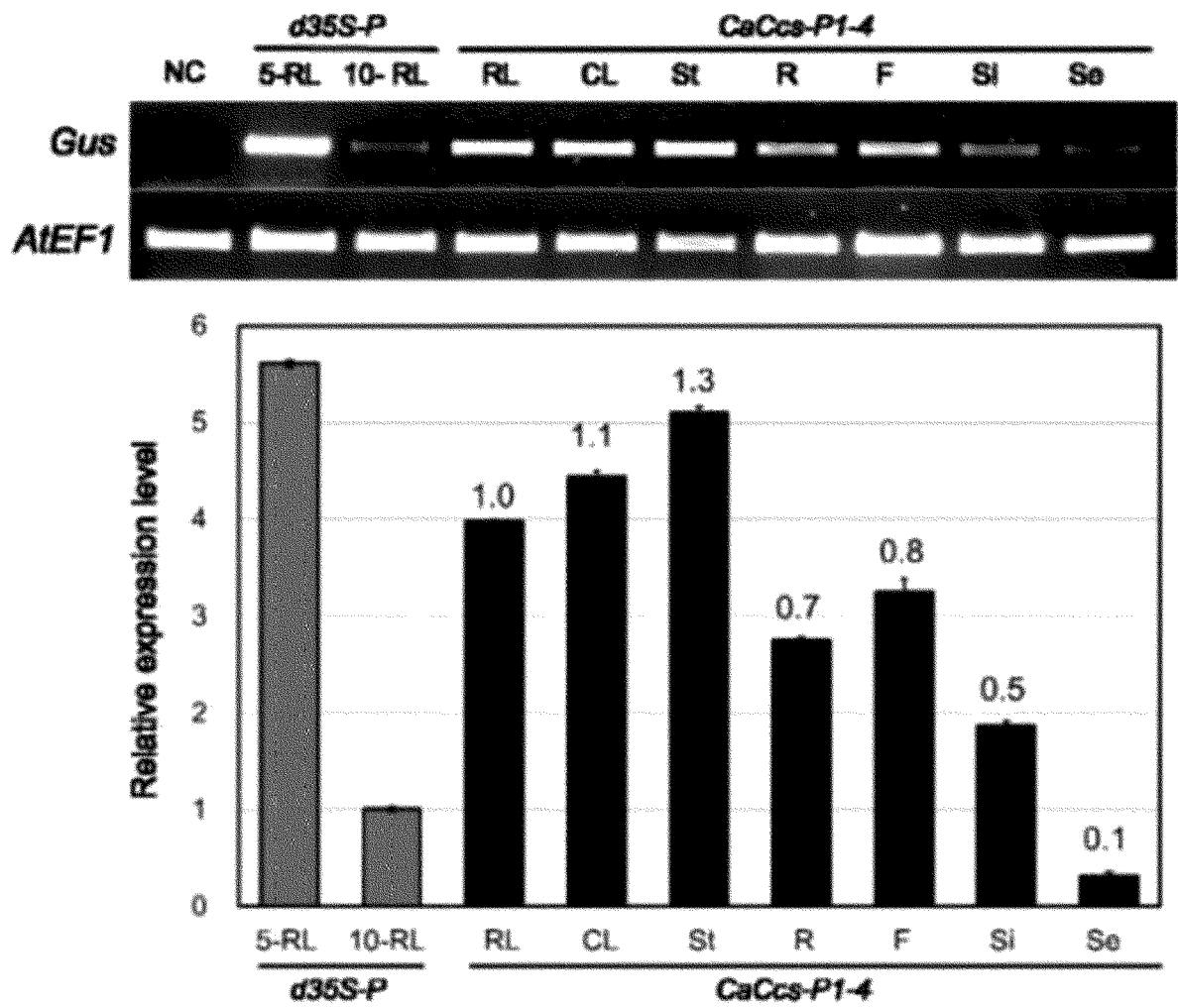
[Fig. 4]



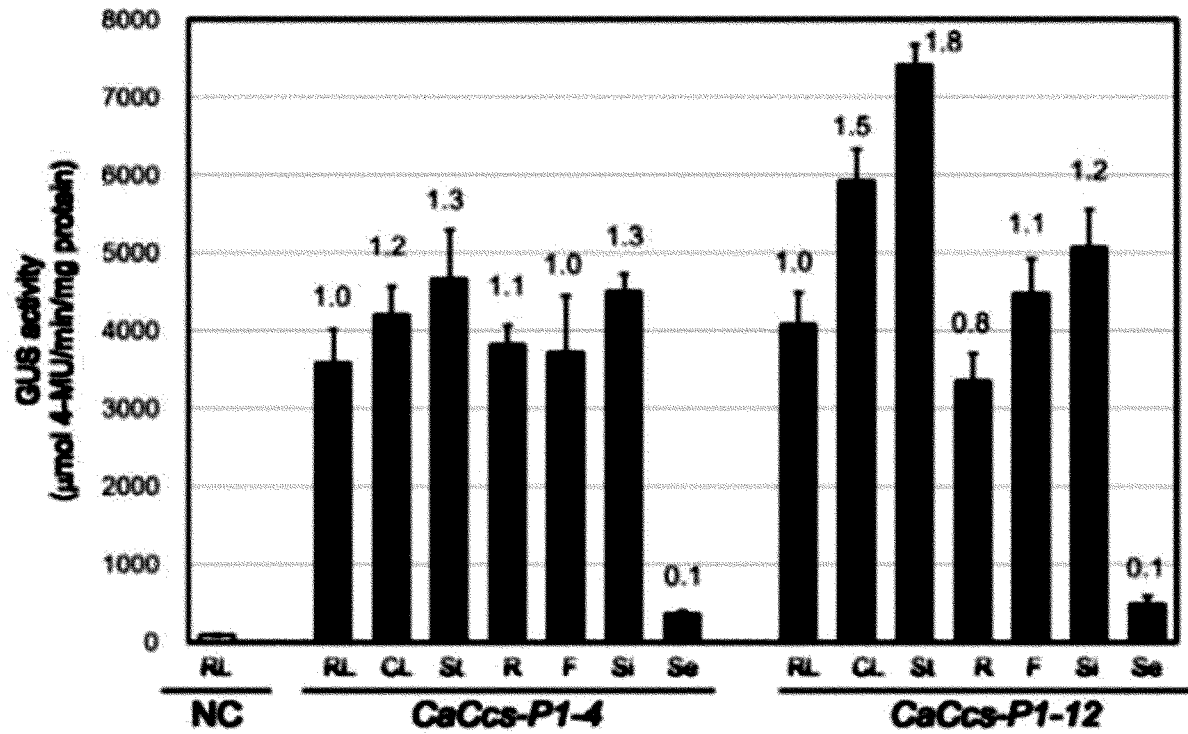
[Fig. 5]



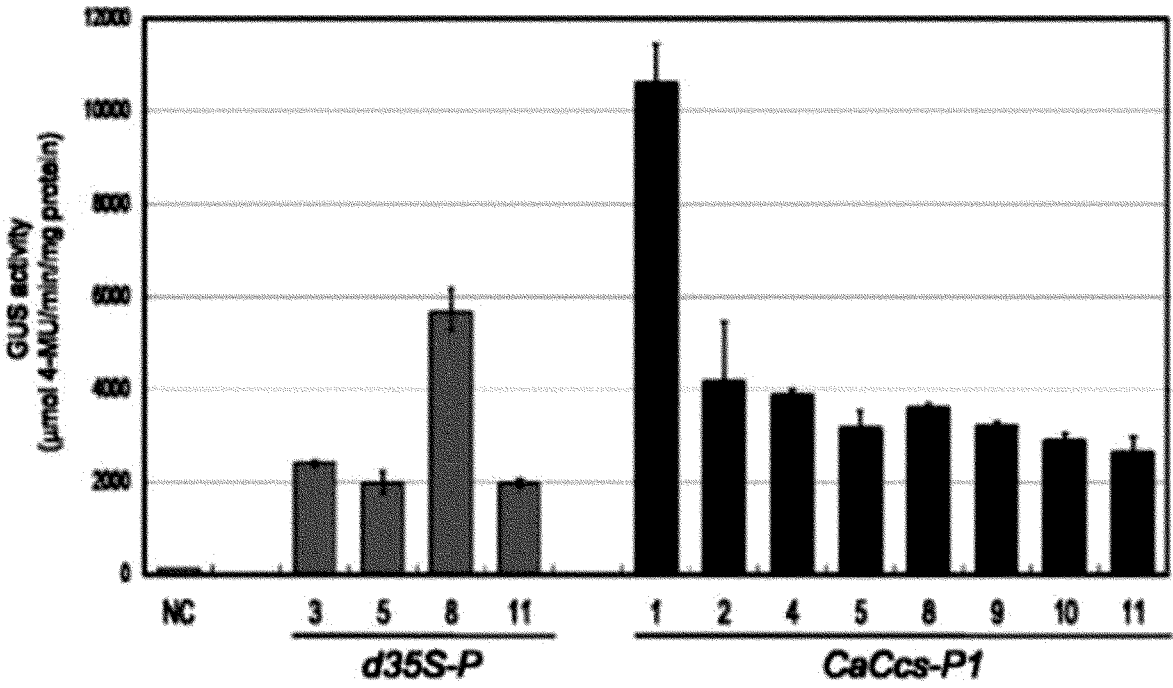
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/010640**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/82(2006.01)j***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/82; C12N 1/21; A01H 5/00; C12N 5/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: capsanthin-capsorubin synthase gene, constitutive promoter, expression vector, transgenic plant

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOUVIER, Florence et al., "Induction and Control of Chromoplast-specific Caro-tenoid Genes by Oxidative Stress", The Journal of Biological Chemistry, 13 November 1998, vol. 273, no. 46, pages 30651-30659 See abstract; page 30657, left column, line 11-right column, line 11; and figure 9.	1-5
A	AHRAZEM, Oussama et al., "The Expression of a Chromoplast-specific Lycopene Beta Cyclase Gene is involved in the High Production of Saffron's Apocarotenoid Precursors", Journal of Experimental Botany, 18 September 2009, vol. 61, no. 1, pages 105-119 See abstract; page 111, left column, line 25-right column, line 25; and figure 6.	1-5
A	US 2003-0131374 A1 (KUNTZ, Marcel) 10 July 2003 See abstract; claims 2-6; and figures 1-2.	1-5
A	HA, Sun - Hwa et al., "A Comparison of the Carotenoid Accumulation in Capsicum Varieties that Show Different Ripening Colours: Deletion of the Capsanthin-Capsorubin Synthase Gene Is Not a Prerequisite for the Formation of a Yellow Pepper", Journal of Experimental Botany, 28 August 2007, vol. 58, no. 12, pages 3115-3144 See abstract; page 3141, left column, line 26-right column, line 21; and figure 6.	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 MARCH 2016 (30.03.2016)

Date of mailing of the international search report

30 MARCH 2016 (30.03.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/010640

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1424123 B1 (REPUBLIC OF KOREA) 20 August 2014 See abstract; claims 1, 6; and figure 2.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/010640

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2003-0131374 A1	10/07/2003	AU 1998-91779 A1 AU 1998-91779 B2 EP 1017819 A1 JP 2001-518298 A US 6437221 B1 US 6953848 B2 WO 1999-016879 A1	23/04/1999 07/11/2002 12/07/2000 16/10/2001 20/08/2002 11/10/2005 08/04/1999
KR 10-1424123 B1	20/08/2014	KR 10-1424123 B1	20/08/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/82(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/82; C12N 1/21; A01H 5/00; C12N 5/04

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 고추 캡산틴-캡소루빈 합성 효소, 전신 발현 프로모터, 발현 벡터, 형질전환 식물체

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	BOUVIER, FLORENCE 등, 'Induction and Control of Chromoplast-specific Carotenoid Genes by Oxidative Stress', The Journal of Biological Chemistry, 1998.11.13., 273권, 46호, 페이지 30651-30659 요약; 페이지 30657, 좌측컬럼, 라인 11 - 우측컬럼, 라인 11; 및 도면 9 참조.	1-5
A	AHRAZEM, OUSSAMA 등, 'The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors', Journal of Experimental Botany, 2009.09.18., 61권, 1호, 페이지 105-119 요약; 페이지 111, 좌측컬럼, 라인 25 - 우측컬럼, 라인 25; 및 도면 6 참조.	1-5
A	US 2003-0131374 A1 (KUNTZ, MARCEL.) 2003.07.10 요약; 청구항 2-6; 및 도면 1-2 참조.	1-5
A	HA, SUN-HWA 등, 'A comparison of the carotenoid accumulation in Capsicum varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pppper', Journal of Experimental Botany, 2007.08.28., 58권, 12호, 페이지 3115-3144 요약; 페이지 3141, 좌측컬럼, 라인 26 - 우측컬럼, 라인 21; 및 도면 6 참조.	1-5

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 03월 30일 (30.03.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 03월 30일 (30.03.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

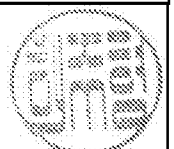
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1424123 B1 (대한민국) 2014.08.20 요약; 청구항 1, 6; 및 도면 2 참조.	1-5

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2003-0131374 A1	2003/07/10	AU 1998-91779 A1 AU 1998-91779 B2 EP 1017819 A1 JP 2001-518298 A US 6437221 B1 US 6953848 B2 WO 1999-016879 A1	1999/04/23 2002/11/07 2000/07/12 2001/10/16 2002/08/20 2005/10/11 1999/04/08
KR 10-1424123 B1	2014/08/20	KR 10-1424123 B1	2014/08/20