



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년09월01일
(11) 등록번호 10-0855508
(24) 등록일자 2008년08월26일

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0051614

(22) 출원일자 2007년05월28일

심사청구일자 2007년05월28일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020010081290 A

NCBI database accession no. 567271, GI:
18412703(2007.04.20.)

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김옥매

서울시 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대
학

권순재

서울시 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대
학

(74) 대리인

윤여강, 이문섭

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 김기연

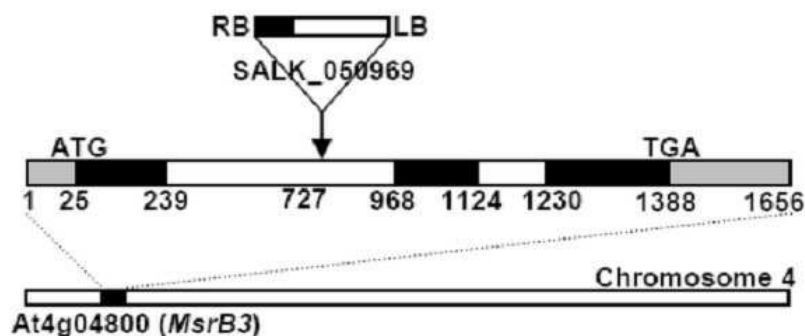
(54) 식물의 냉해 및 산화 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물

(57) 요약

본 발명은 식물의 냉해 및 산화 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 MsrB3 유전자 및 그 발현 단백질을 포함하는 식물의 냉해 및 산화 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 본 발명은 냉해 순응 과정에서 MsrB3 기능을 밝혀내어 냉해 저항성을 제공한다. 정상적인 야생형 식물과 달리, *msrb3* 돌연변이 식물은 냉해 전-처리한 후 냉각 온도에 대한 저항성을 나타내는 능력을 소실하였다. 게다가, 저온에 노출되었을 때, *msrb3* 식물은 야생형과 MsrB3 형질전환 식물들과 비교하여 MetO 및 H₂O₂ 함량과 전해질 누출에서 더 큰 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 MsrB3가 냉해 순응 동안 축적되는 MetO와 활성 산소를 제거함으로써 냉해 저항성에서 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

서열번호 2로 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 MsrB3 (Methionine sulfoxide reductase B3) 유전자를 숙주세포에 과발현시켜 식물에서의 냉해 및 산화 스트레스 저항성을 증진시키는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <17> 본 발명은 식물의 냉해 및 산화 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 MsrB3 유전자 및 그 발현 단백질을 포함하는 식물의 냉해 및 산화 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물에 관한 것이다.
- <18> 냉해 (또는 냉각) 조건은 잠재적으로 성장기를 제한하고 생산량과 생산율에 영향을 주는 작물 생산의 영향인자 중의 하나이다. 냉각 조건에서, 세포는 삼투현상에 의하여 세포의 얼음결정체가 형성되어 수분을 잃게 되며, 이러한 냉각-유도 탈수는 단백질 변성, 항산화제의 축적 및 막 기능장애를 포함하는 세포 손상을 초래한다 (Thomashow, 1999). 식물들은 저온에서 생존하는 능력이 크게 변화되고, 따라서 식물의 지리적 분포에 있어 성장에 제한을 받는다. 온대성 초본 (herbaceous) 식물들은 냉각되지 않는 저온에 노출되게 되면 냉각 저항성이 발달하게 되어, 이러한 과정을 ‘냉해 순응 (cold acclimation)’ 이라고 부르며, 따라서 -5℃ 내지 -30℃ 범위의 온도에서 생존할 수 있다 (Steponkus, 1984; Thomashow, 1998).
- <19> 냉해 순응은 일반적으로 프로그램 되어 있으며, 상기 과정은 복잡한 생화학 및 물리학적 변화를 포함한다 (Sharma et al., 2005; Shinozaki et al., 2003; Sung et al., 2003). 예를 들어, 프롤린, 베타인, 및 수용성 당류와 같은 친화성 대사산물 (compatible osmolytes)들은 친수성 환경을 유지하고 세포내 탈수에 대한 민감도를 감소시키기 위해 증가된다 (Ristic and Ashworth, 1993). 물리적 변화 이외에도, 냉해 순응 동안 유전자 발현 변화도 일어난다 (Hannah et al., 2005). 다양한 비생물적 스트레스하에서 애기장대의 광범위한 유전자 발현 프로파일들은 전체-길이 cDNA 마이크로어레이와 GeneChip arrays를 사용하여 모니터 되어왔다 (Fowler and Thomashow, 2002; Kreps et al., 2002; Seki et al., 2002). 전사체 (transcriptome) 분석은 다수의 건조-, 냉해-, 및 소금기-유도성 유전자들이 존재하여 스트레스-유도 신호전달 과정에 상호작용 (crosstalk)하고 있음을 보여주었다 (Knight and Knight, 2001). 몇몇 냉해-유도 유전자들은 단백질들을 코딩하며, 그 단백질들의 효소 활성은 지질 조성의 변화가 냉각 저항성을 일으킨다는 것을 암시한다 (Gibson et al., 1994; Hughes and Dunn, 1996). 냉해 처리는 또한 분자적 샤프론 (molecular chaperones)을 코딩하는 유전자들을 유도한다 (Sung et

al., 2001). 냉해 반응 (cold responsive, COR) 유전자들의 발현은 다양한 식물 중에서 냉해 저항성 및 냉해 순응 둘 다에 있어서 중요하다 (Thomashow, 1999; Xiong et al., 2002). 애기장대 전사 활성인자인, C-Repeat binding factors (CBFs) 또는 dehydration responsive element binding factors (DREBs)는 냉해 순응 시 유도되어 프로모터 영역에서 dehydration-responsive element (DRE)/C-repeat (CRT)에 결합을 통하여 많은 COR 유전자들을 증가-조절한다 (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998; Stockinger et al., 1997; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994). 삼투 반응성 유전자 1 (osmotically responsive gene 1, HOS1)의 고발현은 CBFs의 발현 조절을 통해 COR 유전자들의 네거티브 조절자로 확인되었다 (Lee et al., 2001). 게다가, 소수성 단백질 (Medina et al., 2001), 미토젠-활성 단백질 키나아제 (Jonak et al., 2002), 칼슘-의존성 단백질 키나아제 (Abbasi et al., 2004; Saijo et al., 2000), 칼시뉴린 B-유사 단백질 (CBLs), 및 CBL-결합 키나아제 (Cheong et al., 2003; Kim et al., 2003; Kolukisaoglu et al., 2004)를 포함하는 많은 신호 분자들은 냉해 처리에 반응하여 증가-조절된다.

<20> 다양한 환경 스트레스 조건하에서, 분자 산소가 부분적으로 환원될 때, 활성 산소 (reactive oxygen species, ROS)가 생성된 뒤 단백질, DNA, RNA, 탄수화물, 및 지질과 같은 세포내 구성요소에 손상을 초래한다 (Dat et al., 2000). 단백질들에서 Met 잔기들은 ROS에 의한 산화의 주요 타겟이며, Met sulfoxide (MetO)로 산화된다 (Vogt, 1995). MetO는 2개의 이성질체 (enantiomers), Met-S-sulfoxide (S-MetO)와 Met-R-sulfoxide (R-MetO)로 존재하는데, 이들은 각각 MetO 환원효소들, MsrA와 MsrB에 의해 환원된다 (Sharov and Schoneich, 2000). MsrA와 MsrB 둘 다는 대부분의 생물에 존재하고 산화 스트레스에 대한 세포내 반응에서 보호하는 기능을 한다. 이들의 일반적인 항산화 기능 이외에도, 축적된 데이터는 중요한 Met 잔기들의 비활성 MetO로의 가역적 변환 (reversible conversion)을 통해 Msr 효소들이 단백질들의 활성과 기능을 조절한다는 것을 제시한다 (Stadtman et al., 2003). 식물들에서, 주요 연구들은 MsrA에 초점이 맞춰져 왔으며, 펩티드 MetO 환원효소 (PMSR)라고 명명되었다. 식물에서 MsrA 활성의 초기 논증에 따르면 (Ferguson and Burke, 1992; Sanchez et al., 1983), 식물 MsrA는 *Brassica napus*에서 분리되었다 (Sadanandom et al., 1996). 애기장대 게놈은 적어도 조직과 세포에서 서로 다른 발현 패턴을 가진 5개의 pmsr 유전자를 포함한다 (Sadanandom et al., 2000). 시토솔 (cytosolic) PMSR2가 결핍된 null pmsr2-1 돌연변이의 연구들은 PMSR2가 밤새 산화된 단백질을 복구하는 역할을 해서, 식물 에너지와 탄소 자원을 보존한다는 것을 시사한다 (Bechtold et al., 2004). Romeo et al., (2004)는 PMSR4를 과발현 또는 발현부족 (underexpress)하는 형질전환 식물을 이용하여 산화 스트레스에 대하여 색소체 (plastidial) PMSR4의 보호하는 역할을 증명하였다. 그리고, MsrB의 연구들이 거의 없었지만, 9개의 MsrB 유전자, MsrB1 ~ MsrB9는 애기장대의 게놈 분석에서 최근에 동정되었다 (Vieira Dos Santos et al., 2005). 게다가, 2개의 색소체 MsrB 단백질, MsrB1과 MsrB2의 발현과 유도는 다양한 비생물 및 생물학적 스트레스하에 색소체 MsrA와 비교, 분석되었다.

<21> 본 발명에서, 본 발명자들은 애기장대 MsrB3의 기능을 분석하였다. 본 발명자들은 냉해 반응에서 MsrB3의 기능을 조사하기 위하여 MsrB3 T-DNA 삽입 돌연변이와 형질전환 식물을 사용하였다. 본 발명의 결과는 주로 냉해 순응 과정 동안 축적되는 MetO와 ROS 둘 다의 수준을 감소-조절함으로써 MsrB3가 냉각에 대하여 저항성을 부여한다는 것을 시사한다.

<22> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 본 발명의 MsrB3 유전자를 식물에 형질전환 시킬 경우, 냉해 및 산화 스트레스에 대한 저항성이 증가된 작물을 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<23> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 MsrB3 유전자를 포함하는 식물에서 냉해 및 산화 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물을 제공하는 데 있다.

<24> 본 발명의 다른 목적은 상기 식물의 냉해 및 산화 스트레스에 대한 저항성이 증가된 MsrB3 유전자를 포함하는 형질전환된 식물을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

<25> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 MsrB3 유전자 및 그 발현 단백질을 포함하는 식물의 냉해 및 산화 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물을 제공한다.

<26> 이전의 단백질체학적 분석으로부터, 본 발명자는 냉해-반응성 색소체 단백질 (표 2와 도 6)을 동정하였다. 엽록

체는 저온에 대하여 가장 민감한 세포기관 중 하나이다. 광합성 과정은 광 흡수 및 전자 흐름의 빠른 온도-독립적 광화학 반응과 에너지 소비의 느린 대사 반응으로 구성된다 (Morgan-Kiss et al., 2006). 저온은 에너지 소비의 비율을 감소시키고 전자전달체계 (electron transport chain)의 환원을 증가시킴으로써 이러한 두 반응 사이에서 불균형을 초래한다. PSII 여기 압력(excitation pressure)의 존재 하에서, H_2O_2 와 O_2^- 는 광산화적 손상(photooxidative damage)을 초래하는 산소 환원의 결과로서 형성된다 (Wise and Naylor, 1987). 따라서 저온-유도된 단백질들 역시 광합성에 관련되어 있을 가능성이 있다. RUBISCO (Yamasaki et al., 2002)와 산소방출복합체 (oxygen evolving complex; OEE1, OEE2)의 단백질들 (Nishitaka et al., 2006)은 PSII 전자 전달에 작용하고, sedoheptulose-1,7-bisphosphatase는 Calvin cycle에서 탄소 흐름을 조절한다 (Tamoi et al., 2006). 아마도 이 단백질들이 광산화에 대한 1차 타겟이 되기 때문에, 광합성 활성을 증가시키기 위해서는 새로운 합성(de novo synthesis)에 의해 대체되는 것을 필요로 한다. 홍미류계도, 번역의 연장 단계는 ROS에 의해 처음으로 나타나고 (Nishitaka et al., 2006), 색소체-특이적 연장인자인 EF-Tu는 스트레스 적응에 관련되어 있다 (Sin호 et al., 2004). 3-beta-hydroxy-delta5-steroid dehydrogenase 효소는 동물에서 활성 스테로이드계 호르몬의 형성을 촉진시킨다 (Simard et al., 2005). 엽록체 단백질체학의 최근 분석에서, 3-beta-hydroxy-delta5-steroid dehydrogenase는 고광 (high light)에 반응하여 아스코르브산염-부족한 돌연변이체 (ascorbate-deficient mutants)에서 증가-조절되어, 산화 스트레스 방어에 역할을 한다는 것을 보고하였다 (Giacomelli et al., 2006).

- <27> 색소체 단백질들 이외에도, 여러 세포질 단백질들이 저온에 의해 조절되는 것으로 나타났다. glutamine synthetase와 glutathione transferase는 산화 스트레스를 포함하는 생물 및 비생물적 스트레스에 반응하여 활성화된다 (Pageau et al., 2006; Dixon et al., 2002). 황 동화 (sulfur assimilation)에 작용하는 Acetylserine/O-acetylserine sulfhydrylase는 산화 스트레스, 황 부족, 및 중금속 노출에 의해 영향을 받는다 (Mendoza-Coza시 et al., 2005).
- <28> 본 발명의 조성물에서, 상기 MsrB3 유전자는 발현백터에 삽입 되어있는 것을 특징으로 하는 조성물인 것이 바람직하다.
- <29> 본 발명에 있어서, 상기 MsrB3 유전자를 발현하는 재조합 백터는 공지의 식물 발현용 백터를 기본 백터로 하여 제조될 수 있으며, 일반적인 바이너리 백터(binary vector), 코인테그레이션 백터(cointegration vector) 또는 T-DNA 부위를 포함하지는 않지만 식물에서 발현될 수 있도록 디자인된 일반 백터가 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에 이용될 수 있는 바이너리 백터는 *A. tumefaciens*의 Ti 플라스미드와 함께 존재 시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 BR과 BL을 함유하는 어떤 바이너리 백터도 될 수 있으며, 예컨대, pGA 계열, pCG 계열, pCIT 계열, pGPTV 계열, pBECK2000 계열, BiBAC 계열, 및 pGreen 계열 백터 등을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 용이하게 입수가 가능한 pBI121 (Clontech, Palo Alto, CA)을 사용하는 것이 좋다.
- <30> 상기 발현용 백터는 MsrB3 유전자가 도입된 식물체를 효과적으로 선발하기 위하여 GUS, GFP (green fluorescent protein) 및 LUX (luciferase) 등의 표지유전자 등을 포함할 수 있으며, 식물세포에서 목적유전자의 RNA 염기서열을 생산하게 하는 프로모터(promoter), 목적으로 하는 유전자의 정보를 가지고 있는 구조 DNA 염기서열 및 식물세포에서 RNA 염기서열의 3' 말단에 폴리아데닐화된 뉴클레오타이드 (polyadenylated nucleotide)를 생산하는 기능을 하는 3' 비전사 (nontranslated) DNA 염기서열 등으로 이루어진 구조를 적어도 하나 이상을 포함한다. 또한, 상기 백터는 리포터 분자 (예컨대, 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가로 포함할 수 있다.
- <31> 본 발명에 있어서, 상기 발현백터는 바람직하게는 도 10의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 한다.
- <32> 본 발명의 조성물에서, 상기 유전자의 발현 단백질은 냉해 및 산화 스트레스로 인해 세포내 축적되는 MetO와 ROS의 수준을 감소시키는 것을 특징으로 한다.
- <33> 식물들은 다양한 환경 조건에 적응하기 위하여 방어기작을 진화시켰다. 냉해 또는 냉각과 같은 온도 스트레스는 작물 생산량에서 감소의 주된 원인이다. 분자 수준에서, 온도 스트레스에 의한 ROS는 세포막과 단백질을 손상시키는 것으로 알려져 있다. 온도 스트레스 동안 세포 손상에 대한 다른 주요 유발인자 (contributor)는 고-광 스트레스 (high-light stress)인데, 이것은 세포내 기관(organelles)에서 ROS의 생산을 증가시키고 엽록체에 산화적 손상을 일으킬 가능성이 있다 (Niyogi, 1999). MetO 환원효소는 2가지 타입, MsrA와 MsrB가 있는데, MsrA의 기능과 활성은 광범위하게 연구되어 있는 반면 (Romero et al., 2004), 식물 MsrB에 초점을 맞춘 연구는 거의 없었다.

- <34> 본 발명에서, 본 발명자들은 식물의 비생물학적 스트레스 반응에서 MsrB3의 기능을 연구하기 위하여 MsrB3 T-DNA knockout 돌연변이 (*msrb3*)를 분리하고 MsrB3-과발현시킨 (35S::MSRB3) 형질전환 식물을 만들어냈다. *msrb3* 돌연변이 식물은 냉해 전-처리에 유도된 냉각에 대한 저항성에서 분명한 감소 (도 3)와 저온 노출 동안 MetO와 H₂O₂ 수준에서 증가 (도 4와 5)를 나타냈다.
- <35> 온도-민감성 표현형인 *msrb3* 식물들은 온도 스트레스 하에서 식물의 성장과 발달을 역효과를 나타내는 세포내 손상을 받는다는 것을 나타낸다. 본 발명자들은 냉해-처리된 *msrb3*에서의 전해질 누출이 냉해-처리된 야생형 및 35S::MsrB3 식물에서보다 현저하게 더 높다는 것을 증명하였다 (도 3a). 더욱이, 냉해-처리된 야생형 식물은 냉해-처리된 *msrb3*보다 냉각에 대한 저항성이 더 높았다 (도 3b). 이러한 결과는 MsrB3가 아마도 저온 조건하에서 냉해 순응의 과정 및 막 손상의 보호에 관련되어 있다는 것을 시사한다.
- <36> 또한, 제초제의 일종 (paraquat)으로 알려진 메틸 비올로겐 (methyl viologen, MV)은 농업에서 널리 사용되고 있는 것으로, MV는 광화학계 I (photosystem I, PSI)로부터 산소로의 전자의 이동을 촉진함으로써 MV의 독성 효과를 나타내는데, 이러한 전자의 이동은 O₂⁻를 생산한다. 최근, Msr 효소들은 산화 스트레스의 조건하에서 보호하는 역할을 하는 것으로 나타났고 (Moskovitz, 2005), 색소체의 MsrA를 발현부족 또는 과발현 시키고 다양한 산화 스트레스를 가한 형질전환 애기장대 식물에서 산화 스트레스에 대한 저항성과 MsrA와의 관련성을 보고하였다 (Romero et al., 2004). 본 발명에서, 엽록소 표백 테스트 (도 2)의 결과는 *msrb3* 식물이 야생형 또는 35S::MsrB3 식물보다 산화 스트레스에 더 민감하다는 것을 나타내고, MsrB3가 산화 스트레스에 대한 식물 반응에서 현저한 역할을 한다는 것을 나타낸다.
- <37> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 MsrB3 유전자가 삽입된 발현벡터로 형질전환된 식물을 제공한다.
- <38> 본 발명에 있어서, 상기 형질전환 식물은 본 발명의 MsrB3가 도입된 냉해 및 산화 스트레스 저항성이 증가된 식물을 말하는 것으로, 본 발명의 형질전환의 대상이 되는 식물체에는 특별한 한정을 요하지 않는다. 즉, 인간을 포함한 동물이 섭취할 수 있는 식용작물로 되어 있거나 될 수 있는 어떠한 단자엽 또는 쌍자엽 식물이어도 무방하다. 본 발명의 실시예에서는 그 예로서 단자엽 식물인 애기장대의 형질전환을 실시하였다.
- <39> 또한, 상기 형질전환 기술로서는 특히 이들에 한정되지 않지만 칼슘/폴리에틸렌 글리콜법을 이용한 원형질체의 형질전환법, 전기 천공법 및 미량주사법 또는 코팅된 입자 충격투입법 등의 소위 직접 유전자 형질전환법과, 바이러스 벡터 (예를 들면, 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV)로부터 얻음) 및 박테리아 벡터 (예를 들면, 아그로박테리움 속으로부터 얻음) 등의 벡터를 포함하는 형질전환 시스템이 이용될 수 있다.
- <40> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산을 코딩하는 MsrB3 유전자를 숙주세포에 과발현시켜 식물에서 냉해 및 산화 스트레스에 대한 저항성을 증기시키는 방법을 제공한다.
- <41> 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.
- <42> 본 발명자들은 (1) MsrB3 발현이 산화 스트레스에 대한 저항성을 증가시키고, (2) MsrB3 발현이 냉해 순응 과정 동안 유도되며, (3) 냉해 순응 동안 MsrB3 발현이 식물에서 냉각 저항성을 증가시키고, (4) 저온에 반응하여 증가된 MetO와 ROS 함량이 MsrB3의 발현에 의해 저해되며, 그리고 (5) MsrB3-의존성 방법에서 저온에 의해 조절되는 주요 단백질들은 엽록체에 위치한다는 것을 증명하였다. 이러한 관찰은 MsrB3가 저온 조건에서 유도된 ROS의 존재 하에서 축적되는 산화된 단백질을 복구함으로써 냉해 스트레스에 대한 저항성을 증가시킨다는 것을 나타낸다. 게다가, *msrb3* 식물에서 색소체 단백질들의 발현 변화는 MsrB3가 아마도 산화환원 반응을 조절하기 위하여 ROS의 주요 근원인 엽록체와의 상호작용 (crosstalk)에 관련되어 있다는 것을 시사한다.
- <43> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- <44> **실험예 1. 식물생장과 냉해 처리**
- <45> 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 생태형인 Columbia (Col-0)는 22℃에서 16시간-light/8시간-dark cycle에서 장주기 (long-day conditions)로 성장시켰다. T-DNA 삽입 돌연변이 *msrb3* (SALK_050969)는 ABRC (Columbus, OH)로부터 입수하였다. 냉해 처리는 3주간 성장시킨 식물을 3일 동안 4℃에서 처리하였다. 식물 샘플은 즉시 액체질소에서 얼리고 -70℃에서 보관하였다.

<46> 실험예 2. 애기장대에서 MsrB3의 과발현

<47> 바이너리 벡터 (Binary vector)인 pBI121 (Clontech, Palo Alto, CA)의 β -glucuronidase gene에 *Xba*I과 *Sac*I sites 사이에 MsrB3-코딩 영역을 치환하였다 (도 10참조). MsrB3의 특이 프라이머들은 다음의 과정에 따라 클로닝에 사용되었다 (제한효소 자리는 밑줄로 표시).

<48> forward primer: 5'-GAT TAT AAA TCT AGA TTT ATT GAT GAA CAT CG-3'

<49> reverse primer: 5'-CCA CTC ACT TGA GCT CAA AAA TCC AGA G-3'

<50> 이 구성체를 *Agrobacterium tumefaciens* 균주인 GV3101를 이용하여 진공침윤 (vacuum infiltration) (Bechtold and Pelletier, 1998) 방법에 의해 애기장대에 형질전환 되었다. 형질전환식물 (T1)은 카나마이신 (kanamycin) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$)을 포함한 MS 배지에서 선별하였다. 동형접합 계통 (homozygous line) (T3)은 카나마이신 저항성에 대한 분리 비를 통해 확인하였다.

<51> 실험예 3. 유전자의 Southern 분석

<52> 게놈 (Genomic) DNA를 제조업자의 사용설명서에 따라 DNAzol (MRC, Cincinnati, Ohio)에 의해 추출하고 *Eco*RI 또는 *Hind*III로 처리하였다. 10 마이크로그램의 샘플을 1.2% 아카로즈 겔상에서 분리하였고, positively charged nylon membrane (Hybond N+; Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)에 blot한 후, cross-linker (Model 2400, Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 고정하였다. DNA 프로브 (probe)는 PCR에 의해서 만들어진 T-DNA의 left border의 부분적인 sequence를 함유하고 있다. 사용된 프라이머는 다음과 같다:

<53> 5'-GCT GCC TGT ATC GAG TGG TGA TTT TGT-3'

<54> 5'-TCC TTT CGC TTT CTT CCC TTC CTT TCT C-3'

<55> 혼성화 (Hybridization)는 60°C 24시간 동안 진행되었다. 혼성화 후에, membrane을 1 X SSC/0.1% SDS로 세척한 후, 0.5 X SSC/0.1% SDS, 그리고 마지막으로 0.1% SSC/0.1% SDS로 세척하였다. 혼성화 밴드를 autoradiography로 시각적으로 확인할 수 있게 하였다.

<56> 실험예 4. RNA 분석

<57> RNA는 Tri reagent (MRC, Cincinnati, Ohio)의 제조사의 사용설명서에 따라 분리하였다. RNA gel blot 분석을 위해, 총 30 μg 의 RNA를 1.2% 포름알데히드-아가로즈 겔 (formaldehyde-agarose gel)에 전기영동하고, nylon membrane에 옮겼다. 동량의 ethidium bromide staining에 의해 확인되었다. 혼성화는 65°C에서 24시간 동안 rapid-hyb buffer™ (Amersham Pharmacia)에서 수행되었다. MsrB3-특이 프로브는 다음의 프라이머를 사용하여 PCR방법에 의해 증폭되었다.

<58> 5'-TTG ATG AAC ATC GTC AAT TCA AAG-3'

<59> 5'-CAG TTG TTG TCA AAA TGC TCG AGG-3'

<60> 혼성화 후에, membranes를 2 X SSC/0.1% SDS, 1 X SSC/0.1% SDS, 그리고 0.1% SSC/0.1% SDS로 세척하였다. 혼성화된 RNA 밴드를 autoradiography에 의해 시각적으로 확인할 수 있게 하였다. RT-PCR은 총 0.1 μg 의 RNA를 이용하여 RT-PCR system (Promega, Madison, WI)에 의해 수행되었다. 사용한 프라이머는 다음과 같다.

<61> [MsrB3]

<62> 5'-TTG ATG AAC ATC GTC AAT TCA AAG-3'

<63> 5'-CAG TTG TTG TCA AAA TGC TCG AGG-3'

<64> [Actin1]

<65> 5'-GGC GAT GAA GCT CAA TCC AAA CG-3'

<66> 5'-GGT CAC GAC CAG CAA GAT CAA GAC G-3'

<67> 실험예 5. 엽록소 (Chlorophyll) 함량의 결정

<68> 성장기간이 3주된 식물체의 잎들은 0.1%의 Tween20과 15 μM 의 MV (Sigma, St. Louis, MO)가 포함된 액상 MS 배지에서 배양되었다. 30시간 후, MV에 대한 잎들의 민감성은 시각적으로 판단되었다. 엽록소의 함량을 측정하기

위해 잎들은 95% 에탄올에 담근 다음 80℃에서 20분간 배양되었다. 흡광도는 648nm (A_{648})와 665nm (A_{665})에서 측정되었으며, 엽록소 함량은 다음 공식에 따라 계산되었다.

<69> 엽록소의 $\mu g = (13.36 \times A_{664}) - (5.19 \times A_{648}) + (27.43 \times A_{648}) - (8.12 \times A_{664})$ (Lichtenthaler, 1987).

<70> **실험예 6. 냉각 저항성과 전해질 누출 시험**

<71> 냉각 저항성의 분석은 이전에 기술된 방법으로 수행 되었다 (Zhu et al., 2004). 추위에 순응시킨 식물체와 순응시키지 않은 식물체를 다음과 같은 냉각온도 변화를 일으키도록 설계된 챔버에 방치하였다: 30분 내에 4에서 -2℃로 냉각 후, -2℃에서 1시간 동안 냉각. 그 후, 원하는 최종 냉각온도까지 이르도록 연속적으로 2℃씩 감소시켰다 (Zhu et al., 2004). 냉각 후, 식물체들은 22℃ 성장 챔버에 다시 두었다. 냉각 처리 1주일 후 사진을 찍었다.

<72> 전해질 누출 시험을 위해, 저온 처리한 식물체와 저온 처리하지 않은 식물체의 4번째와 5번째 잎들을 다양한 온도에서 냉각시킨 후 이전에 기술된 방법 (Lee et al., 1999)으로 이온누출 (ion leakage)을 분석하였다.

<73> **실험예 7. Methione Sulfoxide 함량의 결정**

<74> 이전에 기술된 (Levine et al., 1996) 것과 같이, 단백질의 MetO 수치(수준)를 결정하기 위해서 cyanogens bromide (CNBr) cleavage로 처리하였다. CNBr는 MetO가 아닌 Met 잔기들의 carboxyl 부위에 있는 펩티드 결합을 자르면서 homoserine을 산출해 낸다. CNBr를 처리한 시료와 처리하지 않은 샘플은 염산으로 펩티드 가수분해를 일으키도록 하여 아미노산 분석을 하였으며, MetO의 양을 최고점 아래 부분의 집중(적분법)에 의해서 결정하였다.

<75> **실험예 8. H_2O_2 탐침**

<76> 기질로서 DAB (Sigma, St. Louis, MO)을 사용하여 애기장대의 잎들에서 H_2O_2 를 시각화 하였다 (Murgia et al., 2004). 잎들은 DAB 용액 (1 mg/mL^{-1})에 암조건으로 24시간 두었다. 잎들은 즉시 멸균수로 두 번 씻어 96% ethanol이 들어있는 falcon 튜브로 옮겼다. 그 Falcon tube들을 잎의 엽록체가 완전히 제거될 때까지 끓는 물에 10분에서 20분 동안 두었다. 잎들을 다시 96% ethanol에 옮기고 사진을 찍었다.

<77> **실험예 9. 2-D 겔 전기영동**

<78> 3주 성장시킨 식물을 액체질소에 넣어 급게 갈은 후 추출 버퍼 (50 mM Tris, pH 8.0, 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 200 mM PMSF, 2 mM DTT, and protease inhibitor cocktail)를 넣은 후 4℃에서 2시간 동안 배양하였다. 8,000 g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮긴 후 말렸다. 그 단백질을 isoelectric focusing sample 버퍼 (7 M urea, 2 M thiourea, 2% 3-[(3-cholamido propyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate, 1% carrier ampholytes, 20 mM DTT, and 0.001% bromophenol blue)를 넣어 잘 풀어준 뒤 immobilized pH gradient strips (180 mm, pH 4-7) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에 12시간 동안 적용시켰다. Isoelectric focusing은 IPGphor system (Amersham Biosciences)에서 총 30,000 내지 40,000 voltage hours (Vhr)로 하였다. 일련의 과정들은 Amersham Biosciences의 제조지시에 따랐다.

<79> **실험예 10. MALDI-TOF MS와 데이터 검색**

<80> 펩티드 샘플들은 Lee et al., (2004) Plant Cell 16, 1378-1391에서 제시한 방법으로 준비되었다. 펩티드 질량은 MALDI-TOF MS 시스템 (Voyager-DE STR; Applied Biosystems)으로 측정되었고 그 finger print 데이터는 MS-Fit 프로그램을 사용하여 NCBI의 non-redundant database에서 일치시켰다. 분석은 mass tolerance 50 ppm, 불완전한 cleavage 1개로 설정하였다. N 말단부위의 acetylation, carbamidomethylation에 의한 Cys의 alkylation, Met의 oxidation, 그리고 N 말단부위 Gln의 pyroGlu 형성은 모두 가능한 변형으로 설정하였다. 분자량과 pI는 각각 10~200 kDa와 4~7로 설정하였다. 예상된 단백질은 5가지 펩티드 일치와 15%이상 서열일치, 분자량 탐색수 103 이상일 때 동일함을 확실시하였다.

<81> **실시예 1. 애기장대의 MsrB3 단백질과 같은 냉해 스트레스-반응성 단백질의 동정**

<82> 이전의 단백질체학적 연구에서, 다수의 냉해 스트레스-반응성 단백질이 분리되었다 (Bae et al., 2003). 이 중, NCBI 데이터베이스에 추정 전사 억제인자 (putative transcriptional repressor)(accession No. 7267238)로 명명된 단백질을 더 특성화 하기위해 선택하였다. 본 발명자는 추정 전사 억제인자에 대응하는 유전자의 전체 코

딩 영역을 동정하기 위하여 게놈을 분석하여, 염색체 4에 밀집되어 있는 관련된 유전자들을 찾았다.

<83> **실시예 2. MsrB3 T-DNA 삽입 돌연변이와 형질전환 식물**

<84> 생체 내 MsrB3의 기능을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 MsrB3 T-DNA 삽입 돌연변이에 대하여 Salk Institute insertion sequence database를 검색하였다. 본 발명자들은 MsrB3의 첫 번째 인트론에서 T-DNA 삽입을 포함하는 *msrb3* 돌연변이체를 얻었다 (도 1a). 돌연변이체 시드 (seeds)는 3:1 분리비를 가지는 single T-DNA 삽입에 대하여 본래 이형접합 (heterozygous)이었다. 이형접합 계통은 스크리닝의 다음 세대에서 확인되었다. T-DNA 삽입의 정확한 위치를 확인하기 위하여, MsrB3의 게놈 DNA 단편들과 T-DNA 접합부 (junction)를 증폭하고 시퀀싱하였다 (도 1a). 또한, DNA gel blot 분석은 single T-DNA 삽입이 이 계통에 존재함을 나타내었다 (도 1b). RNA 분석은 상기 이형접합 돌연변이가 야생형 식물에서와 달리 MsrB3 전사체들을 발현하지 못하였으며, MsrB3 발현은 냉해 처리로 유도되었음을 설명한다 (도 1c). 본 발명자들은 꽃양배추 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터의 조절 하에서 MsrB3이 과발현된 MsrB3 형질전환 식물 (35S::MsrB3)을 만들었다. 6개의 T3 이형접합 계통을 발견하였으며, 그 중 하나는 강력한 MsrB3 발현을 나타내었다 (도 1d). 상기 MsrB3 T-DNA 삽입 돌연변이체 및 형질전환 식물은 정상 성장기간 동안 야생형 (Col-0) 식물과 구분할 수 없었다.

<85> 도 1a는 MsrB3에 대응하는 게놈 영역의 개략도이다. T-DNA 삽입 (화살표), 시작코돈 (ATG), 및 종결코돈 (TGA)의 위치를 표시하였다. 게놈 MsrB3 서열은 엑손 (검정색), 인트론 (흰색), 및 UTRs (회색)로 나타내었다. T-DNA 정위 (orientation)는 좌측경계 (LB) 및 우측경계 (RB)로 나타내었다. 숫자는 MsrB3의 뉴클레오티드들을 나타낸다. 도 1b는 야생형 (WT)과 *msrb3* 식물들에서 T-DNA 삽입의 DNA gel blot 분석을 나타낸다. 게놈 DNA를 HindIII (H)와 EcoRI (E)로 절단하고, blot을 T-DNA 좌측경계-특이 DNA로 탐침하였다. 도 1c와 d는 WT, *msrb3* (C), 및 35S::MSRB3 (D) 식물에서 MsrB3 발현의 RNA 분석을 나타낸다. RNA gel blot 분석을 30 µg의 total RNA를 사용하여 수행하였다; ethidium bromide-염색된 rRNA를 로딩 대조군으로서 사용하였다. 냉해 처리를 위해, 식물들을 4°C로 옮기고 72시간 동안 방치하였다. LT는 냉해-처리를 나타낸다.

<86> **실시예 3. *msrb3* 및 35S::MsrB3 식물의 산화 스트레스에 대한 반응**

<87> Msr 효소가 산화 스트레스에 대하여 보호하는 역할을 한다고 알려져 있으므로 (Moskovitz, 2005), 산화 스트레스-유도제인 메틸 비올로겐 (methyl viologen, MV)의 저항성에 대하여 *msrb3* 및 35S::MsrB3 식물들을 시험하였다. 야생형, *msrb3* 및 35S::MsrB3 식물의 잎들을 MV (15 µM)가 있는 상태에서 배양하여, 엽록소의 표백 (bleaching)을 시험하였다 (도 2a). 엽록소 함량의 수준은 야생형과 35S::MsrB3 식물들에서 각각 약 70%와 63% 만큼 감소하였다. MV로 처리는 *msrb3* 식물에서 더 높은 손실 (85% 감소)을 초래하였다 (도 2b). 이것은 MV-매개 산화 스트레스에 대한 반응에 있어 *msrb3*와 35S::MsrB3 식물들에서의 엽록소 함량은 야생형과 비교할 때 각각 57%와 123%에 달한다.

<88> 도 2a는 MV 처리에 의해 유도된 표백 표현형을 나타낸다. 야생형, *msrb3*, 및 35S::MsrB3 식물들의 잎들을 15 µM MV를 포함하는 MS 배지에서 30분간 배양하였다. 도 2b는 MV에 노출된 식물들에서 엽록소 함량의 측정을 나타낸다. 본 발명의 실시예에 기술된 바와 같이 야생형, *msrb3*, 및 35S::MsrB3 식물들에서 엽록소 함량을 측정하였다. 데이터는 세 번의 독립된 실험들의 평균 및 표준편차로 나타낸다.

<89> **실시예 4. *msrb3* 및 35S::MsrB3 식물의 냉해 스트레스에 대한 반응**

<90> MsrB3가 냉해 스트레스-반응성 단백질을 처음으로 확인되었기 때문에, 그것의 기능을 냉해 스트레스 반응에서 평가하였다. 본 발명자들은 먼저 전해질 누출의 분석을 이용하여 야생형, *msrb3* 및 35S::MsrB3 식물들의 냉각 내성 (freezing tolerance)을 시험하였다 (도 3a). 전해질 누출 시험을 냉해 처리 식물과 냉해 처리하지 않은 식물 모두의 잎에 적용시켰으며, 총 50% 이온 누출이 일어나는 온도 (LT₅₀)를 측정하였다 (lee et al., 1999). 냉해-유도된 순응 (cold-induced acclimation)은 야생형의 LT₅₀을 4.3°C만큼 (-5.1°C에서 -9.4°C), *msrb3* 식물은 2.6°C만큼 (-4.8°C에서 -7.4°C) 감소시켰으므로, *msrb3* 돌연변이가 냉해-순응 과정에서 결점이 있다는 것을 의미한다 (도 3a). 35S::MsrB3 식물은 야생형과 유사한 LT₅₀을 가졌다 (도 3a). 그 다음, 냉각 내성 시험은 본 발명의 실시예에서 기술된 것처럼 전체 식물들을 이용하여 수행되었다. 야생형 식물은 냉각에 민감하였지만, 냉해 전처리에 대해서 -7°C에서 생존하는 저항성을 갖게 되었다. 이와 대조적으로, *msrb3* 식물에서 관찰된 냉각 저항성은 냉해-전처리 하였을 때도 증가되지 않았다. 이러한 결과는 MsrB3가 냉해 순응 과정에서 중요한 기능적 역할을 한다는 것을 나타낸다.

<91> 도 3a는 전해질 누출 시험을 나타낸다. 냉해-순응 식물 및 순응시키지 않은 야생형, *msrb3*, 및 35S::MsrB3 식물

들의 잎들을 지시된 온도에서 냉각에 따른 이온 누출에 대하여 분석하였다. 각 데이터 점은 세 번의 독립된 실험들의 평균 및 표준편차로 나타낸다. 도 3b는 냉각 저항성 테스트를 나타낸다. 냉해-순응된 및 순응되지 않은 야생형과 *msrb3* 식물들을 -7℃에서 2시간 동안 냉각한 후, 정상 성장 조건 (22℃)으로 다시 옮겼다. 22℃에서 다시 성장시킨 후 7일째에 사진을 찍었다. NA는 순응시키지 않음, CA는 냉해-순응시킴을 나타낸다.

실시예 5. *msrb3*와 35S::*MSRB3* 식물에서 Met Sulfoxide 및 활성 산소의 수준

H₂O₂ 처리 및 저온에 반응하여 야생형, *msrb3* 및 35S::*Msrb3* 식물에서 metO 수준을 시험하였다 (도 4). 정상 성장 조건하에서는 모든 식물들에서의 metO 수준은 낮았지만, 식물들을 H₂O₂로 처리하였을 때는 증가하였다. *msrb3* 식물에서 더 크게 증가하였는데, H₂O₂ 처리에 대해서 야생형 식물 (11.7%)과 비교하여 *Msrb3* (19.2%)는 발현되지 않았다. 증가된 metO 수준은 냉해-처리된 식물들에서도 관찰되었고, 상기 증가는 야생형 식물 (3.3%) 및 35S::*Msrb3* 식물 (2.7%)과 비교할 때 냉해-처리된 *msrb3* 식물 (10.5%)에서 더 현저하였다. metO 함량은 야생형에서 16.5-fold 만큼 증가하는 반면, *msrb3*와 35S::*Msrb3* 식물에서는 각각 35-fold와 9-fold 만큼 증가하였다 (표 1). 이러한 결과는 metO이 저온 조건하의 식물에서 축적되며, *Msrb3*가 metO 함량에서 감소의 원인이 된다는 것을 나타낸다.

[표 1]. 저온 처리 (LT)되거나 처리되지 않은 (Control) 식물에서 MetO의 분석

Plants	% MetO		
	Control	LT	Fold increase
WT	0.2	3.3	16.5
<i>msrb3</i>	0.3	10.5	35.0
35S:: <i>Msrb3</i>	0.3	2.7	9.0

% MetO는 도 4로부터 총 Met (Met + MetO)의 MetO 퍼센트이다. fold-increase는 LT 처리되지 않은 식물에 상대적인 LT 처리된 식물에서의 MetO 함량으로 계산되었다.

도 4는 H₂O₂와 냉해 처리에 노출된 식물들에서 MetO 함량을 나타낸다. 본 발명의 실시예에 기술된 바와 같이 H₂O₂와 저온 (4℃에서 3일간)으로 처리되거나 되지 않은 야생형 (흰색), *msrb3* (회색), 및 35S::*Msrb3* (검정색) 식물들의 잎에서 MetO 수준을 측정하였다. MetO 함량은 총 Met와 비교하여 MetO의 퍼센트로 나타내었다. 데이터는 세 번의 독립된 실험들의 평균 및 표준편차로 나타낸다. H₂O₂ 0h는 H₂O₂ 처리에 대한 대조군, LT 0d는 저온 처리에 대한 대조군, H₂O₂ 6h는 H₂O₂-처리, 및 LT 3d는 냉해-처리를 나타낸다.

다음으로 본 발명자들은 증가된 metO 수준이 ROS의 축적과 관련되는지를 시험하였다. 3,3-diamino-benzidine (DAB)를 사용하여 식물들의 잎에서 H₂O₂를 시각적으로 검출하였다. 정상 조건하에서, 눈에 띄는 H₂O₂ 축적은 관찰되지 않았다 (도 5). 냉해 처리는 *msrb3*에서 H₂O₂의 큰 축적을 초래하였고 야생형 식물에서는 약간 축적하였다. 이러한 데이터는 ROS의 축적 또한 Msr 활성에 의해 영향을 받는다는 것을 나타내었다.

도 5는 냉해 처리에 노출된 잎들에서 H₂O₂의 조직화학적 분석을 나타낸다. 저온 (4℃에서 3일간; LT)에 노출되거나 처리하지 않은 (대조군) 야생형, *msrb3*, 및 35S::*Msrb3* 식물들의 잎들을 본 발명의 실시예에서 기술된 바와 같이 DAB로 염색하였다. 데이터는 세 번의 독립된 실험들의 평균 및 표준편차로 나타낸다.

실시예 6. 냉해 처리에 반응하여 야생형과 *msrb3*에서 서로 다르게 발현된 단백질의 분석

냉해 순응 시 *Msrb3*에 의해 조절된 단백질들을 동정하기 위하여, 본 발명자들은 냉해-처리된 야생형과 *msrb3* 식물들에서 서로 다른 축적을 나타내는 단백질들을 비교 2-D 겔 전기영동 (comparative two-dimensional gel electrophoresis)을 이용하여 분석하였다 (도 6a). 냉해-처리된 샘플과 처리되지 않은 샘플 사이의 spot 명암도 (intensity)에서의 변화를 측정하여 5개 독립적 실험들에서 재현가능하게 관찰되었을 때만 점수를 매겼다. 본 발명자들은 *msrb3* 식물에서가 아니라 냉해-처리된 야생형에서 단백질들의 수준이 증가된 단백질들을 동정하였다 (도 6b). 이러한 단백질들은 추정 *Msrb3*-조절된 단백질들을 나타냈기 때문에, 이 단백질들을 MALDI-TOF MS

(matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry)로 더 분석하였다 (표 2). 흥미롭게도, 상기 방법에서 분석된 9개 중 6개의 단백질들이 엽록체에 위치하였다.

[표 2]. 냉해 처리에 대하여 야생형과 *msrb3* 식물에서 서로 다르게 발현된 단백질들

Spot No. ^a	MOWSE Score ^b	No. MP ^c	% Covered ^d	MM(Da)/pI ^e	Accession No. ^f	Protein Name ^g	Location ^h	Function ⁱ
3	3128	10	20	52956/5.9	7525041	RbcL fragment	chloroplast	photosynthetic water oxidation
4	2984	9	17	52956/5.9	7525041	RbcL fragment	chloroplast	photosynthetic water oxidation
5	3336	9	16	52956/5.9	7525041	RbcL fragment	chloroplast	photosynthetic water oxidation
7	3.09E+08	17	47	42415/6.2	15228194	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	chloroplast	phosphoric ester hydrolase activity
8	9.96E+04	12	38	39207/5.1	15219598	glutamine synthetase, putative	cytosol	glutamate-ammonia ligase activity
9	3.50E+08	16	62	35020/5.9	15230324	photosystem II oxygen-evolving complex 33 (OEC33); (OEE1)	chloroplast	photosynthetic water oxidation
10	2.16E+04	9	34	26000/5.4	15227085	glutathione transferase (103-1A)	cytosol	glutathione transferase activity
11	2.88E+05	12	38	36085/6.2	7485430	putative 3-beta-hydroxy-delta5-steroid dehydrogenase	chloroplast	steroid biosynthesis
12	1.53E+08	16	47	51657/5.8	23397095	putative chloroplast translation elongation factor EF-Tu precursor	chloroplast	translation elongation factor
13	5.54E+08	15	66	33805/5.9	15233613	cysteine synthase / O-acetylserine (thiol)-lyase / O-acetylserine sulfhydrylase (OAS1)	cytosol	cysteine biosynthesis from serine
14	1.21E+04	8	36	28095/6.9	15222166	photosystem II oxygen-evolving complex 23 (OEC23); (OEE2)	chloroplast	photosynthetic water oxidation

a: 스폿 (spot)의 수

b: 분자량 검색 점수 (Molecular weight search score)

c: 예상된 단백질 서열에 부합(match)하는 펩티드의 수 (P<0.05)

d: 부합된 펩티드에 의해 일치 (cover)되는 예상된 단백질 서열의 퍼센트

e: 예상된 분자량 (MM)과 부합된 서열의 pI

f: NCBI nonredundant database에서 등록번호

g: NCBI database에 따른 등록 이름

h: 예상된 세포내 위치

I: 각각의 단백질에 대하여, 알려지거나 예상되는 세포내 기능

도 6a는 냉해 처리에 반응하여 야생형과 *msrb3* 식물들에서 서로 다르게 발현된 단백질들의 2D 겔 전기영동 분석을 나타낸다. 냉해-처리 (4℃에서 3일간) 및 처리되지 않은 식물들로부터 분리된 총 단백질을 2D 겔 전기영동에 걸었다. *msrb3* 식물에서가 아닌 냉해-처리된 야생형에서 단백질 수준이 증가된 단백질들 (표 2)을 MALDI-TOF MS로 더 분석하였다. MALDI-TOF를 위해 동정된 단백질 spots를 가진 영역들은 사각형안에 있으며, I, II, 및 III로 표시하였다. 도 6b는 동정된 spots를 포함하는 I, II, 및 III 영역의 확대된 사진이다. LT는 냉해-처리를 나타낸다.

실시예 7. 냉해 처리에 반응하여 야생형과 *msrb3*에서의 유전자 발현 분석

msrb3 돌연변이가 냉해 스트레스 반응 유전자들의 발현을 변화시키는 지를 조사하기 위하여, 냉해-처리되거나 처리되지 않은 야생형, *msrb3* 및 35S::MsrB3 식물들에서 추출된 총 RNA를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 냉해-조절 유전자들의 발현을 활성화하고 냉해 순응을 조절하는 냉해-특이적 전사인자 CBF1, CBF2, 및 CBF3의 발현수준은 야생형과 35S::MsrB3 식물과 비교하여 *msrb3* 식물에서는 변화되지 않았다. 본 발명자들은 다음의 냉해 처

리 후 야생형, *msrb3*, 및 35S::MsRB3 식물들에서 RD29A 및 여러 다른 냉해-반응 유전자들 (KIN2, COR15a, 및 COR47)의 현저한 유도를 탐지하였다. 그러나, 세 식물들 중 이러한 유전자들의 발현 수준에서 현저한 차이는 없었다 (도 7a).

<116> 또한 본 발명자들은 표 2에 기재된 MsRB3-의존성 냉해-반응 단백질들에 속하는 steroid dehydrogenase, O-acetylserine sulfhydrylase, 및 sedoheptulose-bisphosphatase를 코딩하는 유전자들의 발현 패턴을 확인하였다. 이 유전자들의 전사체 수준은 냉해 처리에 대해서 야생형 식물과 비교할 때 *msrb3*에서 감소되었으며 (도 7b), 이는 본 발명의 단백질체학적 분석에서 얻은 결과 (도 6b)와 일치하였다.

<117> 도 7a는 야생형, *msrb3*, 및 35S::MsRB3 식물들에서 냉해 스트레스-반응 유전자들의 발현을 나타낸다. 냉해-처리 (4°C에서 3일간) 및 처리되지 않은 식물들로부터 분리된 전체 RNA를 RT-PCR에 제시하였다. 도 7b는 냉해 처리에 반응하여 야생형과 *msrb3*에서 서로 다르게 발현된 단백질들을 코딩하는 3개의 유전자의 RT-PCR 분석을 나타낸다. Actin1은 로딩 대조군으로서 사용되었다. C는 대조군, LT는 냉해-처리를 나타낸다.

<118> [참고문헌]

LITERATURE CITED

Abbasi F, Onodera H, Toki S, Tanaka H, Komatsu S (2004) OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Mol Biol* 55: 541-552

Bae MS, Cho EJ, Choi EY, Park OK (2003) Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J* 36: 652-663.

Bechtold N, Pelletier G (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* 82: 259-266

Bechtold U, Murphy DJ, Mullineaux PM (2004) *Arabidopsis* peptide methionine sulfoxide reductase2 prevents cellular oxidative damage in long nights. *Plant Cell* 16: 908-919

Brot N, Weissbach J, Werth J, Weissbach H (1981) Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2155-2158

Cheong YH, Kim KN, Pandey GK, Gupta R, Grant JJ, Luan S (2003) CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 1833-1845

Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 17: 1043-1054

Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57: 779-795

Dixon DP, Laphorn A, Edwards R (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biol* 3: REVIEWS3004

<119>

oxide reductase activity. *Plant Physiol* **100**: 529-532

Fowler S, Thomashow MF (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* **14**: 1675-1690

Giacomelli L, Rudella A, van Wijk KJ (2006) High light response of the thylakoid proteome in arabidopsis wild type and the ascorbate-deficient mutant vtc2-2. A comparative proteomics study. *Plant Physiol* **141**: 685-701

Gibson S, Arondel V, Iba K, Somerville C (1994) Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **106**: 1615-1621

Hannah MA, Heyer AG, Hinch DK (2005) A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* **2**: e26

Hughes MA, Dunn MA (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J Exp Bot* **47**: 291-305

Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF (1998) Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**: 104-106

Jensen ON, Wilm M, Shevchenko A, Mann M (1999) Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. *Methods Mol Biol* **112**: 513-530

Jonak C, Okresz L, Bogre L, Hirt H (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 415-424

Kim KN, Cheong YH, Grant JJ, Pandey GK, Luan S (2003) CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 411-423

Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* **6**: 262-267

- Kolukisaoglu U, Weinl S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J (2004) Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol* **134**: 43-58
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF (2002) Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* **130**: 2129-2141
- Lee H, Xiong L, Gong Z, Ishitani M, Stevenson B, Zhu JK (2001) The *Arabidopsis* *HOS1* gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleocytoplasmic partitioning. *Genes Dev* **15**: 912-924
- Lee H, Xiong L, Ishitani M, Stevenson B, Zhu JK (1999) Cold-regulated gene expression and freezing tolerance in an Arabidopsis thaliana mutant. *Plant J* **17**: 301-308
- Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 15036-15040
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* **148**: 350-382
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1391-1406
- Medina J, Catala R, Salinas J (2001) Developmental and stress regulation of RCI2A and RCI2B, two cold-inducible genes of arabidopsis encoding highly conserved hydrophobic proteins. *Plant Physiol* **125**: 1655-1666
- Mendoza-Cozatl D, Loza-Tavera H, Hernandez-Navarro A, Moreno-Sanchez R (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 653-671

- Morgan-Kiss RM, Prisco JC, Pocock T, Gudynaite-Savitch L, Huner NP (2006)** Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 222-252
- Moskovitz J (2005)** Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim Biophys Acta* **1703**: 213-219
- Murgia I, Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Carravieri S, Soave C (2004)** *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J* **38**: 940-953
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2006)** A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 742-749
- Niyogi KK (1999)** Photoprotection revised: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 333-359
- Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry JF, Masclaux-Daubresse C (2006)** The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *J Exp Bot* **57**: 547-557
- Ristic Z, Ashworth EN (1993)** Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation. *Protoplasma* **172**: 111-123
- Romero HM, Berlett BS, Jensen PJ, Pell EJ, Tien M (2004)** Investigations into the role of the plastidial peptide methionine sulfoxide reductase in response to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **136**: 3784-3794
- Sadanandom A, Piffanelli P, Knott T, Robinson C, Sharpe A, Lydiate D, Murph D, Fairbairn DJ (1996)** Identification of a peptide methionine sulphoxide reductase

gene in an oleosin promoter from *Brassica napus*. Plant J 10: 235-242

Sadanandom A, Poghosyan Z, Fairbairn DJ, Murphy DJ (2000) Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in *Arabidopsis*. Plant Physiol 123: 255-264

Saijo Y, Hata S, Kyoizuka J, Shimamoto K, Izui K (2000) Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. Plant J 23: 319-327

Sanchez J, Nikolau BJ, Stumpf PK (1983) Reduction of N-acetyl methionine sulfoxide in plants. Plant Physiol 73: 619-623

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. Plant J 31: 279-292

Sharma P, Sharma N, Deswal R (2005) The molecular biology of the low-temperature response in plants. Bioessays 27: 1048-1059

Sharov VS, Schoneich C (2000) Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. Free Radic Biol Med 29: 986-994

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Curr Opin Plant Biol 6: 410-417

Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH (2005) Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. Endocr Rev 26: 525-582

Singh BN, Mishra RN, Agarwal PK, Goswami M, Nair S, Sopory SK, Reddy MK (2004) A pea chloroplast translation elongation factor that is regulated by abiotic factors. Biochem Biophys Res Commun 320: 523-530

- Stadtman ER, Moskovitz J, Levine RL** (2003) Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid Redox Signal* **5**: 577-582
- Steponkus PL** (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **35**: 543-584
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF** (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1035-1040
- Sung DY, Kaplan F, Lee KJ, Guy CL** (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci* **8**: 179-187
- Sung DY, Vierling E, Guy CL** (2001) Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiol* **126**: 789-800
- Tamoi M, Nagaoka M, Miyagawa Y, Shigeoka S** (2006) Contribution of fructose-1,6-bisphosphatase and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase to the photosynthetic rate and carbon flow in the Calvin cycle in transgenic plants. *Plant Cell Physiol* **47**: 380-390
- Thomashow MF** (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol* **118**: 1-8
- Thomashow MF** (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 571-599
- Vieira Dos Santos C, Cuine S, Rouhier N, Rey P** (2005) The *Arabidopsis* plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins. Sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A, and induction by photooxidative stress. *Plant Physiol* **138**: 909-922
- Vogt W** (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* **18**: 93-105
- Wise RR, Naylor AW** (1987) Chilling-Enhanced Photooxidation : Evidence for the

Role of Singlet Oxygen and Superoxide in the Breakdown of Pigments and Endogenous Antioxidants. *Plant Physiol* **83**: 278-282

Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14**: S165-183

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**: 251-264

Yamasaki T, Yamakawa T, Yamane Y, Koike H, Satoh K, Katoh S (2002) Temperature acclimation of photosynthesis and related changes in photosystem II electron transport in winter wheat. *Plant Physiol* **128**: 1087-1097

Zhu J, Shi H, Lee BH, Damsz B, Cheng S, Stirn V, Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA (2004) An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor gene, HOS9, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9873-9878

<125>

발명의 효과

<126>

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 저온의 조건에서 발현되는 MsrB3를 이용할 경우 식물체에서 산화 스트레스에 대한 저항성을 증가시키고, 저온에 반응하여 증가된 MetO와 ROS 함량이 낮출 수 있음을 증명하였다. 따라서, 본 발명의 MsrB3 유전자를 도입시킨 형질전환식물을 이용하여 냉해 및 산화 스트레스 저항성이 증가된 작물을 생산할 수 있고, 농작물의 생산량 및 생산율을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

<1>

도 1a는 MsrB3에 대응하는 게놈 영역의 개략도이다.

<2>

도 1b는 야생형 (WT)과 *msrb3* 식물들에서 T-DNA 삽입의 DNA gel blot 분석을 나타낸다.

<3>

도 1c와 d는 WT, *msrb3* (C), 및 35S::MSRB3 (D) 식물에서 MsrB3 발현의 RNA 분석을 나타낸다.

<4>

도 2a는 MV 처리에 의해 유도된 표백 표현형을 나타낸다.

<5>

도 2b는 MV에 노출된 식물들에서 엽록소 함량의 측정을 나타낸다.

<6>

도 3a는 전해질 누출 시험을 나타낸다.

<7>

도 3b는 냉각 저항성 테스트를 나타낸다.

<8>

도 4는 H₂O₂와 냉해 처리에 노출된 식물들에서 MetO 함량을 나타낸다.

<9>

도 5는 냉해 처리에 노출된 잎들에서 H₂O₂의 조직화학적 분석을 나타낸다.

<10>

도 6a는 냉해 처리에 반응하여 야생형과 *msrb3* 식물들에서 서로 다르게 발현된 단백질들의 2D 겔 전기영동 분석을 나타낸다.

<11>

도 6b는 동정된 spots를 포함하는 I, II, 및 III 영역의 확대된 사진이다. LT는 냉해-처리를 나타낸다.

<12>

도 7a는 야생형, *msrb3*, 및 35S::MsrB3 식물들에서 냉해 스트레스-반응 유전자들의 발현을 나타낸다.

<13>

도 7b는 냉해 처리에 반응하여 야생형과 *msrb3*에서 서로 다르게 발현된 단백질들을 코딩하는 3개의 유전자의 RT-PCR 분석을 나타낸다.

<14>

도 8은 MsrB3 유전자의 염기서열을 나타낸다.

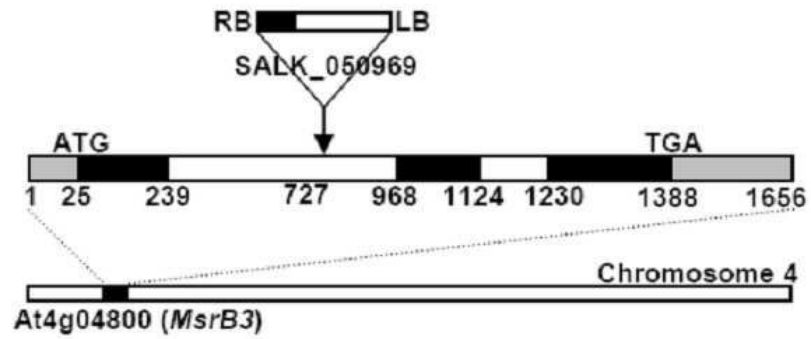
<15>

도 9는 MsrB3 단백질의 아미노산 서열을 나타낸다.

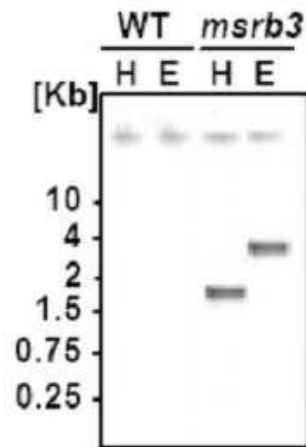
<16> 도 10은 MsrB3 유전자가 삽입된 재조합 벡터의 개열지도이다.

도면

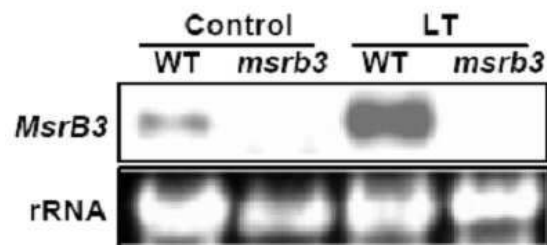
도면1a



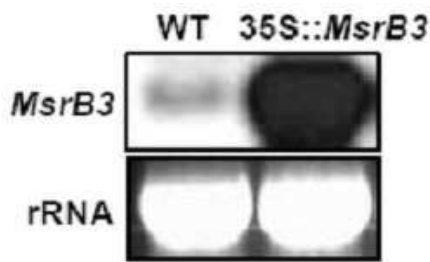
도면1b



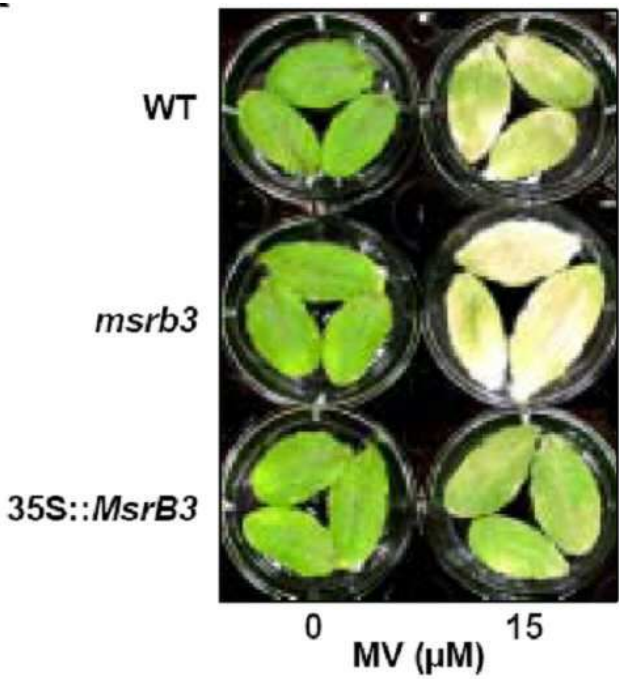
도면1c



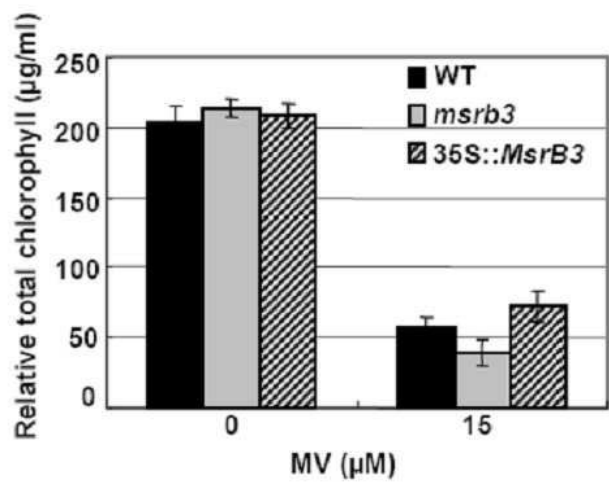
도면1d



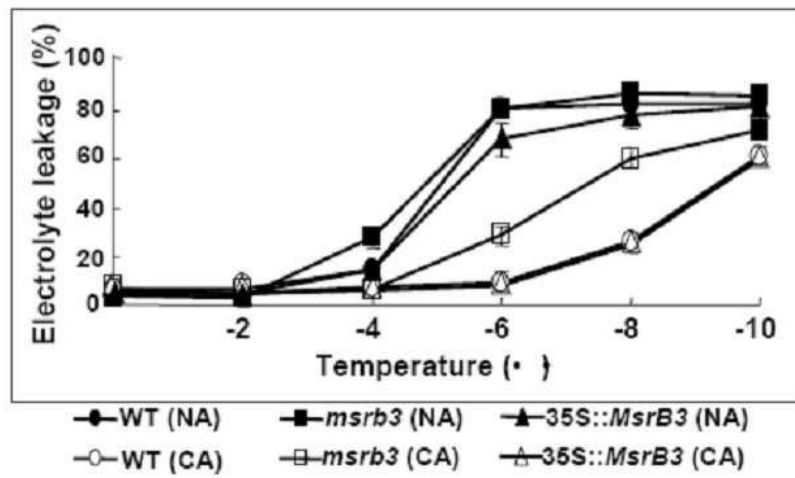
도면2a



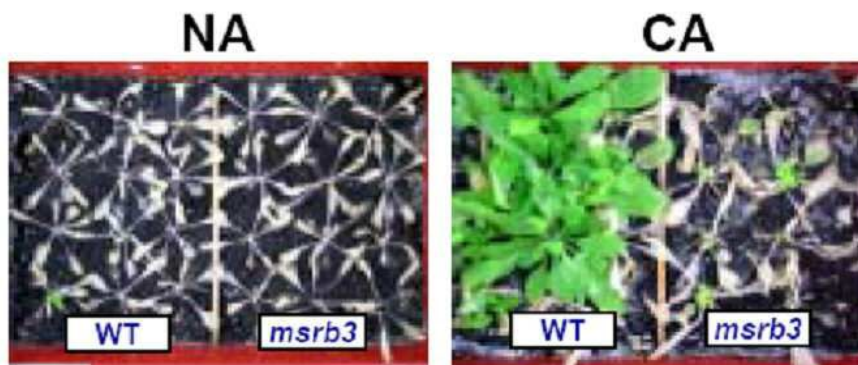
도면2b



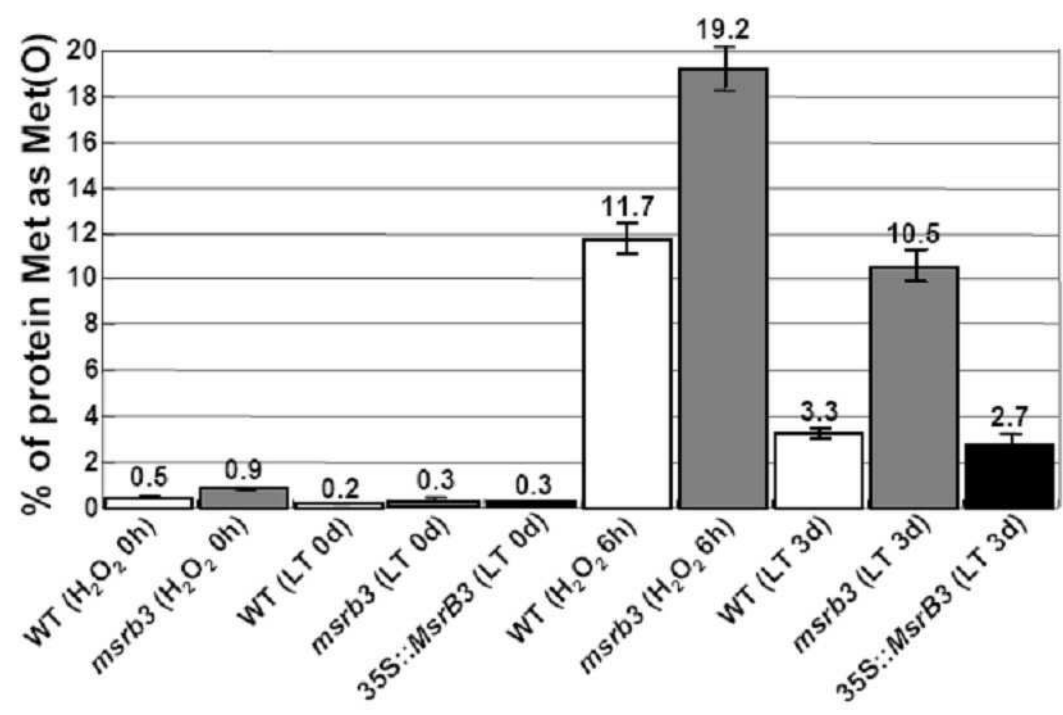
도면3a



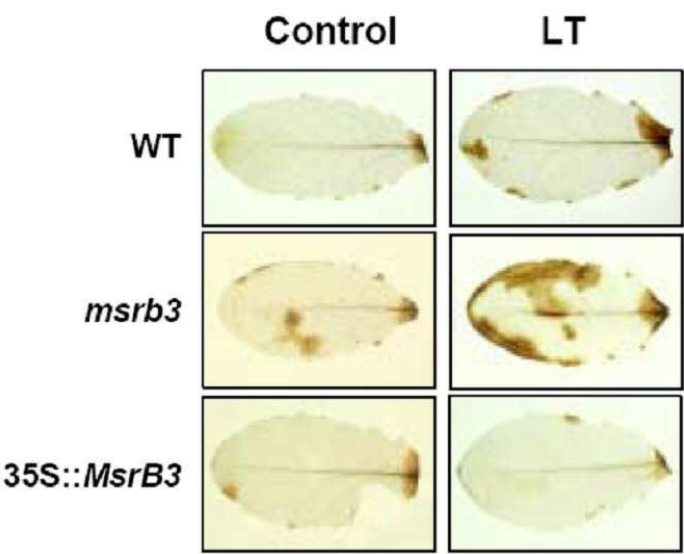
도면3b



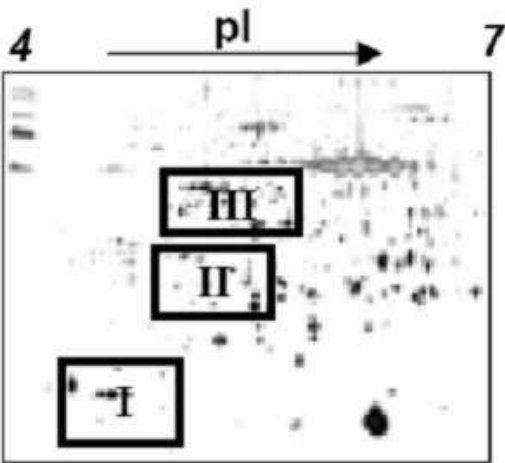
도면4



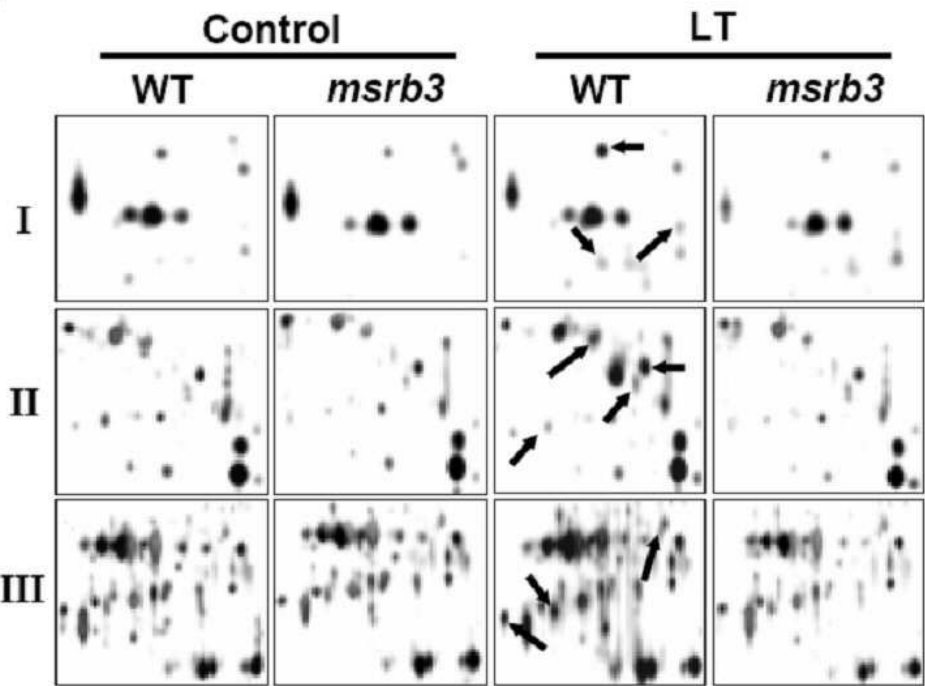
도면5



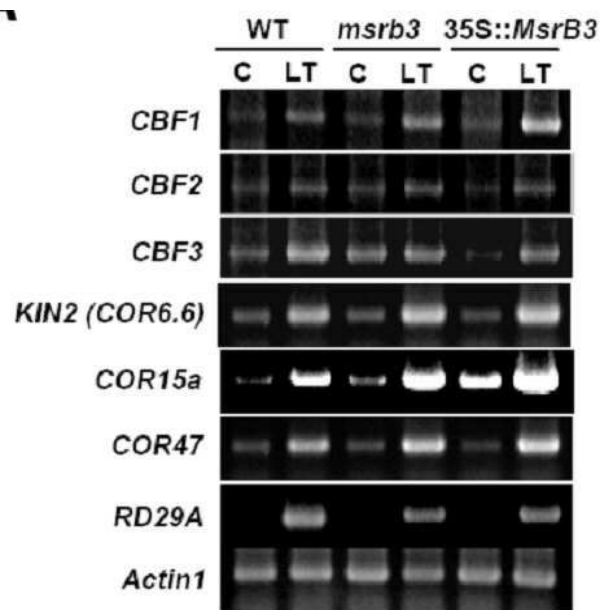
도면6a



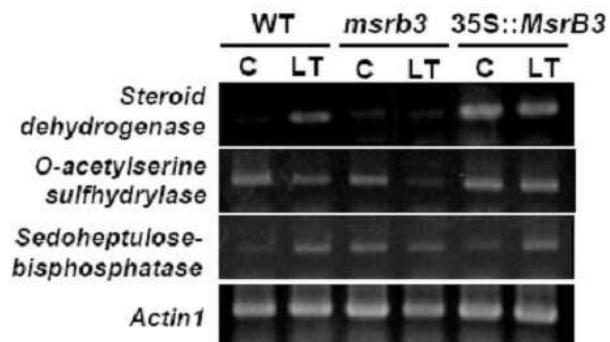
도면6b



도면7a



도면7b



도면8

```

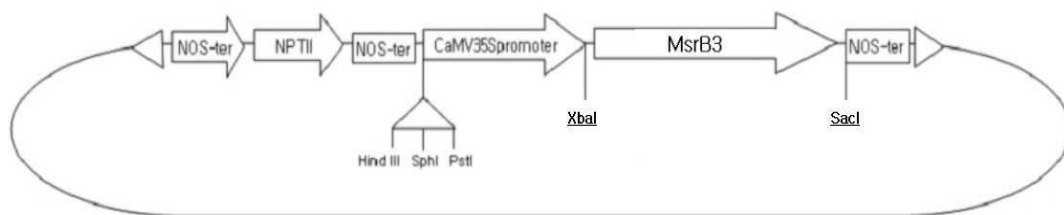
1 atgaacatcg tcaattcaaa gattctcttt ttatcattca cgctacttct tcttcttcaa
61 tcgtcaatcg ttgaatccga ttgatattgc ctctcttccg gcgtagcttc gacggtggca
121 atggcggtc cggtatcggt tcagaaagga gatgaagagt gggtgcat tctttcacct
181 gaacagtttc ggattcttcg tcaaaaggc actgaatata caggaacagg ggaatatgtc
241 aacttcgaca aggaaggagt ttacggttgt gtaggatgca atgctcctct ttataaatcc
301 accacaaagt tcaacgctgg ttgtggctgg ccagctttct ttgaaggaat ccccggtgcc
361 attacccgaa cgacagaccc agatgggaga agaatagaga tcaactgtgc aacatgtggt
421 ggacatcttg gtcattgttt caaaggagaa ggtttcgcta ctccaaccga tgaacgccat
481 tgcgtgaaca gcgtttcgct taagttcaca ccgcagcgt cttccttgta a

```

도면9

MNIVNSKI L F L S F T L L L L L Q S S I V E S D S I C L S S
 G V A S T V A M A A P G S V Q K G D E E W R A I L S P E Q F R I L
 R Q K G T E Y P G T G E Y V N F D K E G V Y G C V G C N A P L Y K
 S T T K F N A G C G W P A F F E G I P G A I T R T T D P D G R R I
 E I N C A T C G G H L G H V F K G E G F A T P T D E R H C V N S V
 S L K F T P A A S S L

도면10



서 열 목 록

[서열목록 전자파일 첨부](#)