



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2019-0101480  
(43) 공개일자 2019년08월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/47 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 14/4705 (2013.01)  
C07K 14/415 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7024147(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년02월01일  
심사청구일자 2019년08월19일
- (62) 원출원 특허 10-2014-7024639  
원출원일자(국제) 2013년02월01일  
심사청구일자 2018년01월26일
- (85) 번역문제출일자 2019년08월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/024452
- (87) 국제공개번호 WO 2013/116731  
국제공개일자 2013년08월08일
- (30) 우선권주장  
61/594,245 2012년02월02일 미국(US)

- (71) 출원인  
다우 아그로사이언시즈 엘엘씨  
미국 인디애나주 46268-1054 인디애나폴리스 자이언스빌 로드 9330
- (72) 발명자  
페톨리노 조셉  
미국 46077 인디애나주 자이언즈빌 우드스톡 코트 270  
리 지앤취앤  
미국 46077 인디애나주 자이언즈빌 이글 레이크 드라이브 6202  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 발명의 명칭 **식물 전사활성화 상호작용 모티프 및 그의 용도**

**(57) 요약**

본 개시는 관심 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가시키기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태는 식물에서 확인된 신규 전사활성화 폴리펩티드 및 그의 변이체, 그리고 그의 사용 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태는 1종 이상의 전사활성화 폴리펩티드 또는 그의 변이체를 관심 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산상의 특정 결합 부위에 표적화함으로써, 그의 발현이 증가될 수 있도록 하기 위한 융합 단백질에서의 1종 이상 DNA-결합 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

*C12N 15/625* (2013.01)

*C12N 15/8216* (2013.01)

*C12N 15/8217* (2013.01)

*C12Y 203/01183* (2013.01)

*C07K 2319/71* (2013.01)

*C07K 2319/81* (2013.01)

(72) 발명자

**에번스 스티븐 엘**

미국 46077 인디애나주 자이언즈빌 록크레스 코트  
4654

**블루 라이언 시**

미국 46037 인디애나주 피셔스 글렌 애비 레인  
10080

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

DNA-결합 폴리펩티드; 및

서열 14 및 서열 41-46으로 구성되는 군에서 선택되는 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드를 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 2**

제1항에 있어서, DNA-결합 폴리펩티드가 징크 핑거(zinc finger) DNA-결합 도메인; AVRBS3-유도가능 유전자 유래의 공통 결합 서열 또는 그로부터 조작된 합성 결합 서열; GAL4; TAL; LexA; Tet 억제인자; LacR; 및 스테로이드 호르몬 수용체로 구성되는 군에서 선택되는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 1종 이상의 추가적인 DNA-결합 폴리펩티드를 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 서열 6, 서열 104, 서열 115 및 서열 116으로 구성되는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드가 서열 14 또는 서열 46인 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드가 서열 41인 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드가 서열 42인 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드가 서열 43인 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드가 서열 44인 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드가 서열 45인 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 11**

제1항에 있어서, 1종 이상의 추가적인 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드를 포함하는 합성 전사 활

성화인자 융합 단백질.

**청구항 12**

제2 뉴클레오티드 서열에 특이적으로 결합하는 DNA-결합 폴리펩티드; 및

서열 14 또는 서열 46의 단백질 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드

를 포함하는, 관심 뉴클레오티드 서열이 제2 뉴클레오티드 서열에 작용가능하게 연결될 경우 관심 뉴클레오티드 서열의 발현을 증가시키는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 13**

DNA-결합 폴리펩티드; 및

서열 14 또는 서열 46의 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 동일성을 가지는 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드

를 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 전사활성화 도메인 상호작용 폴리펩티드가 서열 14 또는 서열 46의 아미노산 서열과 85% 이상의 서열 동일성을 가지는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 15**

제13항에 있어서, 전사활성화 도메인 상호작용 폴리펩티드가 서열 14 또는 서열 46의 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 가지는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 16**

제13항에 있어서, 전사활성화 도메인 상호작용 폴리펩티드가 서열 14 또는 서열 46의 아미노산 서열과 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질.

**청구항 17**

DNA-결합 폴리펩티드를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열; 및

서열 14 및 서열 41-46으로 구성되는 군에서 선택되는 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드를 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열

을 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 폴리뉴클레오티드 서열은 인 프레임이며 단일 전사체인 핵산으로부터 발현되는, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 핵산.

**청구항 18**

제17항에 있어서, DNA-결합 폴리펩티드를 코딩하는 1종 이상의 추가적인 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 19**

제17항에 있어서, 서열 14 및 서열 41-46으로 구성되는 군에서 선택되는 전사활성화 도메인 상호작용 폴리펩티드를 코딩하는 1종 이상의 추가적인 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 20**

제17항에 있어서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오티드 서열이 유전자 조절 요소에 작용가능하게 연결되어 있는 핵산.

**청구항 21**

제17항에 있어서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오티드 서열이 제3 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 분리되어 있는 핵산.

**청구항 22**

제17항에 있어서, 숙주 세포의 게놈에 통합되는 핵산.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 숙주 세포가 식물 세포인 핵산.

**청구항 24**

제17항에 있어서, DNA-결합 폴리펩티드가 징크 핑거 DNA-결합 도메인; AVRBS3-유도가능 유전자 유래의 공통 결합 서열 또는 그로부터 조작된 합성 결합 서열; GAL4; TAL; LexA; Tet 억제인자; LacR; 및 스테로이드 호르몬 수용체로 구성되는 군에서 선택되는 핵산.

**청구항 25**

제24항에 있어서, DNA-결합 폴리펩티드가 서열 67, 서열 68 및 서열 99로 구성되는 군에서 선택되는 서열에 특이적으로 결합하는 핵산.

**청구항 26**

제17항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 선택가능 마커 또는 스크리닝가능 마커를 포함하는 벡터.

**청구항 28**

제26항에 있어서, 식물 발현 벡터인 벡터.

**청구항 29**

DNA-결합 폴리펩티드를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열; 및

서열 6, 서열 14, 서열 46, 서열 104, 서열 115 및 서열 116으로 구성되는 군에서 선택되는 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 동일성을 가지는 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드를 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열

을 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 폴리뉴클레오티드 서열은 인 프레임이며 단일 전사체인 핵산으로부터 발현되는, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 핵산.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 서열 84 또는 서열 91의 뉴클레오티드 서열과 80% 이상의 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 31**

제29항에 있어서, 서열 84 또는 서열 91의 뉴클레오티드 서열과 85% 이상의 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 32**

제29항에 있어서, 서열 84 또는 서열 91의 뉴클레오티드 서열과 90% 이상의 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 33**

제29항에 있어서, 서열 84 또는 서열 91의 뉴클레오티드 서열과 95% 이상의 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 34**

제29항에 있어서, 서열 84 또는 서열 91의 뉴클레오티드 서열과 97% 이상의 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 35**

제29항에 있어서, 서열 84 또는 서열 91의 뉴클레오티드 서열과 98% 이상의 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 36**

제29항에 있어서, 서열 84 또는 서열 91의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 37**

제29항에 있어서, DNA-결합 폴리펩티드가 징크 핑거 DNA-결합 도메인; AVRBS3-유도가능 유전자 유래의 공통 결합 서열 또는 그로부터 조각된 합성 결합 서열; GAL4; TAL; LexA; Tet 억제인자; LacR; 및 스테로이드 호르몬 수용체로 구성되는 군에서 선택되는 핵산.

**청구항 38**

서열 84 및 서열 91;

서열 84 또는 서열 91과 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열;

서열 84 및 서열 91 중 1종 이상과 특이적으로 혼성화가능한 폴리뉴클레오티드의 상보체; 및

서열 84 및 서열 91 중 1종 이상과 특이적으로 혼성화가능한 폴리뉴클레오티드의 역상보체

로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 핵산.

**청구항 39**

제17항에 따른 핵산을 포함하는 세포.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 식물 세포 또는 효모 세포인 세포.

**청구항 41**

제29항에 따른 핵산을 포함하는 세포.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 식물 세포 또는 효모 세포인 세포.

**청구항 43**

제39항에 따른 세포를 포함하는 식물 조직, 식물 부분, 식물 원자재 생성물 또는 전체 식물.

**청구항 44**

제41항에 따른 세포를 포함하는 식물 조직, 식물 부분, 식물 원자재 생성물 또는 전체 식물.

**청구항 45**

DNA-결합 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제2 뉴클레오티드 서열에 작용가능하게 연결되어 있는 관심 뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포에 제17항에 따른 핵산을 도입함으로써, 숙주 세포에서 관심 뉴클레오티드 서열의 발현을 증가시키는 것을 포함하는, 숙주 세포에서의 관심 뉴클레오티드 서열 발현의 증가 방법.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 숙주 세포에 핵산을 도입하는 것이 핵산을 포함하는 벡터를 숙주 세포에 도입하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 47**

제45항에 있어서, 핵산이 숙주 세포의 게놈에 안정하게 통합되는 방법.

**청구항 48**

제45항에 있어서, 관심 뉴클레오티드 서열이 외인성 뉴클레오티드 서열인 방법.

**청구항 49**

제45항에 있어서, 관심 뉴클레오티드 서열이 내인성 뉴클레오티드 서열인 방법.

**청구항 50**

제45항에 있어서, 숙주 세포에 핵산을 도입하는 것이 핵산을 포함하는 식물을 숙주 세포를 포함하는 식물과 교배시키는 것을 포함하는 방법.

**청구항 51**

DNA-결합 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제2 뉴클레오티드 서열에 작용가능하게 연결되어 있는 관심 뉴클레오티드 서열을 제17항에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포에 도입함으로써, 숙주 세포에서 관심 뉴클레오티드 서열의 발현을 증가시키는 것을 포함하는, 숙주 세포에서의 관심 뉴클레오티드 서열 발현의 증가 방법.

**청구항 52**

제51항에 있어서, 숙주 세포에 관심 뉴클레오티드 서열을 도입하는 것이 관심 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 숙주 세포에 도입하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 53**

제51항에 있어서, 핵산이 숙주 세포의 게놈에 안정하게 통합되는 방법.

**청구항 54**

제51항에 있어서, 제2 뉴클레오티드 서열에 작용가능하게 연결되어 있는 관심 뉴클레오티드 서열이 숙주 세포의 게놈에 안정하게 통합되는 방법.

**청구항 55**

제51항에 있어서, 숙주 세포에 관심 뉴클레오티드 서열을 도입하는 것이 관심 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물을 숙주 세포를 포함하는 식물과 교배시키는 것을 포함하는 방법.

**청구항 56**

서열 125의 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 57**

제56항에 따른 핵산에 특이적으로 혼성화가능한 핵산의 상보체.

**청구항 58**

제56항에 따른 핵산에 특이적으로 혼성화가능한 핵산의 역상보체.

**청구항 59**

제56항에 있어서, 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드가 서열 46인 핵산.

**청구항 60**

서열 125의 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드.

**청구항 61**

제60항에 있어서, 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 폴리펩티드가 서열 46인 폴리펩티드.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **[우선권 주장]**

[0002] 본 출원은 발명의 명칭이 "Plant Transactivation Interaction Motifs and Uses Thereof"인 2012년 2월 2일자 U.S. 특허 가출원 제61/594,245호의 우선권을 주장하는 바이다.

[0003] **[기술 분야]**

[0004] 본 개시는 식물 생물공학에 관한 것이다. 실시양태들은 식물 전사활성화인자(transactivator) 유래의 신규하거나 합성인 전사 인자 상호작용 모티프를 포함하는 폴리펩티드 (예컨대 융합 단백질)에 관한 것이다. 일부 실시양태는 그와 같은 단백질의, 관심 핵산을 발현시키거나 또는 관심 핵산의 발현을 증가시키기 위한 용도에 관한 것이다. 일부 실시양태는 식물 전사활성화인자 유래의 신규하거나 합성인 전사 인자 상호작용 모티프를 포함하는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 특정 예들은 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포, 조직 및/또는 생물체에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] 식물 세포에의 클로닝 및 단리된 유전자의 도입 (유전자 변환), 및 이후의 트랜스제닉(transgenic) 식물의 재생이 식물 및 식물 재료의 유전적 변형을 형성시키는 데에 광범위하게 사용되고 있다. 바람직한 특질 (예컨대 향상된 영양 품질; 증가된 수율; 해충 또는 병 저항성; 스트레스 내성; 및 제조제 내성)을 도입하기 위한 식물의 유전자 변환은 현재 바람직한 특질을 발현하는 새롭게 향상된 트랜스제닉 식물을 생산하는 데에 널리 사용되고 있다. 통상적으로, 진핵 식물 세포의 핵 또는 색소체 DNA에 무작위로 DNA가 도입된 다음, 세포 DNA에 통합된 DNA를 함유하는 세포가 단리되어, 안정하게 형질전환된 식물 세포를 생산하는 데에 사용된다. 때로는, 유사한 (또는 동일한) 조절 요소를 포함할 수 있는 다수의 코딩 서열을 도입하는 것에 의해, 1종을 초과하는 도입 특질을 발현하도록 단일 식물 변종을 유전적으로 조작하는 것이 바람직하다.

[0006] 이전유전자(는 물론, 내인성 유전자)의 발현은 다수의 단백질-DNA 및 단백질-단백질 상호작용들을 포함하는 기작을 통하여 조절된다. 그와 같은 상호작용들을 통하여, 핵산 조절 요소 (예컨대 프로모터 및 인핸서)는 상시성 또는 특이성 중 어느 하나인 코딩 서열에 발현 패턴을 부여할 수 있다. 예를 들어, 프로모터는 특정 발생 기간 동안, 또는 환경적 자극에 반응하여 특정 조직에서의 코딩 서열의 전사 증가를 초래할 수 있다. 불행히도, 이전유전자 발현에 대한 통상적인 프로모터의 고유한 속성이 숙주 세포에서 그것이 발휘되는 데에 사용될 수 있는 발현 조절 범위를 제한하고 있다. 통상적인 프로모터의 한 가지 실질적인 제한은 프로모터 강도의 제한, 그리고 특정의 강한 프로모터, 또는 동일 세포에서의 많은 카피의 동일 프로모터의 동시 사용에 의한 이전유전자 발현의 침묵화로 인하여, 도입된 유전자의 발현 수준을 미세하게 조정하기가 어렵다는 것이다. 내인성 또는 고유 유전자의 발현을 개시하거나 증가시키는 것이 바람직할 수도 있다.

[0007] 전사활성화인자는 단백질-단백질 상호작용을 통하여 DNA 전사에 연관되어 있는 수많은 상이한 단백질들 (예컨대 뉴클레오솜-리모델링 복합체; 매개체 복합체; 및 일반적인 전사 인자들, 예컨대 TFIIB, TBP 및 TFIIF)을 동원하는 것에 의해 기능함으로써, 뉴클레오솜 조립/해체, 예비-개시 복합체 형성, 프로모터 제거 및/또는 연장 속도에 영향을 주는 것에 의해 전사를 개시하거나 그 속도를 향상시키는 단백질이다. 전사활성화인자와 그의 결합 상대물의 단백질-단백질 상호작용은 "전사활성화 도메인 (TAD)"으로 알려져 있는 전사활성화인자 내의 별개 내부 구조 요소를 필요로 한다. TAD는 적은 일차 서열 상동성을 공유하며, 표적에의 결합시에만 정해진 구조를 취하는 것으로 여겨지고 있다 (문헌 [Sigler (1988) *Nature* 333:210-2]). TAD 내의 산성 및 소수성 잔기들이 중요할 것으로 생각되기는 하지만 (예컨대 문헌 [Cress and Triezenberg (1991) *Science* 251(4989):87-90] 참조), 활성화에 대한 개별 잔기들의 기여는 적을 것으로 여겨진다 (문헌 [Hall and Struhl (2002) *J Biol. Chem.*

277:46043-50]).

[0008] 헤르페스 심플렉스 비리온 단백질 16 (VP16)은 HSV-감염 세포에서 바이러스 초기 발현 유전자의 전사를 자극하는 기능을 하는 전사활성화인자이다. 다른 전사활성화인자에서와 같이, VP16은 고도로 산성인 그의 TAD와 연관된 일련의 단백질-단백질 상호작용들을 통하여 전사를 활성화한다. VP16의 산성 TAD는 시험관내 및 생체내 모두에서 수종의 상대물 단백질과 상호작용하는 것으로 밝혀진 바 있다. 예를 들면, VP16의 TAD는 TFIIH의 Tfb1 서브유닛과 직접 상호작용하는 상호작용 모티프를 함유하며 (문헌 [Langlois *et al.* (2008) *J Am. Chem. Soc.* 130:10596-604]), 이와 같은 상호작용은 바이러스 초기 발현 유전자 전사의 개시 및 연장 단계 모두를 활성화하는 VP16의 능력과 상관되어 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

**과제의 해결 수단**

[0009] **[발명의 개요]**

[0010] 본원에서 기술되는 것은 식물 전사활성화인자 단백질로부터 단리된 신규한 TAD 단백질-단백질 상호작용 모티프, 및 그것을 코딩하는 핵산이다. 이러한 신규 상호작용 모티프는 TAD를 포함하는 폴리펩티드에 유전자 조절 특성을 부여하기 위하여 합성 TAD에서 이용될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시양태는 DNA-결합 도메인 폴리펩티드 및 그와 같은 TAD 폴리펩티드를 포함하는 전사 활성화인자 융합 단백질을 포함한다. 전사 활성화인자 융합 단백질에서 TAD에 융합되는 구체적인 DNA-결합 도메인에 따라, 전사활성화가 관심 유전자의 발현을 증가시키는 데에 사용될 수 있다. 예를 들면, DNA-결합 도메인이 결합하는 이중유래 폴리뉴클레오티드가 관심 유전자에 작용 가능하게 연결됨으로써, 그의 결합이 관심 유전자의 발현을 증가시키게 되는 융합 단백질 (및 그의 기능성 TAD)을 표적화할 수 있다. 다르게는, 관심 유전자에 작용가능하게 연결되거나 그와 가까운 내인성 폴리뉴클레오티드에 결합하도록 DNA-결합 도메인이 조작될 수도 있다. 표적 DNA 결합 부위에 전사 활성화인자 융합 단백질이 결합되면, 표적 DNA 결합 부위에 작용가능하게 연결된 유전자의 전사가 자극될 수 있다.

[0011] 역시 본원에서 기술되는 것은 합성인 변이 TAD 단백질-단백질 상호작용 모티프, 및 그것을 코딩하는 핵산이다. 일부 예에서, 합성 변이 TAD 단백질-단백질 상호작용 모티프는 전사활성화인자 (예컨대 식물 전사활성화인자)의 TAD에 1종 이상의 돌연변이 (예컨대 보존성 돌연변이, 또는 상호작용 모티프의 오르소로그(ortholog)에서 확인되는 돌연변이)를 도입하는 것에 의해 조작된다. 놀랍게도, 변이 상호작용 모티프를 포함하는 이와 같은 방식으로 생성되는 합성 변이 TAD는, 전사 활성화인자 융합 단백질에서 DNA-결합 도메인과 결합될 경우, 비변형 TAD와 상이한 유전자 조절 특성을 부여할 수 있다. 예를 들면, 변이 상호작용 모티프를 포함하는 특정 합성 변이 TAD는, DNA-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질의 동일 위치에서 발현될 경우, 자연 발생 TAD 상호작용 모티프에 의해 부여되는 전사 활성화의 수준을 향상시킬 수 있다.

[0012] 일부 실시양태는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 관심 유전자의 전사를 증가시킬 수 있으며, 여기서 융합 단백질은 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 제2 폴리펩티드에 작용가능하게 연결된 DNA-결합 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 예에서, TAD 상호작용 모티프는 서열 10-16으로 구성되는 TAD 상호작용 모티프의 군에서 선택될 수 있다. 비제한적으로 예를 들면, TAD 상호작용 모티프는 서열 2-8 및 서열 100-106으로 구성되는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 TAD 내에 포함될 수 있다. 일부 예에서, TAD 상호작용 모티프는 예를 들면 비제한적으로 서열 17-58로 구성되는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 가지는 변이 TAD 상호작용 모티프일 수 있다. 비제한적으로 예를 들면, 그와 같은 변이 TAD 상호작용 모티프는 서열 107-120으로 구성되는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 TAD 내에 포함될 수 있다.

[0013] 일부 실시양태는 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 제2 폴리펩티드에 작용가능하게 연결된 DNA-결합 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드를 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. DNA-결합 도메인 폴리펩티드는 특정 표적 DNA 결합 부위에 특이적으로 결합하는 소정의 DNA-결합 도메인일 수 있다. 비제한적으로 예를 들면, DNA-결합 도메인 폴리펩티드는 징크 핑거(zinc finger) DNA-결합 도메인; UPA DNA-결합 도메인; GAL4; TAL; LexA; Tet 억제인자; LacR; 및 스테로이드 호르몬 수용체로 구성되는 군에서 선택되는 폴리펩티드일 수 있다. 특정 예에서, DNA-결합 도메인-코딩 서열은 서열 67; 서열 68; 및 서

열 99로 구성되는 군에서 선택될 수 있다. 특정 예에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 67; 서열 68; 및 서열 99로 구성되는 군에서 선택되는 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 이상, 또는 100% 동일한 DNA-결합 단백질-코딩 서열을 포함할 수 있다.

[0014] 일부 예에서, 폴리뉴클레오티드는 예컨대 서열 10-58에서 선택되는 서열을 가지는 TAD 상호작용 모티프 또는 변이 TAD 상호작용 모티프를 코딩하는 TAD 상호작용 모티프-코딩 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태는 1종 이상의 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시양태는 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0015] 본 발명의 일부 실시양태에 따른 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 예에는 DNA-결합 도메인을 코딩하는 1종 이상의 뉴클레오티드 서열 및 TAD 상호작용 모티프 (또는 이들의 변이체)를 코딩하는 1종 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 포함되는데, 비제한적으로 예를 들면 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 79-93으로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 뉴클레오티드 서열; 서열 79-93 중 1종과 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열; 서열 79-93 중 1종과 80% 이상의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열; 서열 79-93 중 1종과 85% 이상의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열; 서열 79-93 중 1종과 90% 이상의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열; 서열 79-93 중 1종과 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열; 서열 79-93 중 1종과 97% 이상의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열; 서열 79-93 중 1종과 98% 이상의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열; 서열 79-93 중 1종과 99% 이상의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열; 서열 79-93 중 1종 이상에 특이적으로 혼성화가능한 폴리뉴클레오티드의 상보체(complement); 및 서열 79-93 중 1종 이상에 특이적으로 혼성화가능한 폴리뉴클레오티드의 역상보체(reverse complement)를 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들면 숙주 세포에서의 단백질 발현을 제공하기 위하여 재조합 벡터에 도입될 수 있다. 따라서, 일부 예에는 1종 이상의 본 발명 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및/또는 그와 같은 벡터가 도입되어 있는 숙주 세포가 포함된다.

[0017] 역시 본원에서 기술되는 것은 식물 유전자 발현의 전사활성화를 위한 수단이다. 본원에서 사용될 때, "식물 유전자 발현의 전사활성화를 위한 수단"에는 서열 10; 서열 11; 서열 14; 서열 15; 서열 22; 서열 28; 서열 46; 및 서열 52로 구성되는 군에서 선택되는 폴리펩티드가 포함된다. 일부 실시양태에서는, 식물 유전자 발현의 전사활성화를 위한 1종 이상의 수단을 포함하는 합성 단백질이 식물 세포에서 관심 유전자의 발현을 조절하는 데에 사용될 수 있다.

[0018] 또한, 본원에서 기술되는 것은 ERF2로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단이다. 본원에서 사용될 때, "ERF2로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단"에는 서열 17-22 및 서열 121로 구성되는 군에서 선택되는 폴리펩티드가 포함된다. 추가적으로 기술되는 것은 PTI4로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단이다. 본원에서 사용될 때, "PTI4로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단"에는 서열 23-28 및 서열 122로 구성되는 군에서 선택되는 폴리펩티드가 포함된다. 추가적으로 기술되는 것은 AtERF1으로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단이다. 본원에서 사용될 때, "AtERF1으로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단"에는 서열 29-34 및 서열 123으로 구성되는 군에서 선택되는 폴리펩티드가 포함된다. 추가적으로 기술되는 것은 ORCA2로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단이다. 본원에서 사용될 때, "ORCA2로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단"에는 서열 35-40 및 서열 124로 구성되는 군에서 선택되는 폴리펩티드가 포함된다. 추가적으로 기술되는 것은 DREB1A로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단이다. 본원에서 사용될 때, "DREB1A로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단"에는 서열 41-46 및 서열 125로 구성되는 군에서 선택되는 폴리펩티드가 포함된다. 추가적으로 기술되는 것은 CBF1으로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단이다. 본원에서 사용될 때, "CBF1으로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단"에는 서열 47-52 및 서열 126으로 구성되는 군에서 선택되는 폴리펩티드가 포함된다. 추가적으로 기술되는 것은 DOF1으로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단이다. 본원에서 사용될 때, "DOF1으로부터 유래하는 유전자 발현을 증가시키기 위한 수단"에는 서열 53-58 및 서열 127로 구성되는 군에서 선택되는 폴리펩티드가 포함된다.

[0019] 역시 본원에서 기술되는 것은 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 이용한 유전자 발현의 증가 방법이다. 예에서는, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 융합 단백질의 표적 DNA 결합 부위에 작용가능하게 연결된 관심 유전자를 포함하는 숙주 세포 (예컨대 식물 세포, 효모 세포,

포유동물 세포 및 무한증식 세포)에 도입될 수 있다. 숙주 세포에서의 융합 단백질의 발현, 및 이후의 작용가능하게 연결된 표적 DNA 결합 부위에의 융합 단백질의 결합은 관심 유전자의 전사 개시 또는 증가된 전사를 초래할 수 있다. 특정 예에서는, 표적 DNA 결합 부위가 관심 유전자에 작용가능하게 연결되도록, 표적 DNA 결합 부위가 숙주 세포에 도입될 수도 있다. 추가적인 예에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 관심 유전자에 작용가능하게 연결된 표적 DNA 결합 부위에 결합하도록 조작된 DNA-결합 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0020] 일부 실시양태에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 폴리뉴클레오티드가 이후에 숙주 세포의 게놈 DNA에 통합되도록 (예컨대 동종 재조합을 통한) 숙주 세포에 도입될 수 있다. 따라서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질, 그리고 또한 그것을 코딩하는 핵산은 트랜스제닉 생물체 (예컨대 트랜스제닉 식물) 내에 포함될 수 있다. 따라서, 그와 같은 트랜스제닉 생물체 역시 본원에서 기술된다. 예에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 핵산은 무작위로, 또는 트랜스제닉 생물체 세포 게놈의 예정된 위치에 통합될 수 있다.

[0021] 추가적으로 기술되는 것은 합성 전사 활성화인자 융합 단백질 및/또는 그것을 코딩하는 핵산을 이용한 관심 유전자의 발현 방법이다. 일부 실시양태에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 융합 단백질의 표적 DNA 결합 부위에 작용가능하게 연결된 관심 유전자를 포함하는 숙주 세포에 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 식물 유전자 발현의 전사활성화를 위한 수단을 포함한다. 벡터가 숙주 세포에 도입된 후에는, 관심 유전자의 발현이 개시 또는 증가됨으로써, 예를 들면 융합 단백질의 조절적 제어에 따른 양으로 숙주 세포에서 관심 유전자의 발현 생성물을 생성시킬 수 있다. 그와 같은 발현 생성물은 업계에 알려져 있는 소정의 방법에 따라 숙주 세포로부터 단리 및/또는 정제될 수 있다.

[0022] 전기 및 기타 특징들은 첨부 도면을 참조하여 진행되는 몇 가지 실시양태에 대한 하기의 상세한 설명에서 더욱 분명해지게 될 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0023] **[도면의 간단한 설명]**

도 1은 VP16 전사활성화 도메인 (TAD) 하위도메인 II (서열 9)의 확인된 상호작용 모티프를 포함한다. 별표는 문헌 [Langlois *et al.* (2008) *J. Am. Chem. Soc.* 130:10596-604]에 의해 제안된 바와 같이 TFIIH의 Tfb1 서브유닛과 직접적으로 접촉하는 것으로 제안되어 있는 VP16 전사활성화 도메인 하위도메인 II의 아미노산들을 표시한다.

도 2는 확인된 식물 TAD와의 VP16 전사활성화 하위도메인 II의 정렬을 포함한다. 열거되어 있는 식물 TAD들은 상호작용 모티프를 포함하고 있다. 정렬된 상호작용 모티프는 강조하여 나타내었다. 전사 인자와 접촉하는 것으로 제안되어 있는 VP16 유래 하위도메인 II 상호작용 모티프의 잔기들은 별표 (\*)로 표시되어 있다.

도 3은 변이 ERF2 상호작용 모티프를 생성시키기 위하여 ERF2의 TAD 상호작용 모티프에 도입될 수 있는 변형들을 나타내는 정렬을 포함한다. 비교를 위하여, 고유 ERF2 및 VP16 상호작용 모티프의 서열이 열거되어 있다. 직접 접촉부는 강조하여 나타내었다.

도 4는 변이 PTI4 상호작용 모티프를 생성시키기 위하여 PTI4의 TAD 상호작용 모티프에 도입될 수 있는 변형들을 나타내는 정렬을 포함한다. 비교를 위하여, 고유 PTI4 및 VP16 상호작용 모티프의 서열이 열거되어 있다. 직접 접촉부는 강조하여 나타내었다.

도 5는 변이 AtERF1 상호작용 모티프를 생성시키기 위하여 AtERF1의 TAD 상호작용 모티프에 도입될 수 있는 변형들을 나타내는 정렬을 포함한다. 비교를 위하여, 고유 AtERF1 및 VP16 상호작용 모티프의 서열이 열거되어 있다. 직접 접촉부는 강조하여 나타내었다.

도 6은 변이 ORCA2 상호작용 모티프를 생성시키기 위하여 ORCA2의 TAD 상호작용 모티프에 도입될 수 있는 변형들을 나타내는 정렬을 포함한다. 비교를 위하여, 고유 ORCA2 및 VP16 상호작용 모티프의 서열이 열거되어 있다. 직접 접촉부는 강조하여 나타내었다.

도 7은 변이 DREB1A 상호작용 모티프를 생성시키기 위하여 DREB1A의 TAD 상호작용 모티프에 도입될 수 있는 변형들을 나타내는 정렬을 포함한다. 비교를 위하여, 고유 DREB1A 및 VP16 상호작용 모티프의 서열이 열거되어 있다. 직접 접촉부는 강조하여 나타내었다.

도 8은 변이 CBF1 상호작용 모티프를 생성시키기 위하여 CBF1의 TAD 상호작용 모티프에 도입될 수 있는 변형들을 나타내는 정렬을 포함한다. 비교를 위하여, 고유 CBF1 및 VP16 상호작용 모티프의 서열이 열거되어 있다. 직접 접촉부는 강조하여 나타내었다.

도 9는 변이 DOF1 상호작용 모티프를 생성시키기 위하여 DOF1의 TAD 상호작용 모티프에 도입될 수 있는 변형들을 나타내는 정렬을 포함한다. 비교를 위하여, 고유 DOF1 및 VP16 상호작용 모티프의 서열이 열거되어 있다. 직접 접촉부는 강조하여 나타내었다.

도 10은 MEL1 리포터 유전자의 상류에 HAS (고도 친화성 부위) ZFP 결합 부위를 포함하는 효모 통합 벡터 pH0-zBG-MEL1의 맵을 포함한다. 상기 벡터는 *에스. 세레비시아에* HO 좌위에 표적화되었으며, 효모 및 세균 모두에서의 선택을 위해 KanMX 내성 유전자를 포함하였다.

도 11은 여러 식물 전사활성화 상호작용 모티프에 의한 활성화로부터 효모에서 생성되는 *Me11* 리포터 유전자 발현 수준의 그래프 도시를 포함한다.

도 12는 플라스미드 pDAB9897의 맵을 포함하는데: *gus* 리포터 유전자를 구동하는 전사 개시 부위의 상류에 8개 연속 징크 핑거 (Z6) 결합 부위 548-749 염기 쌍을 포함하는 *아라비도시스 탈리아나* 액틴-2 프로모터가 식물 전사활성화 상호작용 모티프 징크 핑거 융합 단백질을 시험하는 데에 사용된다. 상기 이원 벡터는 또한 표적 리포터 식물 사례 생성을 위한 *pat* 선택가능 마커를 구동하는 *에이. 탈리아나* 유비퀴틴-10 프로모터를 포함한다.

도 13은 플라스미드 pDAB107881의 맵을 포함한다.

도 14는 플라스미드 pDAB107882의 맵을 포함한다.

도 15는 플라스미드 pDAB107883의 맵을 포함한다.

도 16은 플라스미드 pDAB107884의 맵을 포함한다.

도 17은 플라스미드 pDAB107885의 맵을 포함한다.

도 18은 플라스미드 pDAB107886의 맵을 포함한다.

도 19는 플라스미드 pDAB107887의 맵을 포함한다.

도 20은 플라스미드 pDAB106272의 맵을 포함한다.

도 21은 플라스미드 pDAB106238의 맵을 포함한다.

도 22는 플라스미드 pDAB106273의 맵을 포함한다.

도 23은 플라스미드 pDAB106274의 맵을 포함한다.

도 24는 플라스미드 pDAB106275의 맵을 포함한다.

도 25는 플라스미드 pDAB106276의 맵을 포함한다.

도 26은 플라스미드 pDAB106277의 맵을 포함한다.

도 27은 플라스미드 pDAB106278의 맵을 포함한다.

도 28은 플라스미드 pDAB106279의 맵을 포함한다.

도 29는 여러 식물 전사활성화 상호작용 모티프 처리에 있어서의 내인성 유전자 발현 수준에 의해 표준화된 *gus* 전사체 농도의 평균 및 표준 편차 (다이아몬드) 및 4분위수 (선 및 박스)의 그래프 도시를 포함한다. 여러 식물 전사활성화 상호작용 모티프로부터의 *gus* 리포터 유전자의 활성화를 빈 벡터 대조, 및 VP16 단백질의 도메인 II 서브유닛의 활성화와 비교하였다.

도 30은 플라스미드 pGalGUS의 맵을 포함하는데: *gus* 리포터 유전자를 구동하는 *에이. 탈리아나* 액틴-2 프로모터에 융합된 6개 연속 Gal4 결합 부위가 Gal4 결합 단백질에 융합된 식물 전사활성화 상호작용 모티프를 시험하는 데에 사용된다. 상기 이원 벡터는 또한 표적 리포터 식물 사례 생성을 위한 *pat* 선택가능 마커를 구동하는 *에이. 탈리아나* 유비퀴틴-10 프로모터를 포함한다.

도 31은 플라스미드 pTALGUS의 맵을 포함하는데: *gus* 리포터 유전자를 구동하는 *에이. 탈리아나* 액틴-2 프로모터에 융합된 8개 연속 UPA-Box 공통 결합 부위가 TAL 결합 단백질에 융합된 식물 전사활성화 상호작용 모티프를

시험하는 데에 사용된다. 상기 이원 벡터는 또한 표적 리포터 식물 사례 생성을 위한 *pat* 선택가능 마커를 구동하는 *예이. 탈리아나* 유비퀴틴-10 프로모터를 포함한다.

**[서열 목록]**

첨부된 서열 목록에 열거되어 있는 핵산 서열은 37 C.F.R. § 1.822에 정의되어 있는 바와 같은 뉴클레오티드 염기의 표준 문자 약어를 사용하여 나타내었다. 각 핵산 서열의 하나의 가닥만을 나타내었으나, 나타내는 가닥에 대한 어떠한 언급에 의해서도 상보성 가닥이 포함되는 것으로 이해된다. 첨부된 서열 목록에서:

서열 1은 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 VP16 식물 전사활성화 도메인을 나타낸다:  
GMTHDPVSYGALDVDDDFEFEQMFTDALGIDDFGG

서열 2는 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 ERF2 식물 전사활성화 도메인을 나타낸다:  
NDSEDMLVYGLLLKDAFHFDTSSSDLSCLFDFPA

서열 3은 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 PTI4 식물 전사활성화 도메인을 나타낸다:  
CLTETWGDLPKVDDSEDMVIYGLLKDALSVGWSPFSFTAG

서열 4는 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 AtERF1 식물 전사활성화 도메인을 나타낸다:  
CFTESWGDLPLKENDSEDMLVYGI LNDAFHGG

서열 5는 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 ORCA2 식물 전사활성화 도메인을 나타낸다:  
FNENCEEIIISPNYASEDLSDIIILTDIFKDQDNYEDE

서열 6은 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 DREB1A 식물 전사활성화 도메인을 나타낸다:  
GFDMEETLVEAIYTAEQSENAFYMHDEAMFEMPSLLANMAEGM

서열 7은 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 CBF1 식물 전사활성화 도메인을 나타낸다:  
EQSEGAFYMDEETMFGMPTLLDNMAEG

서열 8은 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 DOF1 식물 전사활성화 도메인을 나타낸다:  
SAGKAVLDDEDSFVWPAASFDMGACWAGAGFAD

서열 9는 서열 1 내의 상호작용 모티프인 VP16 전사활성화 도메인의 하위도메인 II를 나타낸다:  
DDFEFEQMFTD

서열 10은 ERF2 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 나타낸다: DAFHFDTSSSD

서열 11은 PTI4 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 나타낸다: DDSEDMVIYGLLLKD

서열 12는 AtERF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 나타낸다: ENDSEDMLV

서열 13은 ORCA2 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 나타낸다: EDLSDIILTD

서열 14는 DREB1A 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 나타낸다: ENAFYMHDEAMFEMP

서열 15는 CBF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 나타낸다: DEETMFGMP

서열 16은 DOF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 나타낸다: EDSFVWPAASFD

서열 17-22는 변이 ERF2 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 서열을 나타낸다.

서열 23-28은 변이 PTI4 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 서열을 나타낸다.

서열 29-34는 변이 AtERF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 서열을 나타낸다.

서열 35-40은 변이 ORCA2 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 서열을 나타낸다.

서열 41-46은 변이 DREB1A 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 서열을 나타낸다.

서열 47-52는 변이 CBF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 서열을 나타낸다.

서열 53-58은 변이 DOF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 서열을 나타낸다.

서열 59-66은 플라스미드 pH0-zBG-MEL1의 구성에 사용된 프라이머를 나타낸다.

서열 67은 Z6 DNA 결합 도메인 폴리뉴클레오티드 서열을 나타낸다: TGTGGTGGGAGAGGAGGGTGG

서열 68은 Z6 DNA 결합 도메인의 8× 연속 반복 서열을 나타낸다:

GGTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGGAGTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGCTCT  
GTGGTGGGAGAGGAGGGTGGAGATGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGTCTTGTG  
GTGGGAGAGGAGGGTGGGGATGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGCCTTGTGGTG  
GGAGAGGAGGGTGGAGGTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGCTTAAGCCGC

서열 69-74는 *pat* 및 *pal* HP 검정에 사용된 프라이머 및 프로브를 나타낸다.

서열 75-78은 담배에서의 PTU의 PCR 분석에 사용된 프라이머를 나타낸다.

서열 79는 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 VP16 유래의 고유 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열을 나타낸다:

GGCATGACCCATGATCCTGTGTCTTATGGAGCCTTGGATGTTGATGACTTT  
GAGTTTGAGCAGATGTTACAGATGCACTGGGCATCGATGACTTTGGTGGGA

서열 80은 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 ERF2 유래의 고유 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v3)을 나타낸다:

AATGACTCTGAGGACATGCTGGTGTATGGTTTGCTCAAGGATGCCTTTCAC  
TTTGACACCTCCAGCTCAGACCTCTCCTGCCTCTTTGACTTCCCAGCC

서열 81은 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 PTI4 유래의 고유 식물 전사활성화 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v3)을 나타낸다:

TGCCTGACAGAACTTGGGGAGACTTGCCTCTCAAGGTTGATGACTCTGAG  
GACATGGTGTATCTATGGTCTGTTGAAGGATGCACTCTCAGTGGGGTGGTCC  
CCATTCTCTTTCACGGCTGGT

서열 82는 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 AtERF1 유래의 고유 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v3)을 나타낸다:

TGCTTACGGAATCCTGGGGAGACCTTCCCTTGAAGGAGAATGACTCTGAG  
GACATGTTGGTGTACGGAATCCTCAATGATGCTTTTCATGGTGGC

서열 83은 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 ORCA2 유래의 고유 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v3)을 나타낸다:

TTCAATGAGAATTGTGAAGAAATCATCTCTCCAACTACGCATCAGAGGAC  
TTGTCTGACATCATCTTGACGGACATCTTCAAGGACCAAGACAACATATGAG  
GATGAG

서열 84는 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 DREB1A 유래의 고유 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v3)을 나타낸다:

GGCTTTGACATGGAAGAAACATTGGTGGAGGCCATCTACACTGCTGAACAG  
AGCGAGAATGCCTTCTACATGCATGATGAGGCAATGTTTGAGATGCCATCT  
CTTCTGGCCAACATGGCTGAGGGAATG

서열 85는 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 CBF1 유래의 고유 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v3)을 나타낸다:

GAACAGTCAGAAAGTGCTTTCTACATGGATGAAGAGACCATGTTTGGGATG  
CCAACCTTCTGGATAACATGGCAGAGGGA

서열 86은 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 DOF1 유래의 고유 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v3)을 나타낸다:

TCAGCTGGGAAGGCAGTCTTGGATGATGAGGACAGCTTTGTTTGGCCTGCT  
GCATCCTTTGACATGGGTGCCTGCTGGGCTGGAGCTGGCTTTGCTGAC

서열 87은 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 ERF2 유래의 대표적인 변이 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v2)을 나타낸다:

AATGACTCTGAGGACATGCTGGTGTATGGTTTGCTCAAGGATGATTTCCAC  
TTTGAGACAATGTTCTCAGACCTGTCCTGCCTCTTTGACTTCCCAGCC

서열 88은 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 PTI4 유래의 대표적인 변이 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v2)을 나타낸다:

TGCCTGACAGAACTTGGGGAGACTTGCCTCTCAAGGTTGATGACTTTGAG  
TTTGAGATGATGTTTACAGATGCACTCTCAGTGGGGTGGTCCCCATTCTCT  
TTCACGGCTGGT

서열 89는 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 AtERF1 유래의 대표적인 변이 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v2)을 나타낸다:

TGCTTCACGGAATCCTGGGGAGACCTTCCTTTGAAGGAGAATGACTTTGAG  
TTTGAAATGTTTACAGATTACGGAATCCTCAATGATGCTTTTCATGGTGGC

서열 90은 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 ORCA2 유래의 대표적인 변이 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v2)을 나타낸다:

TTCAATGAGAATTGTGAAGAAATCATCTCTCCAACTACGCATCAGAGGAC  
TTTGATCTTGAGATGTTGACGGACATCTTCAAGGACCAAGACAACACTATGAG  
GATGAG

서열 91은 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 DREB1A 유래의 대표적인 변이 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v2)을 나타낸다:

GGCTTTGACATGGAAGAAACATTTGGTGGAGGCCATCTACACTGCTGAACAG  
AGCGAGGACTTTGAGTTTGAAGCAATGTTTCATGGATTCTTCTTGCCAAC  
ATGGCTGAGGGAATG

서열 92는 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 CBF1 유래의 대표적인 변이 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v2)을 나타낸다:

GAACAGTCAGAAGGTGCTTTCTACATGGATGACTTTGAGTTCGAGACAATG  
TTCATGGACACCCTTCTGGATAACATGGCAGAGGGA

서열 93은 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합된 DOF1 유래의 대표적인 변이 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프를 코딩하는 합성 뉴클레오티드 서열 (v2)을 나타낸다:

TCAGCTGGGAAGGCAGTCTTGGATGATGAGGACTTTGAGTTTGAAGCCATG  
TTCACGGACATGGGTGCCTGCTGGGCTGGAGCTGGCTTTGCTGAC

서열 94-98은 *gus* 및 *BYEEF* HP 검정에 사용된 프라이머 및 프로브를 나타낸다.

서열 99는 AVRBS3-유도가능 유전자의 공통 결합 서열로부터 유래하며 UPA DNA 결합 도메인으로 지칭되는 연속 반복 서열을 나타낸다: TATATAAACCTNNCCCTCT

서열 100은 ERF2 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVDAFHFDTSSSDALGIDDFGG

서열 101은 PTI4 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVDDSEDMVIYGLLKDALGIDDFGG

서열 102는 AtERF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVENDSEDMMLVALGIDDFGG

서열 103은 ORCA2 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVEDLSDIILTDALGIDDFGG

서열 104는 DREB1A 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVENAFYMHDEAMFEMPALGIDDFGG

서열 105는 CBF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVDEETMFGMPALGIDDFGG

서열 106은 DOF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVEDSEFVWPAASFDALGIDDFGG

서열 107은 변이 ERF2 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVDDFHFFETMFSDALGIDDFGG

서열 108은 변이 ERF2 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 추가적인 대표적 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

NDSEDMVLVYGLLKDDFHFFETMFSDLSCLFDFPA

서열 109는 변이 PTI4 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVDDFEFEMMFTDALGIDDFGG

서열 110은 변이 PTI4 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 추가적인 대표적 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

CLTETWGDLPKVDDEFEFEMMFTDALSVGWSPFSFTAG

서열 111은 변이 AtERF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVENDFEFEMMFTDALGIDDFGG

서열 112는 변이 AtERF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 추가적인 대표적 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

CFTESWGDLPKENDFEFEMMFTDYGILNDAFHGG

서열 113은 변이 ORCA2 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVEDFDLEMLTDALGIDDFGG

서열 114는 변이 ORCA2 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 추가적인 대표적 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

FNENCEEIIISPNYASEDFDLEMLTDIFKDQDNYEDE

서열 115는 변이 DREB1A 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVEDFEFEAMFMDALGIDDFGG

서열 116은 변이 DREB1A 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 추가적인 대표적 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GFDMEETLVEAIIYTAEQSEDFEFEAMFMDSELLANMAEGM

서열 117은 변이 CBF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVDDFEFETMFMDALGIDDFGG

서열 118은 변이 CBF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 추가적인 대표적 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

EQSEGAFYMDDFEFETMFMDTLLDNMAEG

서열 119는 변이 DOF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 대표적인 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

GMTHDPVSYGALDVEDFEFEAMFTDALGIDDFGG

서열 120은 변이 DOF1 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 (밑줄로 표시)를 포함하는 추가적인 대표적 합성 전사활성화 도메인을 나타낸다:

SAGKAVLDDEDFEFEAMFTDMGACWAGAGFAD

서열 121-127은 변이 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프 서열들을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0024]

I. 다양한 실시양태들의 개관

[0025]

본원에서 개시되는 것은 전사 활성화인자로서 유용할 수 있으며, 관심 유전자의 전사 활성화를 위하여 합성 전사 활성화인자 융합 단백질에서 DNA-결합 폴리펩티드와 융합될 수 있는 신규한 식물 전사활성화 도메인 (TAD), TAD 상호작용 모티프, 및 전기의 합성 변이체들이다. 본원에서 개시되는 구체적인 신규 식물 TAD 및 TAD 상호작용 모티프는 식물 단백질인 ERF2; PTI4; AtERF1; ORCA2; DREB1A; CBF1; 및 DOF1으로부터 단리되었다. 구체적인 실시양태에서, 본원에서 기술되는 바와 같은 신규 식물 TAD 및/또는 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 다양한 세포 (예컨대 효모 세포 및 식물 세포)에서, 그리고 사실상 모든 유전자에 대하여 유전자 발현을 증가시키는 데에 (예컨대 개시하는 데에) 이용될 수 있다.

[0026]

전사활성화 도메인은 기능상 자율적이어서; 다시 말하자면 많은 상이한 이중유래 DNA-결합 도메인들 중 1종에 융합될 경우, 그리고 프로모터 영역의 상이한 위치에 결합될 경우, 단일 TAD가 전사를 조절할 수 있다 (상기 문헌 [Hall and Struhl (2002)]). TAD는 적은 일차 서열 상동성을 공유하며, 표적에의 결합시에만 정해진 구조를 취하는 것으로 여겨지고 있다 (상기 문헌 [Sigler (1988)]). TAD 내의 산성 및 소수성 잔기들이 중요할 것으로 생각되기는 하지만 (예컨대 상기 문헌 [Cress and Triezenberg (1991)] 참조), 활성화에 대한 개별 잔기들의 기여는 적을 것으로 여겨진다 (상기 문헌 [Hall and Struhl (2002)]).

[0027]

합성 전사활성화 도메인 상호작용 모티프가 식물 세포에서 발현을 개시하거나 향상시키는 기능을 하게 될지를

연역적으로 예측하기는 어렵다. 이와 같은 예측불가능성은 적어도 부분적으로는 일부 TAD가 그의 세포내 농도 및 그의 TAD 강도 모두의 함수로서 "억제(sqelching)" (예컨대 세포 전사 기구의 구성요소들을 적정하는 것 (titrating)에 의함)를 초래할 수 있는 매우 강한 전사활성화인자라는 사실의 결과일 수 있다. 예를 들면, U.S. 특허 6,271,341호 (등급화된 유전자 조절을 수반하는 돌연변이 VP16 TAD)를 참조하라.

[0028] 본원에서 개시되는 것은 VP16 TAD와 서열 상동성을 공유하는 소정의 신규 식물 TAD 및 TAD 상호작용 모티프가 그의 조절하에 있는 유전자에 대하여 매우 다양한 수준의 조절을 제공한다는 예상치 못한 발견이다. TAD를 "교환(swapping)"하는 데에 일반화가능한 전략을 사용하여 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 생성시킴으로써, 놀랍게도, PTI4, DREB1A, ERF2 및 CBF1으로부터 단리된 신규 TAD 및 TAD 상호작용 모티프가 매우 우수한 전사활성화인자인 것으로 업계에 인식되어 있는 VP16에 의해 제공되는 것에 비해 식물 세포에서 더 큰 유전자 전사의 증가를 제공할 수 있다는 것이 발견되었다. AtERF1, ORCA2 및 DOF1 유래의 신규 TAD 및 TAD 상호작용 모티프가 더 적은 유전자 전사의 증가를 제공한다는 것도 발견되었다.

[0029] 역시 본원에서 개시되는 것은 자연 서열과 관련하여 매우 적고 미미한 아미노산 변화를 포함하는 변이 TAD 및 TAD 상호작용 모티프가 자연 TAD가 나타내는 유전자 조절 특성의 추가적인 향상 또는 조절을 제공할 수 있다는 예상치 못한 발견이다. 예를 들면, 놀랍게도, 변이 ERF2 및 CBF1 TAD 상호작용 모티프가 식물 내에서 상응하는 고유 상호작용 모티프에 비해 그의 조절하에 있는 유전자의 상당히 더 큰 전사를 초래한다는 것이 발견되었다.

[0030] II. 약어

- [0031] *chs* 칼콘(chalcone) 신타제 유전자
- [0032] HAS 고도 친화성 부위
- [0033] HP 가수분해 프로브
- [0034] HSV 헤르페스 심플렉스 바이러스
- [0035] MS 무라시게 및 스쿱(Murashige and Skoog)
- [0036] PMPG p-니트로페닐-알파-D-글루코피라노시드
- [0037] PTU 식물 전사 단위
- [0038] SSC 식염수-나트륨 시트레이트
- [0039] TAD 전사활성화 도메인
- [0040] TBP TATA-결합 단백질
- [0041] T-DNA 운반 DNA
- [0042] TFIIB 전사 인자 IIB
- [0043] TFIID 전사 인자 IID
- [0044] T<sub>i</sub> 종양-유도 (에이. 투메파시엔스(*A. tumefaciens*) 유래의 플라스미드)
- [0045] UAS 상류 활성화 서열
- [0046] VP16 헤르페스 심플렉스 비리온 단백질 16

[0047] III. 용어

[0048] 다양한 본 개시 실시양태들에 대한 고찰을 용이하게 하기 위하여, 구체적인 용어들에 대한 하기의 설명을 제공한다:

[0049] 내인성: 본원에서 사용될 때, "내인성"이라는 용어는 특정 생물체, 조직 또는 세포 내에서 기원하는 물질 (예컨대 핵산 분자 및 폴리펩티드)을 지칭한다. 예를 들어, 식물 세포에서 발현되는 "내인성" 폴리펩티드는 유전적으로 조작되지 않은 동일 종의 식물에서 유래하는 동일 유형의 세포에서 정상적으로 발현되는 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 마찬가지로, 식물 세포에 포함되어 있는 "내인성" 핵산은 유전적으로 조작되지 않은 동일 종의 식물에서 유래하는 동일 유형의 세포에서 정상적으로 발견되는 핵산 (예컨대 게놈 DNA)을 지칭할 수 있다.

[0050] 발현: 본원에서 사용될 때, 코딩 서열 (예를 들면 유전자 또는 이전유전자)의 "발현"은 핵산 전사 단위 (예컨대

게놈 DNA 또는 cDNA 포함)의 코딩된 정보가 세포의 기능적, 비-기능적 또는 구조적 부분 (예컨대 단백질)으로 전환되는 과정을 지칭한다. 유전자 발현은 외부 신호; 예를 들면 거기에 포함되어 있는 유전자의 발현을 증가시키거나 감소시키는 작용제에 대한 세포, 조직 또는 생물체의 노출에 의해 영향을 받을 수 있다. 유전자의 발현은 DNA에서 RNA 내지 단백질로 가는 경로의 소정 부분에서 조절될 수도 있다. 유전자 발현의 조절은 예를 들면 전사, 번역, RNA 수송 및 프로세싱, mRNA와 같은 중간 분자의 분해에 작용하는 조절을 통하여, 또는 그것이 형성된 이후의 특정 단백질 분자의 활성화, 불활성화, 구획화 또는 분해를 통하여, 또는 전기들 중 어느 것의 조합에 의해 이루어진다. 유전자 발현은 비제한적으로 노던 블롯, RT-PCR, 웨스턴 블롯, 및 시험관내, 제자리 또는 생체내 단백질 활성 검정(들)을 포함하여 업계에 알려져 있는 방법들에 의해 RNA 수준 또는 단백질 수준에서 측정될 수 있다.

[0051] 발현을 증가시키다: 본원에서 사용될 때, "발현을 증가시키다"라는 용어는 발현의 개시는 물론, 주형 구성체로부터 생성되는 발현 생성물 양의 양적 증가도 지칭한다. 일부 실시양태에서는, TAD를 포함하는 폴리펩티드가 핵산으로부터 "발현을 증가시키는" 데에 사용될 수 있다. 그와 같은 실시양태에서, 발현의 증가는 대조에서 생성되는 발현 생성물 양 (예컨대 식물 전사활성화 도메인을 포함하는 단백질이 없는 구성체로부터의 것)과의 비교에 의해 측정될 수 있다.

[0052] 융합 단백질: 본원에서 사용될 때, "융합 단백질"이라는 용어는 2종 이상의 작용가능하게 연결된 폴리펩티드를 포함하는 분자를 지칭한다. 소정 예에서, 2종의 작용가능하게 연결된 폴리펩티드는 (예컨대 상이한 생물체들에서) 상이한 유전자 생성물들의 일부로서 정상적으로 발현될 수 있다. 다른 예에서, 2종 이상의 작용가능하게 연결된 폴리펩티드는 상이한 유전자 생성물들의 일부로서 정상적으로 발현되는 폴리펩티드로부터 유래할 수 있다. 본원에서 기술되는 융합 단백질에 존재하는 작용가능하게 연결된 폴리펩티드는 통상적으로 융합 단백질이 발현될 세포의 1종 이상 표적 단백질 또는 핵산과 상호작용한다. 예를 들면, 작용가능하게 연결된 폴리펩티드는 세포 전사 기구의 1종 이상의 전사 인자(들) 또는 단백질성 요소(들)와 상호작용할 수 있거나, 또는 핵산의 특정 폴리뉴클레오티드 또는 구조 요소와 상호작용할 수 있다.

[0053] 이종유래: 본원에서 사용될 때, "이종유래"라는 용어는 특정 생물체, 조직 또는 세포 내로부터 기원하지 않는 물질 (예컨대 핵산 분자 및 폴리펩티드)를 지칭한다. 예를 들어, 식물 세포에서 발현되는 "이종유래" 폴리펩티드는 동일 종의 유전적으로 조작되지 않은 식물에서 유래하는 동일 유형의 세포에서는 정상적으로 발현되지 않는 폴리펩티드 (예컨대 동일 생물체의 상이한 세포 또는 상이한 생물체의 세포에서 발현되는 폴리펩티드)를 지칭할 수 있다.

[0054] 단리된: "단리되는" 생물학적 구성요소 (예컨대 핵산 또는 단백질)는 구성요소의 화학적 또는 기능적 변화를 초래하면서 (예컨대 핵산은 핵산을 염색체의 나머지 DNA에 연결시키는 화학 결합을 파괴하는 것에 의해 염색체로부터 단리될 수 있음) 그 구성요소가 자연적으로 출현하는 생물체 세포의 다른 생물학적 구성요소 (예컨대 다른 염색체 및 염색체-외 DNA 및 RNA, 및 단백질)로부터 실질적으로 분리되거나, 분리되어 생성되거나, 또는 정제 분리되곤 한다. "단리된" 핵산 분자 및 단백질에는 표준 정제법에 의해 정제된 핵산 분자 및 단백질이 포함될 수 있다. 상기 용어는 숙주 세포에서 재조합 발현에 의해 제조되는 핵산 및 단백질은 물론, 화학적으로 합성되는 핵산 분자, 단백질 및 펩티드를 포괄한다.

[0055] 핵산 분자: 본원에서 사용될 때, "핵산 분자"라는 용어는 중합체 형태의 뉴클레오티드를 지칭할 수 있는데, 여기에는 RNA, cDNA, 게놈 DNA, 그리고 상기의 합성 형태 및 혼합 중합체의 센스 및 안티-센스 가닥 모두가 포함될 수 있다. 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 양 뉴클레오티드 유형의 변형된 형태를 지칭할 수 있다. 본원에서 사용될 때의 "핵산 분자"는 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"와 동의어이다. 핵산 분자는 보통 다르게 특정되지 않는 한 길이가 10 염기 이상이다. 상기 용어에는 DNA의 단일- 및 이중-가닥 형태가 포함된다. 핵산 분자에는 자연 발생 및/또는 비-자연 발생 뉴클레오티드 연결에 의해 서로 연결된 자연 발생 및 변형 뉴클레오티드 중 어느 하나 또는 모두가 포함될 수 있다.

[0056] "외인성" 분자는 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열 및/또는 게놈 위치와 관련하여, 그리고 폴리펩티드의 아미노산 서열 및/또는 세포 위치와 관련하여 특정 시스템 (예컨대 생식질(germplasm), 변종, 선발 변종 및/또는 식물)에 고유하지 않은 분자이다. 실시양태에서, 외인성 또는 이종유래 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 생물학적 시스템 (예컨대 식물 세포, 식물 유전자, 특정 식물 종 또는 변종, 및/또는 식물 염색체)에 인공적으로 공급되었으며, 특정 생물학적 시스템에 고유하지 않은 분자일 수 있다. 따라서, "외인성"으로의 핵산의 지정은 핵산이 자연-발생 공급원이 아닌 다른 공급원으로부터 기원하였다는 것을 표시할 수 있거나, 또는 핵산이 비-자연적인 배열구조, 유전적 위치 또는 요소들의 배열을 가지고 있다는 것을 표시할 수 있다.

- [0057] 반면, 예를 들어 "고유" 또는 "내인성" 핵산은 자연에서 정상적으로 핵산이 발견되는 염색체 또는 다른 유전 물질에 정상적으로 존재하는 것들이 아닌 다른 핵산 요소를 포함하지 않는 핵산 (예컨대 유전자)이다. 내인성 유전자 전사체는 그의 자연 염색체 좌위에 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되어 있으며, 세포에 인공적으로 공급되지 않는다.
- [0058] 업계 숙련자라면 용이하게 알게 될 바와 같이, 핵산 분자는 화학적으로 또는 생화학적으로 변형될 수 있거나, 또는 비-자연성이거나 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함할 수 있다. 그와 같은 변형에는 예를 들면 표지, 메틸화, 유사체에 의한 자연 발생 뉴클레오티드들 중 1종 이상의 치환, 뉴클레오티드간 변형 (예컨대 비하전 연결: 예를 들면 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트, 카르바메이트 등; 하전 연결: 예를 들면 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등; 현수 잔기: 예를 들면 펩티드; 개개인자 (intercalator): 예를 들면 아크리딘, 프소랄렌 등; 킬레이팅인자; 알킬화인자; 및 변형된 연결: 예를 들면 알파 아노머 핵산 등)이 포함된다. "핵산 분자"라는 용어는 단일-가닥, 이중-가닥, 부분 이중체화, 삼중체화, 헤어핀화, 원형 및 패들록화(padlocked) 입체형태를 포함하는 소정의 지형학적 입체형태도 포함한다.
- [0059] 일부 실시양태는 특정 핵산 형태인 올리고뉴클레오티드를 사용한다. 올리고뉴클레오티드는 통상적으로 50개 이하의 뉴클레오티드를 포함하는 (일부 올리고뉴클레오티드는 50개를 초과하여 포함할 수도 있음) 상대적으로 짧은 핵산 분자이다. 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 더 긴 핵산의 절단 (예컨대 제한 분해)에 의해 형성될 수 있거나, 또는 개별 뉴클레오티드 포스포르아미다이트로부터 서열-특이적인 방식으로 화학적으로 합성될 수 있다.
- [0060] 올리고뉴클레오티드는 특정 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 검출하기 위한 프로브 서열로 사용될 수도 있다. 전기한 바와 같이, 올리고뉴클레오티드 프로브는 합성으로, 또는 클로닝에 의해 제조될 수 있다. 적합한 클로닝 벡터에 대해서는 업계 숙련자에게 알려져 있다. 올리고뉴클레오티드 프로브는 표지되거나 표지되지 않을 수 있다. 비제한적으로 예를 들면 틱새 번역(nick translation)에 의한 방사성표지; 무작위 프라이밍; 및 말단 데옥시트랜스퍼라제를 사용한 테일링(tailing)을 포함하여, 핵산 분자를 표지하기 위한 매우 다양한 기술들이 존재하는데, 여기에서 사용되는 뉴클레오티드들은 예를 들면 방사성 <sup>32</sup>P로 표지된다. 사용될 수 있는 다른 표지에는 예를 들면 비제한적으로 형광단; 효소; 효소 기질; 효소 보조인자; 및 효소 억제제가 포함된다. 다르게는, 그 자체로써 또는 다른 반응성 작용제와 함께 검출가능한 신호를 제공하는 표지의 사용은 수용체가 결합하는 리간드에 의해 대체될 수 있는데, 여기서 수용체는 그 자체로써 또는 다른 시약과 함께 검출가능한 신호를 제공하도록 표지된다 (예를 들면 상기-표지된 표지에 의함). 예를 들면 문헌 [Leary *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4045-9]을 참조하라.
- [0061] 본 발명의 일부 실시양태는 뉴클레오티드 표적 서열에 "특이적으로 혼성화가능"하거나 또는 "특이적으로 상보성인" 폴리뉴클레오티드를 포함한다. "특이적으로 혼성화가능한" 및 "특이적으로 상보성인"은 폴리뉴클레오티드와 특정 뉴클레오티드 표적 서열을 포함하는 핵산 분자 사이에 안정하고 특이적인 결합이 이루어지도록 하는 충분한 정도의 상보성을 표시하는 용어이다. 특이적으로 혼성화가능함에 있어서, 핵산 분자가 그의 표적 서열에 100% 상보성일 필요는 없다. 특이적 결합이 바람직한 조건하, 예를 들면 엄격 혼성화 조건하에서 비-표적 서열에 대한 핵산의 비-특이적인 결합을 방지하기에 충분한 정도의 상보성이 존재하는 경우, 핵산 분자는 특이적으로 혼성화가능하다.
- [0062] 특정 엄격도를 초래하는 혼성화 조건은 선택된 혼성화 방법의 특성, 및 혼성화되는 핵산 서열의 조성 및 길이에 따라 달라지게 된다. 일반적으로, 혼성화의 온도 및 혼성화 완충제의 이온 강도 (특히 Na<sup>+</sup> 및/또는 Mg<sup>++</sup> 농도)가 혼성화의 엄격성에 기여하게 되지만, 세척 회수 역시 엄격성에 영향을 준다. 특정 엄격도를 달성하는 데에 요구되는 혼성화 조건과 관련된 계산이 업계 일반의 숙련자에게 알려져 있는데, 예를 들면 문헌 [Sambrook *et al.* (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11]; 및 [Hames and Higgins (eds.) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, 1985]에 논의되어 있다. 핵산의 혼성화와 관련된 추가적인 상세한 지침 및 안내는 예를 들면 문헌 [Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993]; 및 [Ausubel *et al.*, Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995]에서 찾아볼 수 있다.

- [0063] 본원에서 사용될 때, "엄격 조건"은 혼성화 분자와 DNA 표적 사이에 25% 미만의 미스매치(mismatch)가 존재할 경우에만 혼성화가 이루어지게 되는 조건을 포괄한다. "엄격 조건"에는 또한 구체적인 엄격도 수준이 포함된다. 예컨대, 본원에서 사용될 때, "보통 엄격도" 조건은 25%를 초과하는 서열 미스매치를 가지는 분자가 혼성화되지 않게 되는 것이며; "중간 엄격도"의 조건은 15%를 초과하는 미스매치를 가지는 분자가 혼성화되지 않게 되는 것이고; "높은 엄격도"의 조건은 10%를 초과하는 미스매치를 가지는 서열이 혼성화되지 않게 되는 것이다. "매우 높은 엄격도"의 조건은 6%를 초과하는 미스매치를 가지는 서열이 혼성화되지 않게 되는 것이다.
- [0064] 특정 실시양태에서, 엄격 조건은 퍼펙트(Perfect)Hyb™ 플러스 혼성화 완충제 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)사) 내 65 °C에서의 1시간 동안의 혼성화 후 이어지는 0.1×SSC/0.1% SDS 내 65 °C에서의 40분의 순차적 세척이다.
- [0065] 작용가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열: 제1 뉴클레오티드 서열이 제2 뉴클레오티드 서열과 기능성인 관계에 있을 경우, 제1 뉴클레오티드 서열은 제2 뉴클레오티드 서열과, 또는 서열에 "작용가능하게 연결된다". 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 주는 경우, 프로모터는 코딩 서열에 작용가능하게 연결된다. 재조합에 의해 생성되는 경우, 작용가능하게 연결되는 뉴클레오티드 서열들은 일반적으로 연속성이며, 2개의 단백질-코딩 영역을 연결할 필요가 있는 경우, 동일한 리딩 프레임에 있다. 그러나, 작용가능하게 연결되기 위하여 뉴클레오티드 서열이 연속성이어야 할 필요는 없다.
- [0066] 유전자 조절 서열 및 코딩 서열과 관련하여 사용되는 경우, "작용가능하게 연결된"이라는 용어는 조절 서열이 연결된 코딩 서열의 발현에 영향을 준다는 것을 의미한다. "조절 서열" 또는 "조절 요소"는 관련 코딩 서열의 전사, RNA 프로세싱 또는 안정성, 또는 번역의 시점 및 수준/양에 영향을 주는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 통상적인 조절 서열에는 5' 비번역 영역; 프로모터; 번역 리더 서열; 인트론; 인핸서; 스템-루프 구조; 억제인자 결합 서열; 종료 서열; 폴리아데닐화 인식 서열 등이 포함될 수 있다. 특정 조절 서열은 거기에 작용가능하게 연결된 코딩 서열의 상류 및/또는 하류에 위치될 수 있다. 또한, 코딩 서열에 작용가능하게 연결된 특정 조절 서열은 이중-가닥 핵산 분자의 관련 상보성 가닥에 위치될 수 있다. 코딩 서열에 "작용가능하게 연결될" 수 있는 요소가 프로모터 또는 다른 통상적인 조절 서열로 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 일부 실시양태에서는, 전사활성화인자 단백질이 프로모터 또는 다른 조절 영역, 또는 거기에 결합되어 있는 분자 (예컨대 전사 인자)와 상호작용하여 전사에 영향을 줄 수 있도록, 전사활성화인자 단백질의 DNA-결합 도메인이 프로모터 또는 다른 조절 영역에 가까운 뉴클레오티드 서열에 결합할 수 있다. 그와 같은 예에서, 전사활성화인자 단백질이 그의 DNA-결합 도메인을 통하여 결합하는 뉴클레오티드 서열은 프로모터 또는 다른 조절 서열의 조절하에 있는 코딩 서열에 "작용가능하게 연결된다".
- [0067] 작용가능하게 연결된 폴리펩티드: 폴리펩티드와 관련하여 본원에서 사용될 때, "작용가능하게 연결된"이라는 용어는 단일 분자로 (예컨대 융합 단백질), 그리고 각 폴리펩티드가 그의 예정된 기능을 발휘할 수 있는 방식으로 연결된 2종 이상의 폴리펩티드를 지칭한다. 통상적으로, 상기 2종 이상의 폴리펩티드는 펩티드 결합을 통하여 공유 결합된다. 작용가능하게 연결된 폴리펩티드들을 포함하는 융합 단백질은 표준 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자가 제2 폴리펩티드를 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 결합될 수 있으며, 생성되는 혼성 DNA 분자는 숙주 세포에서 발현되어 제1 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 생성시킬 수 있다. 특정 예에서는, 결합 후 코딩되어 있는 폴리펩티드의 번역 프레임이 변경되지 않도록, 2종의 DNA 분자가 5'에서 3' 방향으로 서로 결합될 수 있다 (즉, DNA 분자가 서로에 대하여 인-프레임으로 결합됨).
- [0068] 프로모터: 본원에서 사용될 때, "프로모터"라는 용어는 전사의 개시로부터 상류일 수 있으며, RNA 폴리머라제 및 전사에 영향을 주는 다른 단백질들의 인식 및 결합과 연관되었을 수 있는 DNA의 영역을 지칭한다. 프로모터는 세포에서의 발현을 위한 코딩 서열과 작용가능하게 연결될 수 있거나, 또는 프로모터는 세포에서의 발현을 위한 코딩 서열과 작용가능하게 연결될 수 있는 신호 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작용가능하게 연결될 수 있다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터일 수 있다.
- [0069] 발생 조절(developmental control)하에 있는 프로모터의 예로는 소정 조직, 예를 들면 비제한적으로 잎, 뿌리, 종자, 섬유, 물관, 헛물관 또는 후막조직에서 우선적으로 전사를 개시하는 프로모터들이 포함된다. 그와 같은 프로모터들은 "조직-선택성"인 것으로 지칭된다. 소정 조직에서만 전사를 개시하는 프로모터는 "조직-특이적"인 것으로 지칭된다. "세포 유형-특이적"인 프로모터는 주로 1종 이상의 기관, 예를 들면 비제한적으로 뿌리 또는 잎의 도관 세포의 소정 세포 유형에서 전사를 수행한다. 대표적인 조직-특이적 또는 조직-선택성 프로모

터에는 뿌리-선호성 프로모터, 예컨대 파세올린(phaseolin) 유전자의 것; 잎-특이적 및 광-유도 프로모터 예컨대 카브(cab) 또는 루비스코(rubisco)의 것; 꽃밥-특이적 프로모터 예컨대 LAT52의 것; 화분-특이적 프로모터 예컨대 Zm13의 것; 및 미세포자-선호성 프로모터 예컨대 apg의 것이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] "유도가능" 프로모터는 환경적인 조절하에 있을 수 있는 프로모터일 수 있다. 문헌 [Ward *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:361-366]을 참조하라. 유도가능 프로모터에 의해 전사를 개시할 수 있는 환경적 조건의 예에는 예를 들면 비제한적으로 혐기성 조건 및 광의 존재가 포함된다. 유도가능 프로모터에 있어서, 전사 속도는 유도 작용제에 반응하여 증가한다. 대표적인 유도가능 프로모터에는 구리에 반응하는 ACEI 시스템의 프로모터; 벤젠술폰아미드 제조제인 세이프너에 반응하는 옥수수 유래의 *In2* 유전자; Tn10의 Tet 억제인자; 및 그의 전사 활성이 글루코코르티코스테로이드 호르몬에 의해 유도될 수 있는 스테로이드 호르몬 유전자의 유도가능 프로모터 (문헌 [Schena *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:0421])가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 조직-특이적, 조직-선호성, 세포 유형 특이적 및 유도가능 프로모터는 "비-상시성" 프로모터 클래스를 구성한다. "상시성" 프로모터는 대부분의 환경적 조건하에서 활성일 수 있는 프로모터이다. 대표적인 상시성 프로모터에는 식물 바이러스 유래의 프로모터, 예컨대 CaMV의 35S 프로모터; 벼 액틴 유전자의 프로모터; 유비퀴틴 프로모터; pEMU; MAS; 옥수수 H3 히스톤 프로모터; 및 *브라씨카 나푸스(Brassica napus)* ALS3 구조 유전자의 Xba1/NcoI 단편 5'인 ALS 프로모터 (또는 상기 Xba1/NcoI 단편과 유사한 뉴클레오티드 서열) (국제 PCT 공개 제WO 96/30530호)가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] 전기한 상시성 및 비-상시성 프로모터들 중 어느 것도 본 발명의 일부 실시양태에서 이용될 수 있다. 예를 들면, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 활성에 의해 조절될 유전자가 제공되고 (예컨대 숙주 세포에서), 상기 유전자는 프로모터에 작용가능하게 연결될 수 있다.

[0073] 서열 동일성: 2종의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 맥락에서 본원에서 사용될 대의 "서열 동일성" 또는 "동일성"이라는 용어는 특정 비교 윈도우에 걸쳐 최대 상응성으로 정렬되었을 때 동일한 2종 서열의 잔기들을 지칭할 수 있다.

[0074] 본원에서 사용될 때, "서열 동일성의 백분율"이라는 용어는 비교 윈도우에 걸쳐 2종의 최적으로 정렬된 서열 (예컨대 핵산 서열 및 아미노산 서열)을 비교하는 것에 의해 측정되는 값을 지칭할 수 있는데, 여기서 비교 윈도우 내의 서열 일부는 2종 서열의 최적 정렬을 위하여 참조 서열 (첨가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하였을 때, 첨가 또는 결실 (즉 겹)을 포함할 수 있다. 상기 백분율은 양 서열에서 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기가 출현하는 위치의 수를 측정하여 일치하는 위치의 수를 산출하고, 일치하는 위치의 수를 비교 윈도우 내 총 수로 나눈 후, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 백분율을 산출하는 것에 의해 계산된다.

[0075] 비교를 위하여 서열을 정렬하는 방법에 대해서는 업계에 잘 알려져 있다. 다양한 프로그램 및 정렬 알고리즘들이 예를 들면 문헌 [Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482]; [Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443]; [Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444]; [Higgins and Sharp (1988) *Gene* 73:237-44]; [Higgins and Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3]; [Corpet *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90]; [Huang *et al.* (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65]; [Pearson *et al.* (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31]; [Tatiana *et al.* (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50]에 기술되어 있다. 서열 정렬 방법 및 상동성 계산에 대한 상세한 고찰은 예를 들면 문헌 [Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10]에서 찾아볼 수 있다.

[0076] 생물공학 정보 국제 센터 (NCBI)의 베이직 로칼 얼라인먼트 서치 툴(Basic Local Alignment Search Tool (블라스트(BLAST)<sup>TM</sup>; 문헌 [Altschul *et al.* (1990)])이 생물공학 정보 국제 센터(National Center for Biotechnology Information) (메릴랜드 베테스다 소재)를 포함한 몇 곳의 공급처, 및 인터넷 상에서 몇 가지 서열 분석 프로그램과 함께 사용하는 데에 가용하다. 이와 같은 프로그램을 사용하여 서열 동일성을 측정하는 방법에 대한 기술은 블라스트<sup>TM</sup>의 "도움말(help)" 부문에서 인터넷으로 가용하다. 핵산 서열 비교의 경우, 블라스트<sup>TM</sup> (Blastn) 프로그램의 "블라스트 2 서열" 기능이 디폴트 파라미터를 이용하여 사용될 수 있다. 이와 같은 방법에 의해 평가될 경우, 참조 서열에 대하여 더욱 더 큰 유사성을 가지는 핵산 서열이 점점 더 큰 동일성 백분율을 나타내게 된다.

[0077] 뉴클레오티드 서열과 관련하여 본원에서 사용될 때, "실질적으로 동일한"이라는 용어는 85%를 초과하여 동일한 서열을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열은 85.5% 이상; 86% 이상; 87% 이

상; 88% 이상; 89% 이상; 90% 이상; 91% 이상; 92% 이상; 93% 이상; 94% 이상; 95% 이상; 96% 이상; 97% 이상; 98% 이상; 99% 이상; 또는 99.5% 이상 참조 서열과 동일할 수 있다.

- [0078] 보존성 치환: 본원에서 사용될 때, "보존성 치환"이라는 용어는 아미노산 잔기가 동일한 종류의 또 다른 아미노산으로 치환되는 치환을 지칭한다. 비-보존성 아미노산 치환은 잔기들이 동일한 종류에 속하지 않는 경우의 것, 예를 들면 염기성 아미노산의 중성 또는 비-극성 아미노산으로의 치환이다. 보존성 치환을 수행할 목적으로 정의될 수 있는 아미노산의 종류에 대해서는 업계에 알려져 있다.
- [0079] 일부 실시양태에서, 보존성 치환에는 제1 지방족 아미노산의 제2의 상이한 지방족 아미노산으로의 치환이 포함된다. 예를 들어, 제1 아미노산이 Gly; Ala; Pro; Ile; Leu; Val; 및 Met 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Gly; Ala; Pro; Ile; Leu; Val; 및 Met에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 특정 예에서, 제1 아미노산이 Gly; Ala; Pro; Ile; Leu; 및 Val 중 1종인 경우에는, 제1 아미노산이 Gly; Ala; Pro; Ile; Leu; 및 Val에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 소수성 지방족 아미노산의 치환과 관련된 특정 예에서, 제1 아미노산이 Ala; Pro; Ile; Leu; 및 Val 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Ala; Pro; Ile; Leu; 및 Val에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다.
- [0080] 일부 실시양태에서, 보존성 치환에는 제1 방향족 아미노산의 제2의 상이한 방향족 아미노산으로의 치환이 포함된다. 예를 들어, 제1 아미노산이 His; Phe; Trp; 및 Tyr 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 His; Phe; Trp; 및 Tyr에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 비하전 방향족 아미노산의 치환과 관련된 특정 예에서, 제1 아미노산이 Phe; Trp; 및 Tyr 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Phe; Trp; 및 Tyr에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다.
- [0081] 일부 실시양태에서, 보존성 치환에는 제1 소수성 아미노산의 제2의 상이한 소수성 아미노산으로의 치환이 포함된다. 예를 들어, 제1 아미노산이 Ala; Val; Ile; Leu; Met; Phe; Tyr; 및 Trp 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Ala; Val; Ile; Leu; Met; Phe; Tyr; 및 Trp에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 비-방향족 소수성 아미노산의 치환과 관련된 특정 예에서, 제1 아미노산이 Ala; Val; Ile; Leu; 및 Met 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Ala; Val; Ile; Leu; 및 Met에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다.
- [0082] 일부 실시양태에서, 보존성 치환에는 제1 극성 아미노산의 제2의 상이한 극성 아미노산으로의 치환이 포함된다. 예를 들어, 제1 아미노산이 Ser; Thr; Asn; Gln; Cys; Gly; Pro; Arg; His; Lys; Asp; 및 Glu 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Ser; Thr; Asn; Gln; Cys; Gly; Pro; Arg; His; Lys; Asp; 및 Glu에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 비하전 극성 아미노산의 치환과 관련된 특정 예에서, 제1 아미노산이 Ser; Thr; Asn; Gln; Cys; Gly; 및 Pro 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Ser; Thr; Asn; Gln; Cys; Gly; 및 Pro에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 하전된 극성 아미노산의 치환과 관련된 특정 예에서, 제1 아미노산이 His; Arg; Lys; Asp; 및 Glu 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 His; Arg; Lys; Asp; 및 Glu에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 하전된 극성 아미노산의 치환과 관련된 추가적인 예에서, 제1 아미노산이 Arg; Lys; Asp; 및 Glu 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Arg; Lys; Asp; 및 Glu에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 양으로 하전된 (염기성) 극성 아미노산의 치환과 관련된 특정 예에서, 제1 아미노산이 His; Arg; 및 Lys 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 His; Arg; 및 Lys에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 양으로 하전된 극성 아미노산의 치환과 관련된 추가적인 예에서, 제1 아미노산이 Arg 또는 Lys인 경우, 제1 아미노산은 Arg 및 Lys 중 다른 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 음으로 하전된 (산성) 극성 아미노산의 치환과 관련된 특정 예에서, 제1 아미노산이 Asp 또는 Glu인 경우, 제1 아미노산은 Asp 및 Glu 중 다른 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 양으로 하전된 극성 아미노산이 아닌 다른 극성 아미노산의 치환과 관련된 특정 예에서, 제1 아미노산이 Ser; Thr; Asn; Gln; Cys; Gly; Pro; Asp; 및 Glu 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Ser; Thr; Asn; Gln; Cys; Gly; Pro; Asp; 및 Glu에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 음으로 하전된 극성 아미노산이 아닌 다른 극성 아미노산의 치환과 관련된 특정 예에서, 제1 아미노산이 Ser; Thr; Asn; Gln; Cys; Gly; Pro; Arg; His; 및 Lys 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Ser; Thr; Asn; Gln; Cys; Gly; Pro; Arg; His; 및 Lys에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다.
- [0083] 일부 실시양태에서, 보존성 치환에는 제1의 전기적으로 중성인 아미노산의 제2의 상이한 전기적으로 중성인 아미노산으로의 치환이 포함된다. 예를 들어, 제1 아미노산이 Gly; Ser; Thr; Cys; Asn; Gln; 및 Tyr 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Gly; Ser; Thr; Cys; Asn; Gln; 및 Tyr에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대

체될 수 있다.

- [0084] 일부 실시양태에서, 보존성 치환에는 제1 비-극성 아미노산의 제2의 상이한 비-극성 아미노산으로의 치환이 포함된다. 예를 들어, 제1 아미노산이 Ala; Val; Leu; Ile; Phe; Trp; Pro; 및 Met 중 1종인 경우, 제1 아미노산은 Ala; Val; Leu; Ile; Phe; Trp; Pro; 및 Met에서 선택되는 제2의 상이한 아미노산에 의해 대체될 수 있다.
- [0085] 많은 예에서, 제1 아미노산을 대체하는 보존성 치환에 사용될 구체적인 제2 아미노산의 선택은 제1 및 제2 아미노산 모두가 속하는 전기한 종류들의 수가 최대화되도록 이루어질 수 있다. 예컨대, 제1 아미노산이 Ser (극성의 비-방향족이며 전기적으로 중성인 아미노산)인 경우, 제2 아미노산은 또 다른 극성 아미노산 (즉 Thr; Asn; Gln; Cys; Gly; Pro; Arg; His; Lys; Asp; 또는 Glu); 또 다른 비-방향족 아미노산 (즉 Thr; Asn; Gln; Cys; Gly; Pro; Arg; His; Lys; Asp; Glu; Ala; Ile; Leu; Val; 또는 Met); 또는 또 다른 전기적으로 중성인 아미노산 (즉 Gly; Thr; Cys; Asn; Gln; 또는 Tyr)일 수 있다. 그러나, 이와 같은 경우의 제2 아미노산은 Thr; Asn; Gln; Cys; 및 Gly 중 1종인 것이 바람직할 수 있는데, 이들 아미노산이 극성, 비-방향족성 및 전기적 중성에 따른 모든 분류를 공유하고 있기 때문이다. 보존성 치환에 사용될 구체적인 제2 아미노산을 선택하는 데에 임의로 사용될 수 있는 추가적인 기준에 대해서는 업계에 알려져 있다. 예를 들어, Thr; Asn; Gln; Cys; 및 Gly가 Ser의 보존성 치환에 사용되기에 가용한 경우, 바람직하지 않은 가교-결합 및/또는 디설피드 결합의 형성을 방지하기 위하여, Cys는 선택에서 탈락될 수 있다. 마찬가지로, Gly가 선택에서 탈락될 수도 있는데, 그것에는 알킬 측쇄가 결합되어 있기 때문이다. 이와 같은 경우에서는, 예를 들면 측쇄 히드록실 기의 관능성을 유지하기 위하여, Thr가 선택될 수 있다. 그러나, 보존성 치환에 사용될 구체적인 제2 아미노산의 선택은 궁극적으로 숙련 실시자의 재량에 속한다.
- [0086] 아미노산 서열과 관련하여 본원에서 사용될 때의 "유도체"라는 용어는 본 발명 융합 단백질의 화학적 변형을 의미한다.
- [0087] 전사활성화 단백질: 본원에서 사용될 때, "전사활성화 단백질" (또는 "전사활성화인자" 또는 "전사 활성화인자 단백질" 또는 "전사 활성화인자 융합 단백질")이라는 용어는 핵산 요소에 결합하여 그 핵산 요소에 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 (예컨대 관심 유전자)의 전사를 개시하거나 향상시키는 폴리펩티드를 지칭한다. 소정 생물체에 고유한 전사활성화 단백질에는 예를 들면 비제한적으로 징크 핑거 DNA-결합 단백질; UPA DNA-결합 도메인; GAL4; 및 TAL이 포함된다. 본 발명의 특정 실시양태는 DNA-결합 단백질 유래의 1종 이상의 DNA-결합 도메인 및 식물 전사활성화 도메인 유래의 상호작용 모티프를 포함하는 합성 융합 단백질 전사활성화인자를 포함한다.
- [0088] 특이적 결합: 폴리펩티드 및 단백질 도메인과 관련하여 본원에서 사용될 때, "특이적 결합"이라는 용어는 결합 상대물(들)과는 안정하고 특이적인 결합이 이루어지나, 특이적으로 결합하는 폴리펩티드에 의해 인식되는 특정 아미노산 서열 또는 특정 뉴클레오티드 서열이 결합되어 있는 다른 분자와는 그렇지 않도록 하는, 폴리펩티드 또는 단백질 도메인과 그의 결합 상대물(들) (예컨대 특정 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(들), 또는 특정 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산(들)) 사이의 충분히 강한 상호작용을 지칭한다. 안정하고 특이적인 결합은 업계의 사람에게 일상적인 기술; 예컨대 "풀다운(pulldown)" 검정 (예컨대 GST 풀다운), 효모-2-혼성체 검정, 효모-3-혼성체 검정, ELISA 등에 의해 확인될 수 있다. 서로에 대해 "특이적 결합"의 속성을 가지는 분자들은 서로 "특이적으로 결합하는" 것으로 지칭될 수 있다.
- [0089] 형질전환: 본원에서 사용될 때, "형질전환"이라는 용어는 세포로의 1종 이상 핵산 분자(들)의 전달을 지칭한다. 세포 계놈에의 핵산 분자의 도입 또는 에피솜 복제 중 어느 하나에 의해 핵산 분자가 세포에 의해 안정하게 복제될 경우, 세포는 세포에 전달된 핵산 분자에 의해 "형질전환"된다. 본원에서 사용될 때, "형질전환"이라는 용어는 핵산 분자가 그와 같은 세포에 도입될 수 있는 모든 기술을 포괄한다. 예로는 바이러스 벡터를 사용한 형질감염; 플라스미드 벡터를 사용한 형질전환; 전기천공 (문헌 [Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791-3]); 리포펙션(lipofection) (문헌 [Felgner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7]); 미세주사 (문헌 [Mueller *et al.* (1978) *Cell* 15:579-85]); *아그로박테리움(Agrobacterium)*-매개 전달 (문헌 [Fralley *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7]); 직접 DNA 흡수; 및 미세투사 충격(microprojectile bombardment) (문헌 [Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70])이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0090] 이전유전자: 외인성 핵산 서열. 일부 예에서, 이전유전자는 1종 이상의 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 서열일 수 있다. 일부 예에서, 이전유전자는 1종 이상의 식물 TAD 및/또는 1종 이상의 변이 TAD를 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩할 수 있다. 일부 예에서, 이전유전

자는 관심 유전자 (예컨대 리포터 유전자; 제조제 내성을 부여하는 유전자; 및 농업에 중요한 식물 특질에 기여하는 유전자)를 코딩할 수 있다. 이들 및 기타 예에서, 이전유전자는 이전유전자의 코딩 서열에 작용가능하게 연결된 1종 이상의 조절 서열 (예컨대 프로모터)를 포함할 수 있다. 본 개시의 목적상, 생물체 (예컨대 식물)를 지칭하여 사용될 때의 "트랜스제닉"이라는 용어는 외인성 핵산 서열을 포함하는 생물체를 지칭한다. 일부 예에서, 외인성 핵산 서열을 포함하는 생물체는 분자 변환 기술을 통하여 핵산 서열이 도입된 생물체일 수 있다. 다른 예에서, 외인성 핵산 서열을 포함하는 생물체는 예를 들면 식물에서의 유전자이입(introgression) 또는 교차-수분에 의해 핵산 서열이 도입된 생물체일 수 있다.

[0091] 벡터: 본원에서 사용될 때, "벡터"라는 용어는 예를 들면 형질전환 세포를 생성시키기 위하여 세포에 도입될 수 있을 때의 핵산 분자를 지칭한다. 벡터는 그것이 숙주 세포에서 복제되는 것을 가능케 하는 핵산 서열, 예컨대 복제 기원을 포함할 수 있다. 벡터의 예에는 플라스미드; 코스미드; 박테리오파지; 및 세포에 외인성 DNA를 전달하는 바이러스가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 벡터는 또한 1종 이상의 유전자, 안티센스 분자, 및 /또는 선택가능 마커 유전자 및 업계에 알려져 있는 기타 유전 요소들을 포함할 수 있다. 벡터는 세포를 형질 도입시키거나, 형질전환시키거나, 또는 감염시킴으로써, 세포가 벡터에 의해 코딩되는 핵산 분자 및/또는 단백질을 발현하도록 할 수 있다. 벡터는 임의로 세포로의 핵산 분자의 진입을 달성하는 것을 돕는 물질 (예컨대 리포솜, 단백질 코팅 등)을 포함한다.

[0092] 구체적으로 표시되거나 암시되지 않는 한, 본원에서 사용될 때, "a", "an" 및 "the"라는 용어는 "1종 이상"을 나타낸다.

[0093] 다르게 구체적으로 설명되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어들은 본 개시가 속하는 업계 일반의 숙련자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 분자 생물학에서의 일반 용어의 정의에 대해서는 예를 들면 문헌 [Lewin B., *Genes V*, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9)]; [Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)]; 및 [Meyers R.A. (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)]에서 찾아볼 수 있다.

[0094] IV. 식물 전사활성화 도메인 유래의 상호작용 모티프

[0095] 본 개시는 신규한 식물 TAD 및 그로부터의 단백질-단백질 상호작용 모티프는 물론, 그것을 코딩하는 핵산을 제공한다. 식물 단백질로부터 확인 및 단리된 TAD인 ERF2 (*아라비도시스 탈리아나*(*Arabidopsis thaliana*)); PT14 (*솔라눔 투베로숨*(*Solanum tuberosum*)); AterF1 (*에이. 탈리아나*); ORCA2 (*카타란투스 로세우스*(*Catharanthus roseus*)); DREB1A (*에이. 탈리아나*); CBF1 (*에이. 탈리아나*); 및 DOF1 (*제아 메이스*(*Zea mays*))을 사용하여 일부 실시양태에서 이중유래 TAD로 "교환"되거나 변이 TAD 상호작용 모티프를 생성시키는 데에 사용될 수 있는 식물 TAD 상호작용 모티프들을 확인하였다. 새롭게 확인된 식물 TAD, 그의 상호작용 모티프 및 그의 변이 TAD는 특정 실시양태들에서 (예를 들면 합성 전사 활성화인자 단백질에의 포함에 의해) 관심 유전자에 새롭고 바람직한 발현 조절 제어를 부여하는 데에 사용될 수 있다.

[0096] VP16의 TAD (V16 TAD)가 특성화되어 있으므로, 전기한 신규 식물 TAD들 및 상호작용 도메인의 구조 영역은 VP16 TAD의 상응 구조에 대한 유사성을 참조한다. VP16 TAD는 2개의 하위도메인으로 분할될 수 있는데, DNA-결합 도메인에 결합될 경우, 각 하위도메인은 독립적이고도 자율적으로 전사를 활성화할 수 있다. VP16 하위도메인들은 종종 아미노 하위도메인 (또는 "VP16 전사활성화 하위도메인 I" 또는 "VP16<sub>412-456</sub>") 및 카르복실 하위도메인 (또는 "VP16 전사활성화 하위도메인 II" 또는 "VP16<sub>456-490</sub>")으로 지칭된다. VP16은 그의 상호작용 도메인을 통해 전사 인자 IIB (TFIIB)의 p62/Tfb1 서브유닛을 포함하여 전사에 관련되어 있는 수종의 표적 단백질과 상호작용한다.

[0097] VP16의 활성은 산성 잔기뿐만 아니라, TAD 내의 소수성 및 방향족 아미노산에 따라서도 달라진다. 예를 들면 문헌 [Cress and Triezenberg (1991) *Science* 251(4989):87-90]을 참조하라. 그러나, 산성 TAD에서의 규칙적인 이차 구조의 결핍으로 인하여, 산성 VP16 TAD는 많은 다른 폴리펩티드 서열들에 비해 돌연변이유발에 대하여 더 내성일 수 있다 (문헌 [Sigler (1988) *Nature* 333:210-2]). VP16 TAD 하위도메인들의 비구조화 특성은 TAD가 상이한 결합 상대물들과의 다중 단백질/단백질 상호작용을 매개하는 것을 도울 수 있는데 (문헌 [Dyson and Wright (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12(1):54-60]), 그것이 표적 단백질에 결합될 경우, TAD 하위도메인들은 용액 중에서 자유로운 경우에 비해 더 정돈된 구조 (예컨대 짧은  $\alpha$ -나선 (상기 문헌 [Langlois *et al.* (2008)]))를 채택할 수 있다. 예를 들면, 문헌 [Garza *et al.* (2009) *Life Sci.* 84(7-8):189-93]; [Jonker *et*

*al.* (2005) *Biochemistry* 44(3):827-39]; 상기 [Langlois *et al.* (2008)]을 참조하라.

- [0098] 일부 실시양태는 식물 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 합성 전사 활성화인자 단백질을 포함하며, 여기서 식물 TAD 상호작용 모티프는 서열 10-16으로 구성되는 군에서 선택된다. 일부 대표적인 합성 전사 활성화인자 단백질은 식물 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 TAD를 포함하며, 그와 같은 단백질은 예를 들면 비제한적으로 서열 2-8 및 서열 100-106을 포함한 서열을 가질 수 있다. 식물 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 추가적인 대표적 TAD에는 고유 전사활성화인자 TAD에 포함되는 있는 고유 TAD 상호작용 모티프 서열을 서열 10-16 중 1종으로 대체하는 것에 의해 조작된 것들이 포함된다.
- [0099] 본 발명의 일부 실시양태는 보존성 아미노산 치환, 및/또는 동종유래 상호작용 모티프의 유사한 위치에서 발견되는 아미노산 (예컨대 참조 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 자연 단백질의 오르소로그로부터의 것)을 사용한 치환을 포함하는 변이 TAD 상호작용 모티프가 새롭고도 특별한 유전자 조절 특성을 산출할 수 있다는 놀라운 발견을 이용한 것이다. 이러한 특별한 특성은, 소정 수준의 발현이 요구되는 경우, 폴리뉴클레오티드의 발현에 바람직할 수 있다. 예를 들어, 변이 TAD 상호작용 모티프는 원래 발현을 향상시키는 자연 참조 TAD 모티프에 비해 향상된 발현을 제공할 수 있으며, 그에 따라 종종 최대화된 발현이 목표가 되는 경우의 단백질 합성 및 정제 반응에서 바람직할 수 있다. 다른 예에서, 최대화 미만인 발현이 요구되는 경우, 변이 TAD 상호작용 모티프는 자연 참조 TAD 모티프에 비해 적은 발현을 제공할 수 있다.
- [0100] 따라서, 일부 실시양태는 변이 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 합성 전사 활성화인자 단백질을 포함한다. 일부 예에서, 변이 TAD 상호작용 모티프는 서열 10-16 중 1종의 변이체일 수 있다. 변이 TAD 상호작용 모티프는 자연 TAD 상호작용 서열의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 포함하지만, 서열 중 1종 이상의 아미노산이 다른 동종유래 TAD의 상응 위치에서 발견되는 아미노산으로 변경되어 있다. 변이 TAD 상호작용 모티프는 또한 자연 TAD 상호작용 서열의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 포함하지만, 서열 중 1종 이상의 아미노산에 대하여 보존성 치환이 이루어져 있기도 하다. 변이 TAD 상호작용 모티프는 예를 들면 비제한적으로 참조 TAD 상호작용 모티프 서열 (예컨대 서열 10-16에서 선택되는 서열)과 95% 이상 동일하거나; 참조 서열과 90% 이상 동일하거나; 참조 서열과 85% 이상 동일하거나; 참조 서열과 80% 이상 동일하거나; 참조 서열과 75% 이상 동일하거나; 참조 서열과 70% 이상 동일하거나; 참조 서열과 65% 이상 동일하거나; 참조 서열과 60% 이상 동일하거나; 참조 서열과 55% 이상 동일하거나; 참조 서열과 50% 이상 동일하거나; 또는 참조 서열과 50% 미만으로 동일할 수 있다.
- [0101] 변이 TAD 상호작용 모티프에는 예를 들면 비제한적으로 서열 17-22 (대표적인 변이 ERF2 TAD 상호작용 모티프); 서열 23-28 (대표적인 변이 PTI4 TAD 상호작용 모티프); 서열 29-34 (대표적인 변이 AtERF1 TAD 상호작용 모티프); 서열 35-40 (대표적인 변이 ORCA2 TAD 상호작용 모티프); 서열 41-46 (대표적인 변이 DREB1A TAD 상호작용 모티프); 서열 47-52 (대표적인 변이 CBF1 TAD 상호작용 모티프); 및 서열 53-58 (대표적인 변이 DOF1 TAD 상호작용 모티프)이 포함된다. 변이 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 대표적인 TAD에는 자연 전사활성화인자 TAD에 포함되어 있는 TAD 상호작용 모티프 서열을 서열 17-58로 구성되는 군에서 선택되는 변이 TAD로 대체하는 것에 의해 조작된 것들이 포함된다. 예를 들면, 변이 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 대표적인 TAD에는 서열 107-120이 포함된다.
- [0102] 전기한 폴리펩티드들 중 어느 것 및 모두를 코딩하는 핵산은 폴리펩티드의 아미노산 서열로부터 즉시 확인가능하다. 예를 들어, TAD 또는 TAD 상호작용 모티프는 전사되어 이후 TAD 또는 TAD 상호작용 모티프의 아미노산으로 번역되는 mRNA를 생성시키는 고유 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다. 그러나, 업계 숙련자라면, 유전자 코드의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 동일한 폴리펩티드를 코딩하게 되는 많은 다른 등가의 폴리뉴클레오티드들이 존재한다는 것을 알고 있을 것이다. 변이 TAD 상호작용 모티프 (예컨대 서열 17-58)는 RNA 코돈 표를 참조하여 원하는 구체적인 변이의 아미노산 서열로부터 용이하게 결정가능한 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다. 특정 실시양태에서, TAD 상호작용 모티프 (또는 그의 변이체)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 예를 들면 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 단백질 (예컨대 융합 단백질)의 발현을 최대화 또는 최적화하도록, 숙주 세포의 코돈 용법에 따라 조립되는 것이 바람직할 수 있다.
- [0103] V. 융합 단백질 전사 활성화인자
- [0104] 본 개시는 또한 식물 TAD 상호작용 모티프 및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 제공한다. 일부 실시양태에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 추가적으로 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함한다. 그와 같은 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 핵산 (예컨대 DNA) 역시 제공된다.

- [0105] 일부 실시양태에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 서열-특이적 방식으로 DNA에 결합하는 1종 이상의 제1 폴리펩티드 (즉 "DNA-결합 도메인")를 포함한다. 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 제1 DNA-결합 도메인 폴리펩티드는 식물 TAD 상호작용 모티프 또는 변이 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 1종 이상의 제2 폴리펩티드에 작용가능하게 연결될 수 있다. 일부 예에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 추가적인 폴리펩티드, 예컨대 융합 단백질의 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드 사이에 위치되는 스페이서 서열; 리더 펩티드; 융합 단백질을 세포기관 (예컨대 핵)으로 표적화하는 펩티드; 세포 효소에 의해 절단되는 폴리펩티드; 펩티드 태그(tag); 및 작용가능하게 연결된 제1 및 제2 폴리펩티드의 기능을 방해하지 않는 기타 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0106] 일부 실시양태에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 제1 및 제2 폴리펩티드는 융합 단백질을 코딩하는 키메라 유전자를 생성시키도록 서로 인-프레임으로 결합된 제1 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드로부터의 그의 발현에 의해 작용가능하게 연결될 수 있다. DNA-결합 도메인 및 TAD 상호작용 모티프를 포함하는 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 예에는 비제한적으로 서열 79-93이 포함된다. 대안적인 실시양태에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 제1 및 제2 폴리펩티드는 독립적으로 발현되는 제1 및 제2 폴리펩티드의 가교-결합에 의한 것과 같은 다른 수단에 의해 작용가능하게 연결될 수 있다.
- [0107] 합성 전사 활성화인자 융합 단백질 내에 포함될 수 있는 식물 TAD 상호작용 모티프 및 변이 TAD 상호작용 모티프에는 상기 부분 IV에서 기술된 TAD 상호작용 모티프 및 그의 변이체들이 포함된다. 예를 들면, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 서열 10-58로 구성되는 군에서 선택되는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [0108] 합성 전사 활성화인자 융합 단백질에 포함될 수 있는 DNA-결합 도메인에는 징크 핑거 단백질로부터의 징크 핑거 DNA-결합 도메인 (예컨대 Z6 DNA-결합 도메인)이 포함된다. 개별 징크 핑거 DNA-결합 도메인은 광범위한 DNA 부위를 표적화하여 거기에 결합하도록 설계될 수 있다. 예를 들면, 문헌 [Wu *et al.* (2007) *Cell. Mol. Life Sci.* 64:2933-44]을 참조하라. 정준(canonical) Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>는 물론, 비-정준 Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> 징크 핑거 단백질도 이중 나선의 주홈에  $\alpha$ -나선을 삽입하는 것에 의해 DNA에 결합한다. 징크 핑거 도메인에 의한 DNA의 인식은 모듈형(modular)이어서; 각 핑거가 일차적으로 표적의 3개 연속 염기 쌍에 접촉한 후, 단백질의 소수의 핵심 잔기들이 인식을 매개한다. 합성 전사 활성화인자 융합 단백질에 다수의 징크 핑거 DNA-결합 도메인을 포함시키는 것에 의해, 융합 단백질의 DNA-결합 특이성은 추가적으로 증가될 수 있다 (그리고 그에 따라 그에 의해 부여되는 소정의 유전자 조절 효과의 특이성 역시 증가될 수 있음). 예를 들면, 문헌 [Urnov *et al.* (2005) *Nature* 435:646-51]을 참조하라. 예컨대, 숙주 세포로 도입되는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질이 숙주 세포의 게놈 내의 유일한 DNA 서열과 상호작용하도록, 하나 이상의 징크 핑거 DNA-결합 도메인이 조작되어 이용될 수도 있다.
- [0109] 일부 예에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 *사카로마이세스 세레비시아에*(*Saccharomyces cerevisiae*)의 모듈형 전사활성화인자이나 많은 다른 생물체에서 전사활성화인자로 작용하기도 하는 GAL4 유래의 DNA-결합 도메인을 포함한다. 예를 들면, 문헌 [Sadowski *et al.* (1988) *Nature* 335:563-4]을 참조하라. 이와 같은 조절 시스템에서, *에스. 세레비시아에*에서의 갈락토스 대사 경로 효소들을 코딩하는 유전자의 발현은 가용한 탄소원에 의해 엄격하게 조절된다 (문헌 [Johnston (1987) *Microbiol. Rev.* 51:458-76]). 이러한 대사 효소들의 전사 조절은 양성 조절 단백질인 GAL4와 GAL4가 특이적으로 결합하는 17 bp 대칭형 DNA 서열 (UAS) 사이의 상호작용에 의해 매개된다.
- [0110] 자연 GAL4는 99 kDa의 분자량을 가지는 881개의 아미노산 잔기로 구성된다. GAL4는 기능적으로 자율성인 도메인들을 포함하며, 이들의 합쳐진 활성이 생체 내에서의 GAL4의 활성을 담당한다 (문헌 [Ma & Ptashne (1987) *Cell* 48:847-53]; [Brent & Ptashne (1985) *Cell* 43(3 Pt 2):729-36]). GAL4의 N-말단 65개 아미노산은 GAL4 DNA-결합 도메인을 포함한다 (문헌 [Keegan *et al.* (1986) *Science* 231:699-704]; [Johnston (1987) *Nature* 328:353-5]). 서열-특이적 결합은 DNA 결합 도메인에 존재하는 6개의 Cys 잔기에 의해 배위되는 2가 양이온의 존재를 필요로 한다. 배위된 양이온-함유 도메인은 DNA 나선 주홈과의 직접적인 접촉을 통하여 17 bp UAS 각 말단의 보존되어 있는 CCG 삼중체와 상호작용하여 그것을 인식한다 (문헌 [Marmorstein *et al.* (1992) *Nature* 356:408-14]). 단백질의 DNA-결합 기능은 활성화 도메인이 전사를 유도할 수 있도록 프로모터의 근처에 C-말단 전사 활성화 도메인을 위치시킨다.
- [0111] 합성 전사 활성화인자 융합 단백질에 포함될 수 있는 추가적인 DNA-결합 도메인에는 예를 들면 비제한적으로 AVRBS3-유도가능 유전자로부터의 결합 서열; AVRBS3-유도가능 유전자로부터의 공통 결합 서열 또는 그로부터 조각된 합성 결합 서열 (예컨대 UPA DNA-결합 도메인; 서열 89); TAL; LexA (예컨대 상기 문헌 [Brent & Ptashne (1985)] 참조); LacR (예컨대 문헌 [Labow *et al.* (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-56]; [Baim *et al.*

(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(12):5072-6] 참조); 스테로이드 호르몬 수용체 (문헌 [Elliott *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:11517-121]); 테트라사이클린 (Tc)의 존재하에서는 *tet* 작동유전자 서열에 결합하나 부재시에는 그렇지 않은 Tet 억제인자 (U.S. 특허 6,271,341호) 및 돌연변이된 Tet 억제인자; 및 GAL4, 호르몬 수용체 및 VP16의 융합을 이용하는, 문헌 [Wang *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(17):8180-4]에 기술되어 있는 조절 시스템의 구성요소가 포함된다.

[0112] 일부 예에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 1종을 초과하는 TAD 상호작용 모티프를 포함한다. 비제한적으로 예를 들면, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 2, 3, 4종 또는 그 이상의 TAD 상호작용 도메인을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 1종을 초과하는 DNA-결합 도메인을 포함한다. 비제한적으로 예를 들면, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10종 또는 그 이상의 DNA-결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0113] VI. 융합 단백질 전사 활성화인자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 분자

[0114] 일부 실시양태에서, 본 개시는 식물 TAD 상호작용 모티프, 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD를 코딩하는 1종 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 그와 같은 핵산 분자는 추가적으로 DNA-결합 도메인을 코딩하는 1종 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태의 핵산은 2종의 폴리뉴클레오티드 서열이 단일 융합 단백질의 일부로서 전사되도록 DNA-결합 도메인을 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열에 인-프레임으로 융합된 식물 TAD 상호작용 모티프, 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0115] 본 발명의 일부 실시양태에서 제공되는 핵산 분자에서, 식물 TAD 상호작용 모티프, 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열의 최종 코돈과 DNA-결합 도메인을 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열의 첫 번째 코돈은 예를 들면 인트론 또는 "중지"를 위한 코딩 없이 소정 수의 뉴클레오티드 삼중체들에 의해 분리될 수 있다. 마찬가지로, DNA-결합 도메인을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 최종 코돈과 식물 TAD 상호작용 모티프, 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD를 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열의 첫 번째 코돈이 소정 수의 뉴클레오티드 삼중체들에 의해 분리될 수도 있다. 이들 및 추가적인 실시양태에서, 식물 TAD 상호작용 모티프, 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열 및 DNA-결합 도메인을 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열의 말단 (즉 핵산 서열의 최고 3')의 최종 코돈은 거기에 바로 연속되거나, 또는 합성 뉴클레오티드 링커 (예컨대 융합을 달성하는 데에 사용되었을 수 있는 뉴클레오티드 링커)에 의해 코딩되는 것과 같이 짧은 펩티드 서열로만 그로부터 분리된 서열을 코딩하는 추가적인 폴리뉴클레오티드의 첫 번째 코돈과 위상-일치로 (in phase-register) 융합될 수 있다. 그와 같은 추가적인 폴리뉴클레오티드 서열의 예에는 예를 들면 비제한적으로 태그, 표적화 펩티드 및 효소 절단 부위가 포함된다. 마찬가지로, 제1 및 제2 폴리뉴클레오티드 서열의 최고 5' (핵산 서열에서)의 첫 번째 코돈은 거기에 바로 계속되거나, 또는 짧은 펩티드 서열로만 그로부터 분리된 서열을 코딩하는 추가적인 폴리뉴클레오티드의 최종 코돈과 위상-일치로 융합될 수 있다.

[0116] 식물 TAD 상호작용 모티프, 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 DNA-결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 분리하는 서열은 예를 들면 코딩되어 있는 아미노산 서열이 융합 단백질의 번역을 유의성 있게 변경할 가능성이 없도록 하는 소정의 서열로 구성될 수 있다. 본원에서 개시되는 TAD 상호작용 도메인 (및 그의 변이체) 및 알려져 있는 DNA-결합 도메인의 자율적인 특성으로 인하여, 예에서 개재 서열이 이러한 구조의 각 기능을 방해하지 않게 된다.

[0117] 본 발명의 일부 실시양태는 또한 식물 TAD 상호작용 모티프, 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD를 코딩하며, DNA-결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 포함하지 않는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 그와 같은 핵산 분자는 예를 들면 분자 생물학 기술에서 TAD 상호작용 모티프-코딩 서열의 조작을 용이하게 하는 데에 유용할 수 있다. 예를 들어 일부 실시양태에서, TAD 상호작용 모티프-코딩 서열은 발현 벡터에의 서열의 하위-클로닝(sub-cloning)을 위한 적합한 벡터에 도입될 수 있거나, 또는 TAD 상호작용 모티프-코딩 서열은 관심 뉴클레오티드 서열에 작용가능하게 연결된 TAD 상호작용 모티프-코딩 서열을 포함하는 추가적인 핵산 분자의 생성을 용이하게 하는 핵산 분자에 도입될 수 있다.

[0118] 예를 들면 1종 이상의 특정 식물 TAD 상호작용 모티프, 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD를 포함하며 1종 이상의 특정 DNA-결합 도메인을 추가적으로 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열은 업계 숙련자에 의해 즉시 인식가능할 것이다. 유전자 코드의 축퇴성은 특정 아미노산 서열에 대하여 한정된 수의 코딩 서열을 제공한다. 본 발명의 실시양태에 따른 융합 단백질을 코딩하는 특정 서열의 선택은 실

시자의 재량에 속한다. 상이한 적용분야에서는 상이한 코딩 서열이 바람직할 수 있다.

- [0119] 일부 실시양태에서는, 예를 들면 특정 숙주에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 향상시키기 위하여, 식물 TAD 상호작용 모티프, 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 (및/또는 DNA-결합 도메인-코딩 서열의 뉴클레오티드)를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0120] 유전자 코드는 64개의 가능한 코돈으로써 중복성이지만, 대부분의 생물체는 이러한 코돈들의 일 하위세트를 우선적으로 사용한다. 일 종에서 가장 빈번하게 이용되는 코돈은 최적 코돈으로 지칭되며, 그리 빈번하게 이용되는 않는 것들은 희귀 또는 저-사용 코돈으로 분류된다 (문헌 [Zhang *et al.* (1991) *Gene* 105:61-72]). 코돈은 종종 "코돈 최적화"로 지칭되는 과정에서 특정 숙주의 바람직한 코돈 용법을 반영하도록 치환될 수 있다. 특정 원핵 또는 진핵 숙주에 의해 선호되는 코돈을 포함하는 최적화된 코딩 서열은 예를 들면 번역 속도를 증가시키도록, 또는 바람직한 특성 (예컨대 비-최적화 서열로부터 생성되는 전사체와 비교하였을 때 더 긴 반감기)을 가지는 재조합 RNA 전사체를 생성시키도록 제조될 수 있다.
- [0121] VII. 융합 단백질 전사 활성화인자의 발현
- [0122] 일부 실시양태에서, 식물 TAD 상호작용 모티프 (또는 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD)를 코딩하는 1종 이상의 폴리뉴클레오티드 서열 및 DNA-결합 도메인을 코딩하는 1종 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 1종 이상의 융합 단백질-코딩 핵산 분자(들)는 거기에서의 융합 단백질의 발현을 위해 세포, 조직 또는 생물체에 도입될 수 있다.
- [0123] 예를 들어 일부 실시양태에서, 그와 같은 핵산 분자는 예를 들면 비제한적으로 선형 플라스미드 및 폐쇄된 원형 플라스미드를 포함하는 벡터 시스템일 수 있다. 특정 예에서, 벡터는 발현 벡터일 수 있다. 특정 실시양태에 따른 핵산 서열은 예를 들면 핵산 서열이 1종 이상의 조절 서열에 작용가능하게 연결되도록 벡터에 삽입될 수 있다. 많은 벡터들이 이와 같은 목적으로 가용한데, 구체적인 벡터의 선택은 예를 들면 벡터에 삽입될 핵산의 크기, 벡터를 사용하여 형질전환될 구체적인 숙주 세포, 및/또는 발현되기를 원하는 융합 단백질의 양에 따라 달라질 수 있다. 벡터는 통상적으로 다양한 구성요소들을 포함하고 있으며, 그의 확인은 벡터의 기능 (예컨대 DNA의 증폭 및 DNA의 발현), 및 벡터가 상용성인 구체적인 숙주 세포(들)에 따라 달라진다.
- [0124] 일부 실시양태는 1종 이상의 DNA-결합 도메인에 작용가능하게 연결된 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프, 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 1종 이상의 뉴클레오티드 서열(들)에 작용가능하게 연결된 1종 이상의 조절 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물 형질전환 벡터를 포함할 수 있다. 상기 1종 이상의 뉴클레오티드 서열(들)은 식물 세포, 조직 또는 생물체 내에서 조절 서열(들)의 조절하에 발현되어 융합 단백질을 생성시킬 수 있다.
- [0125] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 DNA-결합 도메인에 작용가능하게 연결된 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프, 변이 TAD 상호작용 모티프, 식물 TAD 또는 변이 TAD를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 1종 이상의 뉴클레오티드 서열(들)에 작용가능하게 연결된 조절 서열은 핵산 분자가 증폭될 세균 세포와 같은 숙주 세포, 또는 핵산 분자가 발현될 식물 세포에서 기능하는 프로모터 서열일 수 있다.
- [0126] 일부 실시양태에 따른 핵산 분자에서 사용하기에 적합한 프로모터에는 유도가능한 것들, 바이러스인 것들, 합성인 것들 또는 상시성인 것들이 포함되는데, 모두 업계에 잘 알려져 있다. 본 발명의 실시양태에서 유용할 수 있는 프로모터의 비-제한적인 예들은 U.S. 특허 제6,437,217호 (옥수수 RS81 프로모터); 5,641,876호 (벼 액틴 프로모터); 6,426,446호 (옥수수 RS324 프로모터); 6,429,362호 (옥수수 PR-1 프로모터); 6,232,526호 (옥수수 A3 프로모터); 6,177,611호 (상시성 옥수수 프로모터); 5,322,938호, 5,352,605호, 5,359,142호, 및 5,530,196호 (35S 프로모터); 6,433,252호 (옥수수 L3 올레오신 프로모터); 6,429,357호 (벼 액틴 2 프로모터, 및 벼 액틴 2 인트론); 6,294,714호 (고도-유도가능 프로모터); 6,140,078호 (염-유도가능 프로모터); 6,252,138호 (병원체-유도가능 프로모터); 6,175,060호 (인 결핍-유도가능 프로모터); 6,388,170호 (양방향 프로모터); 6,635,806호 (감마-코익신 프로모터); 그리고 U.S. 특허 출원 제09/757,089호 (옥수수 엽록체 알돌라제 프로모터)에 제공되어 있다.
- [0127] 추가적인 대표적 프로모터에는 노팔린 신타제 (NOS) 프로모터 (문헌 [Ebert *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(16):5745-9]); 옥토파인 신타제 (OCS) 프로모터 (*야그로박테리움 투메파시엔스*의 중앙-유도 플라스미드에 포함되어 있음); 카올리모바이러스 프로모터 예컨대 꽃양배추 모자이크 바이러스 (CaMV) 19S 프로모터 (문헌 [Lawton *et al.* (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:315-24]); CaMV 35S 프로모터 (문헌 [Ode11 *et al.* (1985) *Nature* 313:810-2]); 현삼 모자이크 바이러스 35S-프로모터 (문헌 [Walker *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad.*

*Sci. USA* 84(19):6624-8]); 수크로스 신타제 프로모터 (문헌 [Yang and Russell (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4144-8]); R 유전자 복합체 프로모터 (문헌 [Chandler *et al.* (1989) *Plant Cell* 1:1175-83]); 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자 프로모터; CaMV35S (U.S. 특허 제5,322,938호, 5,352,605호, 5,359,142호, 및 5,530,196호); FMV35S (U.S. 특허 제6,051,753호, 및 5,378,619호); PC1SV 프로모터 (U.S. 특허 제5,850,019호); SCP1 프로모터 (U.S. 특허 제6,677,503호); 및 AGRtu.nos 프로모터 (진뱅크(GenBank) 사 등재 번호 V00087; 문헌 [Depicker *et al.* (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1 :561-73]; [Bevan *et al.* (1983) *Nature* 304:184-7])가 포함된다.

[0128] 구체적 실시양태에서, 본 발명의 핵산 분자는 조직-특이적 프로모터를 포함할 수 있다. 조직-특이적 프로모터는 프로모터가 다른 생물체 조직에 비해 특이적인 조직에서 작용가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열의 더 높은 수준의 전사를 유도하는 뉴클레오티드 서열이다. 조직-특이적 프로모터의 예에는 비제한적으로 피막-특이적 프로모터; 꽃밥-특이적 프로모터; 화분-특이적 프로모터 (예컨대 U.S. 특허 제7,141,424호, 및 국제 PCT 공개 제WO 99/042587호 참조); 배주-특이적 프로모터 (예컨대 U.S. 특허 출원 제2001/047525 A1호 참조); 과일-특이적 프로모터 (예컨대 U.S. 특허 제4,943,674호, 및 5,753,475호 참조); 및 종자-특이적 프로모터 (예컨대 U.S. 특허 제5,420,034호, 및 5,608,152호 참조)가 포함된다. 일부 실시양태에서는, 발생 단계-특이적 프로모터 (예컨대 더 후기의 발생 단계에서 활성인 프로모터)가 본 발명의 조성물 또는 방법에 사용될 수 있다.

[0129] 일부 실시양태에서 핵산 분자에 작용가능하게 연결될 수 있는 추가적인 조절 서열에는 번역 리더 서열로서 기능하는 프로모터 서열과 코딩 서열 사이에 위치하는 5' UTR이 포함된다. 번역 리더 서열은 완전히 프로세싱된 mRNA에 존재하며, 일차 전사체의 프로세싱 및/또는 RNA 안정성에 영향을 줄 수 있다. 번역 리더 서열의 예에는 옥수수 및 페튜니아 열 충격 단백질 리더 (U.S. 특허 제5,362,865호), 식물 바이러스 코트 단백질 리더, 식물 루비스코 리더 등이 포함된다. 예를 들면, 문헌 [Turner and Foster (1995) *Molecular Biotech.* 3(3):225-36]을 참조하라. 5' UTR의 비-제한적인 예는 GmHsp (U.S. 특허 제5,659,122호); PhDnaK (U.S. 특허 제 5,362,865호); AtAnt1; TEV (문헌 [Carrington and Freed (1990) *J Virol.* 64:1590-7]); 및 AGRtunos (진뱅크 사 등재 번호 V00087; 및 상기 문헌 [Bevan *et al.* (1983)])에 제공되어 있다.

[0130] 일부 실시양태에서 핵산 분자에 작용가능하게 연결될 수 있는 추가적인 조절 서열에는 또한 3' 비-번역 서열, 3' 전사 종료 영역 또는 폴리-아데닐화 영역이 포함된다. 이들은 뉴클레오티드 서열의 하류에 위치하는 유전 요소로서, 폴리-아데닐화 신호, 및/또는 전사 또는 mRNA 프로세싱에 영향을 줄 수 있는 다른 조절 신호를 제공하는 폴리뉴클레오티드가 포함된다. 폴리-아데닐화 신호는 식물에서 mRNA 전구체의 3' 말단에 대한 폴리-아데닐레이트 뉴클레오티드의 첨가를 야기하는 기능을 한다. 폴리-아데닐화 서열은 다양한 식물 유전자 또는 T-DNA 유전자에서 유래할 수 있다. 3' 전사 종료 영역의 비-제한적인 예는 노팔린 신타제 3' 영역 (nos 3'; 문헌 [Fralely *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7])이다. 여러 3' 비번역 영역들의 사용례가 문헌 [Ingelbrecht *et al.* (1989) *Plant Cell* 1:671-80]에 제공되어 있다. 폴리-아데닐화 신호의 비-제한적인 예에는 피숨 사티붐(*Pisum sativum*) RbcS2 유전자 (Ps.RbcS2-E9; 문헌 [Coruzzi *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:1671-9]) 및 AGRtu.nos (진뱅크 사 등재 번호 E01312)의 것이 포함된다.

[0131] 구체적 실시양태들에서 유용할 수 있는 조절 서열에 관한 추가적인 정보는 예를 들면 문헌 [Goeddel (1990) "Gene Expression Technology," *Methods Enzymol.* 185, Academic Press, San Diego, CA]에 기술되어 있다.

[0132] 본 발명의 재조합 핵산 분자 또는 벡터는 식물 세포와 같은 형질전환된 세포에 선택가능한 표현형을 부여하는 선택가능 마커를 포함할 수 있다. 선택가능 마커는 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 식물 또는 식물 세포를 선택하는 데에 사용될 수도 있다. 상기 마커는 살생제 내성, 항생제 내성 (예컨대 카나마이신, 제네티신 (G418), 블레오마이신 및 하이그로마이신), 또는 체초제 내성 (예컨대 글리포세이트)을 코딩할 수 있다. 선택가능 마커의 예에는 카나마이신 내성을 부여하며 예컨대 카나마이신 및 G418을 사용하여 선택될 수 있는 *neo* 유전자; 비알라포스 내성을 부여하는 *bar* 유전자; 글리포세이트 내성을 부여하는 돌연변이 EPSP 신타제 유전자; 브로목시닐에 대한 내성을 부여하는 니트릴라제 유전자; 이미다졸린온 또는 술폰닐우레아 내성을 부여하는 돌연변이 아세트라테이트 신타제 유전자 (ALS); 및 메토틱세이트-내성 DHFR 유전자가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들면 비제한적으로 암피실린; 블레오마이신; 클로르암페니콜; 겐타마이신; 하이그로마이신; 카나마이신; 린코마이신; 메토틱세이트; 포스포노트리신; 퓨로마이신; 스펙티노마이신; 리팜피신 스트렙토마이신; 및 테트라사이클린을 포함하여, 화학적 작용제에 대한 내성을 부여하는 다수의 선택가능 마커들이 가용하다. 그와 같은 선택가능 마커의 예는 예컨대 U.S. 특허 5,550,318호; 5,633,435호; 5,780,708호 및 6,118,047호에 예시되어 있다.

- [0133] 본 발명의 핵산 분자 또는 벡터는 또한 또는 대안적으로 스크리닝가능 마커를 포함할 수 있다. 스크리닝가능 마커는 발현을 모니터링하는 데에 사용될 수 있다. 대표적인 스크리닝가능 마커에는 다양한 발색원성 기질이 알려져 있는 효소를 코딩하는  $\beta$ -글루쿠로니다제 또는 uidA 유전자 (*GUS*) (문헌 [Jefferson *et al.* (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405]); 식물 조직에서 안토시아닌 색소 (적색 색상)의 생성을 조절하는 생성물을 코딩하는 R-좌위 유전자 (문헌 [Dellaporta *et al.* (1988) "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon tagging with Ac." In *18th Stadler Genetics Symposium*, P. Gustafson and R. Appels, eds., Plenum, NY (pp. 263-82)]);  $\beta$ -락타마제 유전자 (문헌 [Sutcliffe *et al.* (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-41]); 다양한 발색원성 기질이 알려져 있는 효소를 코딩하는 유전자 (예컨대 PADAC, 발색원성 세팔로스포린); 루시페라제 유전자 (문헌 [Ow *et al.* (1986) *Science* 234:856-9]); 발색원성 카테콜을 전환하는 카테콜 디옥시제나제를 코딩하는 *xyIE* 유전자 (문헌 [Zukowski *et al.* (1983) *Gene* 46(2-3):247-55]); 아밀라제 유전자 (문헌 [Ikatsu *et al.* (1990) *Bio/Technol.* 8:241-2]); 다시 멜라닌으로 축합되는 DOPA 및 도파퀸으로 티로신을 산화시킬 수 있는 효소를 코딩하는 티로시나제 유전자 (문헌 [Katz *et al.* (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-14]); 및  $\alpha$ -갈락토시다제가 포함된다.
- [0134] 숙주 세포의 형질전환을 위한 적합한 방법에는 DNA가 세포에 도입될 수 있는 모든 방법, 예를 들면 비제한적으로 원형질체의 형질전환에 의한 것 (예컨대 U.S. 특허 5,508,184호 참조); 건조/억제-매개 DNA 흡수에 의한 것 (예컨대 문헌 [Potrykus *et al.* (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-8] 참조); 전기천공에 의한 것 (예컨대 U.S. 특허 5,384,253호 참조); 규소 카르바이드 섬유를 사용한 요동에 의한 것 (예컨대 U.S. 특허 5,302,523호 및 5,464,765호 참조); *아그로박테리움*-매개 형질전환에 의한 것 (예컨대 U.S. 특허 5,563,055호, 5,591,616호, 5,693,512호, 5,824,877호, 5,981,840호, 및 6,384,301호 참조); 및 DNA-코팅 입자의 가속에 의한 것 (예컨대 U.S. 특허 5,015,580호, 5,550,318호, 5,538,880호, 6,160,208호, 6,399,861호, 및 6,403,865호 참조)이 포함된다. 이들과 같은 기술들의 적용을 통하여, 사실상 모든 종의 세포가 안정하게 형질전환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 형질전환 DNA는 숙주 세포의 게놈에 통합된다. 다세포 종의 경우, 트랜스제닉 세포는 트랜스제닉 생물체로 재생될 수 있다. 이들 기술 중 어느 것도 예를 들면 트랜스제닉 식물의 게놈에 본 발명의 1종 이상 핵산 서열을 포함하는 트랜스제닉 식물을 생성시키는 데에 사용될 수 있다.
- [0135] 발현 벡터를 식물에 도입하는 데에 가장 광범위하게 이용되는 방법은 *아그로박테리움*의 자연 형질전환 시스템을 기반으로 한다. *에이. 투메파시엔스* 및 *에이. 리조게네스*(*A. rhizogenes*)는 식물 세포를 유전적으로 변환시키는 식물 병원성 토양 세균이다. *에이. 투메파시엔스* 및 *에이. 리조게네스*의 T<sub>i</sub> 및 R<sub>i</sub> 플라스미드는 각각 식물의 유전적 변환을 담당하는 유전자들을 보유하고 있다. T<sub>i</sub> (종양-유도)-플라스미드는 형질전환되는 식물로 전달되는 T-DNA로 알려져 있는 대형 분절을 포함한다. T<sub>i</sub> 플라스미드의 또 다른 분절인 vir 영역은 T-DNA 전달을 담당한다. T-DNA 영역은 각각 말단 반복 뉴클레오티드 서열로 구성되어 있는 좌측 및 우측 보더(border)에 둘러싸여 있다. 일부 변형된 이원 벡터(binary vector)에는 종양-유도 유전자가 결실되어 있으며, vir 영역의 기능이 T-DNA 보더 서열에 둘러싸인 외래 DNA를 전달하는 데에 이용된다. T-영역은 예를 들면 트랜스제닉 식물 및 세포의 효율적인 회수를 위한 선택가능 마커, 및 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 핵산과 같은 전달용 서열을 삽입하기 위한 다수의 클로닝 부위를 포함할 수도 있다.
- [0136] 따라서, 일부 실시양태에서, 식물 형질전환 벡터는 *에이. 투메파시엔스*의 T<sub>i</sub> 플라스미드 (예컨대 U.S. 특허 제 4,536,475호, 4,693,977호, 4,886,937호, 및 5,501,967호; 그리고 유럽 특허 EP 0 122 791호 참조) 또는 *에이. 리조게네스*의 R<sub>i</sub> 플라스미드로부터 유래한다. 추가적인 식물 형질전환 벡터에는 예를 들면 비제한적으로 문헌 [Herrera-Estrella *et al.* (1983) *Nature* 303:209-13]; 상기 문헌 [Bevan *et al.* (1983)]; [Klee *et al.* (1985) *Bio/Technol.* 3:637-42]; 및 유럽 특허 EP 0 120 516호에 기술되어 있는 것들; 그리고 전기 중 어느 것으로부터 유래하는 것들이 포함된다. 자연상에서 식물과 상호작용하는 다른 세균, 예컨대 *시노리조븀* (*Sinorhizobium*), *리조븀*(*Rhizobium*) 및 *메소리조븀*(*Mesorhizobium*)이 수많은 다양한 식물에 대한 유전자 전달을 매개하도록 변형될 수 있다. 이러한 식물-관련 공생 세균들은 안전화된 T<sub>i</sub> 플라스미드 및 적합한 이원 벡터 양자의 획득에 의해 유전자 전달용으로 적격화될 수 있다.
- [0137] 피공여자 세포에 외인성 DNA를 제공한 후에는, 추가적인 배양 및 식물 재생을 위하여 일반적으로 형질전환된 세포가 확인된다. 형질전환된 세포를 확인하는 능력을 향상시키기 위하여, 형질전환체를 생성시키는 데에 사용되는 벡터와 함께, 전기에서 제시된 바와 같은 선택가능 또는 스크리닝가능 마커 유전자를 사용할 필요가 있을 수 있다. 선택가능 마커가 사용되는 경우, 형질전환된 세포는 선택 작용제 또는 작용제들에 세포를 노출시키는 것

에 의해 잠재적으로 형질전환된 세포 군집 내에서 확인된다. 스크리닝가능 마커가 사용되는 경우, 세포는 원하는 마커 유전자 특질에 대하여 스크리닝될 수 있다.

[0138] 선택 작용제에의 노출에서 생존하는 세포, 또는 스크리닝 검정에서 긍정적인 점수를 받는 세포는 식물의 재생을 부양하는 배지에서 배양될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 성장 조절제와 같은 추가 물질을 포함하는 것에 의해 소정의 적합한 식물 조직 배양 배지 (예컨대 MS 및 N6 배지)가 변형될 수도 있다. 식물 재생 작업을 개시하기에 충분한 조직이 가용할 때까지, 또는 반복적인 수동 선택 단계 후 조직의 형태구조가 재생에 적합해질 때까지 (예컨대 2주 이상) 성장 조절제를 포함하는 기본 배지에서 조직이 유지된 다음, 새싹 형성에 도움이 되는 배지로 이전될 수도 있다. 배양물은 충분한 새싹 형성이 이루어질 때까지 주기적으로 이전된다. 일단 새싹이 형성되고 나면, 그것은 뿌리 형성에 도움이 되는 배지로 이전된다. 일단 충분한 뿌리가 형성되고 나면, 식물은 추가적인 성장 및 성숙을 위하여 토양으로 이전될 수 있다.

[0139] 재생 식물에서의 관심 핵산 분자 (예를 들면 1종 이상의 본 발명 용합 단백질을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열)의 존재를 확인하기 위하여, 다양한 검정들이 수행될 수 있다. 그와 같은 검정에는 예를 들면 분자 생물학적 검정, 예컨대 서던 및 노던 블러팅, PCR, 및 핵산 서열분석; 생화학적 검정, 예컨대 면역학적 수단 (ELISA 및/또는 웨스턴 블롯)에 의해 또는 효소 기능에 의해 단백질 생성물의 존재를 검출하는 것; 식물 부분 검정, 예컨대 잎 또는 뿌리 검정; 그리고 전체 재생 식물의 표현형의 분석이 포함된다.

[0140] 통합 사례는 예를 들면 관심 뉴클레오티드 서열에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용한 PCR 증폭에 의해 분석될 수 있다. PCR 유전형분석은 게놈에 통합된 관심 핵산 분자를 포함할 것으로 예상되는 단리된 숙주 식물 조직으로부터 유래하는 게놈 DNA의 폴리머라제-연쇄 반응 (PCR) 증폭 후 이어지는 표준 클로닝 및 PCR 증폭 생성물의 서열 분석을 포함하는 것으로 알려져 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. PCR 유전형분석 방법에 대해서는 충분히 기술되어 있어서 (예컨대 문헌 [Rios, G. *et al.* (2002) *Plant J.* 32:243-53] 참조), 세포 배양물을 포함한 모든 식물 종 또는 조직 유형으로부터 유래하는 게놈 DNA에 적용될 수 있다.

[0141] *아그로박테리움* 의존성 형질전환법을 사용하여 형성된 트랜스제닉 식물은 통상적으로 하나의 염색체에 삽입된 단일 재조합 DNA 서열을 포함한다. 상기 단일 재조합 DNA 서열은 "트랜스제닉 사례" 또는 "통합 사례"로 지칭된다. 이와 같은 트랜스제닉 식물은 삽입된 DNA 서열에 대하여 이형접합성이다. 일부 실시양태에서는, 단일 외인성 유전자 서열을 포함하는 독립적인 별도의 트랜스제닉 식물을 그 자체, 예를 들면 F<sub>0</sub> 식물에 유성 교배 (자가생식)시켜 F<sub>1</sub> 종자를 생성시키는 것에 의해 이전유전자와 관련하여 동형접합성인 트랜스제닉 식물이 수득될 수도 있다. 생성되는 F<sub>1</sub> 종자의 4분의 1은 이전유전자와 관련하여 동형접합성일 것이다. F<sub>1</sub> 종자를 받아서키는 것은 통상적으로 이형접합체와 동형접합체 사이의 구별을 가능케 하는 SNP 검정 또는 열 증폭 검정 (즉 접합성 검정)을 사용하여 이형접합성에 대해 시험될 수 있는 식물로 이어진다.

[0142] 특정 실시양태에서는, 1종 이상의 합성 전사 활성화인자 용합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 1종 이상의 핵산 분자(들)가 도입되어 있는 세포에서, 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프 (및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프) 및 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 1종 이상의 합성 전사 활성화인자 용합 단백질의 카피들이 생성된다. 각 합성 전사 활성화인자 용합 단백질은 여러 형질전환 사례로 도입된 다수의 핵산 서열로부터, 또는 단일 형질전환 사례로 도입된 단일 핵산 서열로부터 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 복수의 그와 같은 용합 단백질은 단일 프로모터의 조절하에 발현될 수 있다. 다른 실시양태에서, 복수의 그와 같은 용합 단백질은 다수 프로모터의 조절하에 발현될 수 있다.

[0143] 본 발명의 핵산 분자를 사용한 식물 또는 식물 세포의 직접적인 형질전환 이외에도, 일부 실시양태에서는, 1종 이상의 트랜스제닉 사례를 가지는 제1 식물을 그와 같은 사례가 결핍되어 있는 제2 식물과 교배시키는 것에 의해 트랜스제닉 식물이 제조될 수 있다. 예를 들면, 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프 (및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프) 및 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 합성 전사 활성화인자 용합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 형질전환에 적합한 제1 식물 주에 도입됨으로써 트랜스제닉 식물이 생성될 수 있으며, 그와 같은 트랜스제닉 식물은 합성 전사 활성화인자 용합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 제2 식물 주에 유전자이입시키기 위하여 제2 식물 주와 교배될 수 있다.

[0144] VIII. 용합 단백질 전사 활성화인자를 포함하는 식물 재료

[0145] 일부 실시양태에서는, 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프 (및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프) 및 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 합성 전사 활성화인자 용합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물 세포를 포함하는 식물이 제공된다. 특정 실시양태에서, 그와 같은 식물은 식물 조직 또는 식물 세포의 형

질전환 및 전체 식물의 재생에 의해 생성될 수 있다. 추가적인 실시양태에서, 그와 같은 식물은 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산의 배형질(germplasm)에의 유전자이입을 통하여 획득될 수 있다. 그와 같은 식물 세포를 포함하는 식물 재료도 제공된다. 그와 같은 식물 재료는 상기 식물 세포를 포함하는 식물로부터 획득될 수 있다.

[0146] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프 (및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프) 및 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 트랜스제닉 식물 또는 식물 재료는 하기의 특성들 중 1종 이상을 나타낼 수 있다: 식물의 세포에서의 융합 단백질의 발현; 식물 세포의 색소체에서의 융합 단백질의 발현; 식물 세포의 핵에서의 융합 단백질의 발현; 식물의 세포에서의 융합 단백질의 국소화; 식물 세포의 계놈에서의 뉴클레오티드 서열의 통합; 식물 세포의 염색체-외 DNA에서의 뉴클레오티드 서열의 존재; 및/또는 식물의 세포에서의 뉴클레오티드 서열에 상응하는 RNA 전사체의 존재. 이와 같은 식물은 추가적으로 코딩된 융합 단백질의 발현이 아닌 다른 1종 이상의 바람직한 특질을 가질 수도 있다. 그와 같은 특질에는 식물의 세포에서 융합 단백질에 의해 그의 발현이 조절되는 내인성 또는 트랜스제닉 뉴클레오티드 서열의 발현에 기인하는 것들, 예를 들면 비제한적으로 곤충, 기타 해충 및 병-유발 작용제에 대한 저항성; 제조제에 대한 내성; 향상된 안정성, 수율 또는 저장 기간; 환경적 내성; 약제 생성; 산업용 생성물 생성; 및 영양 강화가 포함될 수 있다.

[0147] 본 발명에 따른 트랜스제닉 식물은 본 발명의 핵산 분자를 사용하여 형질전환될 수 있는 모든 식물일 수 있다. 따라서, 식물은 쌍떡잎식물 또는 외떡잎식물일 수 있다. 본 발명의 방법에 사용가능한 쌍떡잎 식물의 비-제한적인 예에는 *아라비도시스*, 알팔파, 콩, 브로콜리, 양배추, 카놀라, 당근, 꽃양배추, 셀러리, 중국 양배추, 면, 오이, 가지, 상추, 멜론, 완두콩, 후추, 땅콩, 감자, 호박, 무, 평지, 시금치, 대두, 스쿼시, 사탕무, 해바라기, 담배, 토마토 및 수박이 포함된다. 본 발명의 방법에 사용가능한 외떡잎 식물의 비-제한적인 예에는 옥수수, 양과, 벼, 수수, 밀, 호밀, 기장, 사탕수수, 귀리, 라이미, 스위치그래스 및 잔디가 포함된다. 본 발명에 따른 트랜스제닉 식물은 어떠한 방식으로든 사용 또는 경작될 수 있다.

[0148] 일부 실시양태는 또한 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프 (및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프) 및 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 1종 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 원자재 생성물; 예를 들면 그와 같은 뉴클레오티드 서열 1종 이상을 포함하는 재조합 식물 또는 종자로부터 생성된 원자재 생성물을 제공한다. 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프 (및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프) 및 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 1종 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 원자재 생성물에는 예를 들면 비제한적으로 식품 생성물, 곡분, 오일, 또는 그와 같은 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 1종 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물의 분쇄 또는 온전 곡물 또는 종자가 포함된다. 1종 이상 원자재 또는 원자재 생성물에서의 본 발명의 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 1종 이상 뉴클레오티드 서열의 검출은 그 원자재 또는 원자재 생성물이 적어도 부분적으로는 본 발명의 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 1종 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물로부터 생성되었다는 사실상의 증거가 된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 원자재 생성물은 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프 (및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프) 및 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 검출가능한 양으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 그와 같은 원자재 생성물은 예를 들면 트랜스제닉 식물을 획득하여 그로부터 식품 또는 사료를 제조하는 것에 의해 제조될 수 있다.

[0149] 일부 실시양태에서, 본 발명의 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 이 전유전자를 포함하는 트랜스제닉 식물 또는 종자는 비제한적으로 RNAi 분자가 전사되는 트랜스제닉 사례; 살곤충 단백질 (예컨대 *바실러스 튠지엔시스*(*Bacillus thuringiensis*) 살곤충 단백질)을 코딩하는 유전자; 제조제 내성 유전자 (예컨대 글리포세이트에 대한 내성을 제공하는 유전자); 및 트랜스제닉 식물에서의 바람직한 표현형 (예컨대 증가된 수율, 변경된 지방산 대사, 또는 세포질 응성 불임의 회복)에 기여하는 유전자를 포함하여, 그의 계놈에 1종 이상의 다른 트랜스제닉 사례를 포함할 수도 있다.

[0150] 일부 실시양태에서, 본 발명의 합성 전사 활성화인자 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 이 전유전자를 포함하는 트랜스제닉 식물 또는 종자는 비제한적으로 변경된 지방산 대사 특질을 위한 내인성 유전자 표적, 건조 내성 특질을 위한 내인성 유전자 표적, 질소 사용 효율 특질을 위한 내인성 유전자 표적, 또는 트랜스제닉 식물에서의 바람직한 표현형 (예컨대 증가된 수율, 또는 세포질 응성 불임의 회복)에 기여하는 소정의 다른 내인성 유전자 표적을 포함하여, 트랜스제닉 식물의 계놈 내에 내인성 또는 고유 유전자 표적을 포함할 수 있다. 내인성 또는 고유 유전자 표적은 합성 전사 활성화인자 융합 단백질이 특이적으로 결합함으로써 표적

유전자의 전사에 영향을 주는 뉴클레오티드 서열에 작용가능하게 연결될 수 있다.

[0151]

*IX. 융합 단백질 전사 활성화인자에 의한 발현의 조절*

[0152]

일부 실시양태에서, 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프 (및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프) 및 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질은 세포에서 관심 뉴클레오티드 서열 (예컨대 관심 유전자)의 발현을 증가시키는 데에 (예컨대 개시하는 데에) 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 관심 뉴클레오티드 서열은 세포의 게놈에 대하여 내인성일 수 있다. 다른 실시양태에서는, 관심 뉴클레오티드 서열을 포함하는 1종 이상의 외인성 핵산 분자(들)가 세포에 도입된다. 일반적으로, 제2 뉴클레오티드 서열과 융합 단백질 사이에 안정하고 특이적인 결합이 이루어질 수 있도록, 관심 뉴클레오티드 서열에 작용가능하게 연결된 제2 뉴클레오티드 서열이 융합 단백질의 DNA-결합 도메인에 의해 인식되게 된다. 일부 예에서, 관심 뉴클레오티드 서열을 포함하는 1종 이상의 핵산 분자(들)는 그와 같은 제2 뉴클레오티드 서열을 추가적으로 포함한다. 일부 예에서, 관심 뉴클레오티드 서열을 포함하는 1종 이상의 핵산 분자(들)는 관심 뉴클레오티드 서열이 숙주 세포에 대하여 내인성인 제2 뉴클레오티드 서열에 작용가능하게 연결되도록 숙주 세포에 도입된다. 예를 들면, 관심 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자는 관심 뉴클레오티드 서열이 DNA-결합 도메인에 의해 인식되는 내인성 서열에 작용가능하게 연결되도록 관심 뉴클레오티드 서열을 숙주 세포의 게놈에 삽입하는 동종 재조합을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 뉴클레오티드 서열을 포함하는 1종 이상의 핵산 분자(들)는 숙주 세포 내의 내인성이거나 고유의 것이어서, 관심 뉴클레오티드 서열이 숙주 세포에 내인성인 제2 뉴클레오티드 서열에 작용가능하게 연결되어 있다.

[0153]

일부 예에서는, 서로 다른 형질전환 사례로 도입되는 다수의 관심 뉴클레오티드 서열(들)이 단일 융합 단백질의 조절적 제어하에 발현될 수 있다. 다른 예에서는, 단일 관심 뉴클레오티드 서열 (예컨대 단일 통합 사례)이 조절 및 발현된다. 일부 실시양태에서는, 복수의 관심 뉴클레오티드 서열들이 단일 핵산 결합 부위에 대한 본 발명 융합 단백질의 결합에 의해 조절될 수 있는데; 예를 들면, 복수의 관심 뉴클레오티드 서열들이 모두 융합 단백질의 DNA-결합 도메인이 특이적으로 결합하는 동일한 제2 뉴클레오티드 서열에 작용가능하게 연결되어 있을 수 있다. 소정 예에서, 그와 같은 복수를 포함하는 관심 뉴클레오티드 서열들이 반드시 동일할 필요는 없다. 예컨대, 다수의 상이한 유전자 생성물들이 단일 융합 단백질의 조절적 제어하에 발현될 수 있다.

[0154]

특정 실시양태에서, 본 발명 융합 단백질의 조절적 제어하에 있는 관심 뉴클레오티드 서열의 발현 생성물은 마커 유전자 생성물; 예를 들면 비제한적으로 형광 분자일 수 있다. 그와 같은 발현 생성물의 발현과 관련한 정량 및 정성적 관찰은 특정 TAD 상호작용 모티프 또는 TAD 상호작용 모티프 변이체의 구체적인 조절 특성을 평가하는 시스템을 제공할 수 있다.

[0155]

어떠한 발현 생성물 (예컨대 단백질, 전구체 단백질, 및 억제 RNA 분자)도 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프 (및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프) 및 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 조절적 제어하에 발현될 수 있다. 특정 예에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 조절적 제어하에 있는 발현 생성물은 비제한적으로 융합 단백질을 코딩하는 핵산이 도입되는 숙주 세포에서 정상적으로 발현되는 내인성 또는 고유 폴리펩티드일 수 있다. 다른 예에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 조절적 제어하에 있는 발현 생성물은 정상적으로는 숙주 세포에서 발현되지 않는 이종유래 폴리펩티드일 수 있다. 비제한적으로 예를 들면, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 조절적 제어하에 있는 발현 생성물은 제조내 내성, 바이러스 저항성, 세균 병원체 저항성, 곤충 저항성, 선충 저항성, 또는 진균 저항성과 연관되어 있는 폴리펩티드일 수 있다. 예를 들면, U.S. 특허 5,569,823호; 5,304,730호; 5,495,071호; 6,329,504호; 및 6,337,431호를 참조하라. 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 조절적 제어하에 있는 발현 생성물은 다르게는 예를 들면 비제한적으로 식물 활력 또는 수율과 연관되어 있는 폴리펩티드 (극한의 온도, 토양 조건, 광 수준, 물 수준 및 화학적 환경에 대한 내성과 연관되어 있는 폴리펩티드 포함), 또는 관심 특질을 포함하는 식물을 확인하기 위한 마커로 사용될 수 있는 폴리펩티드 (예컨대 선택가능 마커 유전자 생성물, 및 종자 색상과 연관되어 있는 폴리펩티드)일 수 있다.

[0156]

본 발명의 일부 실시양태에서, 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프 (및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프) 및 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 조절적 제어하에 있을 수 있는 폴리펩티드의 비-제한적인 예에는 하기가 포함된다: 아세토락타제 신타제 (ALS), 돌연변이된 ALS 및 ALS의 전구체 (예컨대 U.S. 특허 5,013,659호 참조); EPSPS (예컨대 U.S. 특허 4,971,908호 및 6,225,114호 참조), 예컨대 CP4 EPSPS 또는 클래스 III EPSPS; 예를 들면 비제한적으로 광합성, 그리고 지방산, 아미노산, 오일, 아로티노이드, 테르페노이드 및 전분의 합성을 포함하여, 색소체에서 이루어지는 생리학적 과정을 변형시키는 효소. 특

정 실시양태에서, 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 조절적 제어하에 있을 수 있는 폴리펩티드의 다른 비-제한적인 예에는 하기가 포함된다: 제아크산틴 에폭시다제, 콜린 모노옥시제나제, 페로길레이타제, 오메가-3 지방산 대새츄라제, 글루타민 신테타제, 전분 변형 효소, 필수 아미노산, 프로비타민 A, 호르몬, Bt 독소 및 단백질의 합성에 연관되어 있는 폴리펩티드. 상기 언급된 펩티드들을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 업계에서 구입 가능한데, 그와 같은 뉴클레오티드 서열들은 1종 이상의 식물 TAD 상호작용 모티프 (및/또는 변이 TAD 상호작용 모티프) 및 작용가능하게 연결된 부위에 특이적으로 결합하는 1종 이상의 DNA-결합 도메인을 포함하는 합성 전사 활성화인자 융합 단백질의 조절적 제어하에 발현되도록, DNA-결합 도메인에 대한 특이적 결합 부위에 작용가능하게 연결될 수 있다.

[0157] 더하여, 조절적 제어하에 위치될 상기 언급된 폴리펩티드들 중 어느 것을 코딩하는 관심 변이 뉴클레오티드 서열이 업계 숙련자에 의해 확인될 수 있다 (예를 들면 특정 폴리펩티드를 코딩하는 다른 유전자와 높은 상동성을 가지는 유전자의 클로닝에 의하거나, 또는 DNA 코돈 축퇴성을 고려한 인 실리코(*in silico*) 서열 생성에 의함). 특정 실시양태에서, 그와 같은 변이체들은 예를 들면 숙주 생물체의 바람직한 코돈 용법에 부합하도록 하는 데에 바람직할 수 있다. 일단 그와 같은 관심 변이 뉴클레오티드 서열이 확인되고 나면, 예를 들면 핵산 분자의 관심 변이 뉴클레오티드 서열을 사용될 특정 합성 전사 활성화인자 융합 단백질 내에 포함되어 있는 DNA-결합 도메인을 위한 알려져 있는 결합 부위에 작용가능하게 연결시키는 것에 의해, 본 발명에 따른 합성 전사 활성화인자 폴리펩티드에 의한 서열의 조절적 제어를 제공할 핵산 분자가 설계될 수 있다. 본원에서 기술되는 실시양태에서는, 핵산 분자, 및 본원에서 기술되는 특정 합성 전사 활성화인자 융합 단백질들 중 1종이 동시에 숙주 세포에 존재할 경우, 그와 같은 관심 변이 뉴클레오티드 서열의 발현에 있어서의 놀라운 증가가 (예컨대 숙주 식물 세포에서) 관찰될 수 있다.

[0158] 본원에서 논의되는 참고문헌들은 본 출원 출원일 전의 그의 개시내용을 위해서만 제공된다. 본원의 어느 것도 본 발명자들이 선행 발명을 이유로 그와 같은 개시내용에 선행할 자격을 받지 못한다는 것을 인정하는 것으로 간주되어서는 아니된다.

[0159] 하기의 실시예들은 소정의 구체적인 특징 및/또는 실시양태들을 예시하기 위하여 제공된다. 실시예들이 예시되어 있는 구체적인 특징 또는 실시양태로 본 개시를 제한하는 것으로 간주되어서는 아니된다.

[0160] **[실시예]**

[0161] 실시예 1: 식물 전사활성화 상호작용 모티프의 확인

[0162] 하기 7종의 단백질이 VP16 전사활성화 도메인 (서열 1)과 동종인 것으로 확인되었다: PTI4 (진뱅크 사 등재 번호 ACF57857.1), ERF2 (진뱅크 사 등재 번호 NP\_199533.1), AtERF1 (진뱅크 사 등재 번호 NP\_567530.4), ORCA2 (진뱅크 사 등재 번호 CAB93940.1), DREB1A (진뱅크 사 등재 번호 NP\_567720.1), CBF1 (진뱅크 사 등재 번호 NP\_567721.1), 및 DOF1 (진뱅크 사 등재 번호 NP\_001105709.1). VP16 전사활성화 도메인 (서열 1)의 아미노산 서열이 이들 추정상 식물 전사 활성화인자들의 영역과 서열 유사성을 공유하였으므로, VP16 서열을 각 활성화인자 내의 전사활성화 도메인을 찾아내는 데에 사용하였다. 이들 식물 활성화인자 단백질에 대하여 확인된 전사활성화 도메인들은 하기이다: 서열 2 (PTI4), 서열 3 (ERF2), 서열 4 (AtERF1), 서열 5 (ORCA2), 서열 6 (DREB1A), 서열 7 (CBF1), 및 서열 8 (DOF1). 다음에, VP16 전사활성화 하위도메인 II의 상호작용 모티프 (도 1; 서열 9)를 사용하여 식물 전사활성화 도메인으로부터 상호작용 모티프를 찾았다. 도 2는 VP16의 식물 전사활성화 도메인들과의 정렬을 나타내는데, 신규 상호작용 모티프들을 강조하여 나타내었다.

[0163] 실시예 2: 확인된 식물 전사활성화 도메인 상호작용 모티프의 변형

[0164] 확인된 식물 전사활성화 도메인의 상호작용 모티프들을 변형시켰다. VP16 전사활성화 도메인 하위도메인 II의 상호작용 모티프의 아미노산 접촉 잔기들을 포함하는 상호작용 모티프의 새로운 변이체들을 생성시켰다 (문헌 [Langlois *et al.* (2008) *J. Am. Chem. Soc.* 130:10596]). VP16 전사활성화 도메인의 6개 아미노산 접촉 잔기들이 전사 인자 TFIIH의 서브유닛인 Tfb1과 직접적으로 접촉하는 것으로 알려져 있다 (도 1). 새롭게-확인된 식물 전사활성화 도메인의 상호작용 모티프 내에 아미노산을 도입하여, 변이 서열을 생성시켰다.

[0165] 본 발명자들은 하위도메인 II의 VP16 상호작용 모티프로부터 확인된 6개의 아미노산 접촉 잔기를 포함하도록 상호작용 모티프를 변경시키는 것이 훨씬 더 다양한 전사 인자들과 상호작용함으로써 더 높은 수준의 단백질 발현을 초래할 수 있는 식물 활성화인자의 변형된 상호작용 모티프를 생성시키게 될 것으로 가설을 세웠다.

[0166] ERF2 변형

- [0167] ERF2의 Asn53 내지 Ala85의 영역이 VP16 전사활성화 도메인의 하위도메인 II에 정렬됨으로써 (도 2), ERF2의 식물 전사활성화 도메인 서열로 확인되었다. VP16 전사활성화 도메인 하위도메인 II의 상호작용 모티프 (Asp66 내지 Asp76)에 해당하는 것으로 밝혀진 영역에 변형을 도입하였다. VP16 전사활성화 도메인 하위도메인 II의 상호작용 모티프의 6개의 접촉 잔기와 상이한 아미노산 잔기들을 변형시켰다. 이러한 변경은 VP16 전사활성화 도메인 하위도메인 II의 것과 유사한 ERF2의 대표적인 변형 상호작용 모티프 (즉 변이 상호작용 모티프 서열)로 이어졌다 (도 3).
- [0168] PTI4, AtERF1, ORCA2, DREB1A, CBF1 및 DOF1 상호작용 모티프의 변형
- [0169] ERF2에 도입된 것과 유사한 변형들을 PTI4, AtERF1, ORCA2, DREB1A, CBF1 및 DOF1 상호작용 모티프에 도입하였다. VP16 전사활성화 도메인 하위도메인 II의 상호작용 모티프의 6개의 직접 접촉 잔기와 상이한 고유 서열의 아미노산 잔기들을 변형시킴으로써, 대표적인 변이 상호작용 모티프들을 생성시켰다. 이러한 변화들은 식물 변이 상호작용 모티프가 VP16 전사활성화 도메인 하위도메인 II의 것과 유사하게 (예컨대 기능적으로 유사하게) 되도록 도입되었다. VP16 전사활성화 도메인 하위도메인 II의 고유한 상호작용 모티프 서열과 비교하였을 때의 이러한 변이 또는 변형 상호작용 모티프들의 대표적인 서열을 도 4-9에 열거하였다.
- [0170] 실시예 3: 사카로마이세스 세레비시아에 리포터 균주에서의 식물 활성화 도메인의 상호작용 모티프 시험
- [0171] 사카로마이세스 세레비시아에 리포터 균주
- [0172] 고유 또는 변이 상호작용 모티프 중 어느 하나를 포함하는 식물 활성화 도메인들을 시험하기 위하여, 사카로마이세스 세레비시아에 리포터 균주를 생성시켰다. 3-단계 클로닝 절차로써 효모 통합 벡터 pHO-zBG-MEL1의 구성을 초래하였다 (도 10).
- [0173] 먼저, PCR을 통하여 효모 SSA 리포터 벡터인 pNorMEL1 (문헌 [Doyon *et al.* (2008) *Nat. Biotechnol.* 26(6):702-8]의 2개의 개별 단편들을 증폭시켰다. 제1 단편은 효모 KanMX 발현 카세트를 포함하였으며, 각각 5' *SpeI*, *BamHI*, *NheI*, *PacI*, *BglIII*, *KpnI*, 및 3' *EcoRI* 제한 부위를 추가하는 프라이머 KanMX-For (서열 59) 및 KanMX-Rev (서열 60)를 사용하여 pNorMEL1으로부터 증폭하였다. 제2 단편은 세균 복제 기원에 의해 분리된 효모 *HO* 좌위에 대한 외향면 상동성 암들(outward-facing homology arms)을 포함하였는데 (문헌 [Voth *et al.* (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(12):E59-9]), 프라이머 HO-For (서열 61) 및 HO-Rev (서열 62)를 사용하여 증폭하였다. 상기 2개의 단편을 *EcoRI/SpeI*로 분해한 후 결합시켜, KanMX 선택가능 HO-표적화 벡터를 생성시켰다.
- [0174] 다음에, MEL1-For (서열 63) 및 MEL1-Rev (서열 64) 프라이머를 사용하여 pMEL1 $\alpha$ 2 (문헌 [Melcher *et al.* (2000) *Gene* 247(1-2):53-61]) 유래의 MEL1 발현 카세트를 증폭하고, KanMX 선택가능 HO-표적화 벡터의 *KpnI* 부위에 클로닝하였다.
- [0175] 최종적으로, 외부 사업자 (DNA2.0 사, 캘리포니아 멘로 파크 소재)에 의해 징크 핑거 단백질 (ZFP)-결합 부위 (고도 친화성 부위인 "HAS"로 지칭됨)를 새로 합성하였다. 이 부위는 인간 CCR5 유전자를 표적으로 하는 징크-핑거 단백질 (ZFP)을 위한 결합 부위를 포함하였다 (문헌 [Perez *et al.* (2008) *Nat. Biotechnol.* 26:808-16]). 프라이머 HAS-For-F1 (서열 65) 및 HAS-For-R1 (서열 66)을 사용하여 상기 HAS 단편을 PCR-증폭한 후, *MEL1* 리포터 유전자의 상류에 위치하는 KanMX HO MEL1 벡터의 *BamHI-PacI* 부위에 클로닝하였다. 이와 같은 최종 벡터를 pHO-zBG-MEL1으로 지칭하였다 (도 10).
- [0176] 효모 *HO* 좌위에 표적화하기 위한 측면동반 상동성 암을 노출시키기 위하여 *NotI*를 사용하여 pHO-zBG-MEL1을 선형화하고, 제조자의 제안 프로토콜을 사용하여 에스. 세레비시아에 균주 BY4741 *MATa* (인비트로젠(Invitrogen) 사, 캘리포니아 칼스배드 소재)에 형질전환시켰다. 간단하게 말하자면, 3 mL의 log 단계 BY4741 배양물을 펠렛화하고, TEL 완충제 (10 mM 트리스 HCL pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM 리튬 아세테이트) 중에서 세척하였다. 상기 효모 세포 펠렛을 3  $\mu$ g의 선형화된 pHO-zBG-MEL1을 함유하는 360  $\mu$ L의 효모 형질전환 용액 (1 $\times$  TE 중 33.3 % PEG-3350 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich) 사, 미주리 세인트루이스 소재), 0.1 M 리튬 아세테이트 (시그마-알드리치 사), 및 0.2 mg/mL 연어 정자 DNA (스트라타젠(Stratagene) 사, 캘리포니아 라졸라 소재)에 재현탁하고, 42  $^{\circ}$ C에서 40분 동안 열-충격시켰다. 효모 세포를 펠렛화하여, 세척하고, 1 mg/L 제네티신(Geneticin)<sup>®</sup> (라이프 테크놀로지스(Life Technologies) 사, 캘리포니아 칼스배드 소재)을 함유하는 YPD 플레이트 상에서의 선택 전에 2시간 동안 풍부 배지에서 성장시켰다. 내성 클론을 YPD+제네티신<sup>®</sup> 플레이트에 재도말하고, 이후의 형질전환에 사용하였다.

- [0177] 효모 ZFP-전사 활성화인자 발현 카세트 구성
- [0178] 인-프레임 CCR5 징크 핑거 결합 단백질 (CCR5-ZFP)-식물 전사활성화 상호작용 모티프를 포함하는 DNA 구성체를 구성하였다. 서열 80-93에 기술되어 있는 고유 및 변이 식물 전사활성화 상호작용 모티프들을 *BamHI/HindIII* 제한 효소 단편으로서 이동화한 후, CCR5-ZFP 도메인을 코딩하는 서열 바로 하류에 클로닝하였다 (상기 문헌 [Perez *et al.* (2008)]). 생성되는 ZFP-전사 활성화인자 발현 카세트는 GAL1,10 프로모터 (문헌 [West *et al.* (1987) *Genes Dev.* 1:1118-31]) 및 CYC1 종료자 (문헌 [Osborne *et al.* (1988) *Genes Dev.* 2:766-72])를 이용하였으며, 효모 pRS315 시리즈 벡터를 기반으로 하였다. 생성 벡터는 CCR5-ZFP와의 인-프레임 융합체로서 고유 및 변이 식물 전사활성화 상호작용 모티프를 포함하였다.
- [0179] 더하여, 몇 가지 대조를 포함시켰다. 빈 벡터 대조, 및 2종의 상이한 VP-16 전사 활성화인자 발현 카세트 SGM0 VP16-CCR5 (서열 79) 및 VP16v2 CCR5-CCR5를 연구에 사용하였다. 양 VP-16 전사 활성화인자 발현 카세트들은 GAL1,10 프로모터에 의해 구동되었으며, CYC1 종료자에 의해 종료되었다. 빈 벡터 대조는 CCR5-ZFP 도메인만을 포함하였으며, 전사활성화 상호작용 모티프는 포함하지 않았다.
- [0180] 효모 활성 검정
- [0181] BY4741 리포터 주 균주의 밤샘 배양물을 YPD+제네티신<sup>®</sup>에서 성장시키고, 96-웰 포맷에서 표준 효모 형질전환 프로토콜을 사용하여 ZFP-전사 활성화인자 발현 카세트를 포함하는 1  $\mu$ g의 벡터를 전달하였다. 모든 형질전환은 2반복이었다. 형질전환된 효모 세포를 류신이 결핍되어 있는 합성 텍스트로스 배지 (SD-Leu)에서 회수하여, ZFP-전사 활성화인자 발현 카세트를 포함하는 벡터에 대하여 선택하였다. 72시간 후, SD-Leu에서의 형질전환체의 1:10 희석에 의해 효모 세포를 보강한 후, 추가 24시간 성장시켰다. 다음에, 류신이 결핍되어 있는 합성 라피노스 배지 (SR-Leu)에 효모 세포를 1:10 희석함으로써, GAL1,10 프로모터를 탈-억제(de-repress)하였다. 24 시간 후, 효모 세포를 펠렛화하고, 류신이 결핍되어 있는 합성 갈락토스 배지 (SG-Leu)에 재현탁하였다. 갈락토스-유도 0, 3 및 6시간 후 시점에, MEL1 검정을 위하여 110  $\mu$ L의 효모 세포를 수확하였다.
- [0182] MEL1 검정에서는, 110  $\mu$ L의 효모 세포 중 100  $\mu$ L를 100  $\mu$ L의 물에 희석한 후, 분광광도측정기를 사용하여 600 nm에서의 광학 밀도 (OD<sub>600</sub>)를 측정하였다. 나머지 10  $\mu$ L의 효모 세포는 90  $\mu$ L의 MEL1 완충제 (77 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 61 mM 시트르산, 2 mg/mL PNPG (시그마-알드리치 사)) 중에서 30 °C로 1시간 동안 인큐베이션하였다. 100  $\mu$ L의 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>의 첨가에 의해 반응을 중지시켰다. OD<sub>405</sub>에서 MEL1 활성을 평가하고, OD<sub>405</sub>와 OD<sub>600</sub> 측정치의 비를 바탕으로 하는 수학적식을 사용하여 mU를 계산하였다 (문헌 [Doyon *et al.* (2008) *Nat. Biotechnol.* 26(6):702-8]).
- [0183] 여러 식물 전사활성화 상호작용 모티프에 의한 활성화로부터 초래되는 *Me11* 리포터 유전자의 발현 수준을 도 11에 나타내었다. 이러한 여러 식물 전사활성화 상호작용 모티프로부터 초래되는 MEL1 단백질의 발현을 빈 벡터 대조, 및 VP16 전사활성화 도메인의 하위도메인 II (서열 1) (VP16(v2)-CCR5) 및 SGM0 VP16 (SGM0 VP16-CCR5)로부터의 *Me11*의 활성화와 비교하였다.
- [0184] 변형된 ERF2 (v2) 식물 전사활성화 상호작용 모티프는 VP16 대조와 비교하였을 때 예상치 못한 높은 발현 수준을 산출하였다. 또한, 이 변이 식물 전사활성화 상호작용 모티프를 사용한 *Me11*의 발현은 고유 버전의 ERF2 (v3) 식물 전사활성화 상호작용 모티프에 대비한 증가로 이어졌다.
- [0185] 변형된 PT14 (v2) 식물 전사활성화 상호작용 모티프는 VP16 전사활성화 도메인 대조와 유사한 수준으로 MEL1 단백질을 발현하였다. 그러나, PT14 상호작용 모티프에 도입된 변형은 고유 PT14 (v3) 식물 전사활성화 상호작용 모티프와 비교하였을 때에는 상당히 더 높은 *Me11* 발현 수준으로 이어졌다.
- [0186] AtERF1 (v3), AtERF1 (v2), ORCA2 (v3), ORCA2 (v2), DOF1 (v3), DOF1 (v2), DREB1A (v3), DREB1A (v2), CBF1 (v3) 및 CBF1 (v2) 식물 전사활성화 상호작용 모티프는 효모 검정에서 VP16 대조와 비교하였을 때 높은 *Me11* 발현 수준으로 이어지지 않았다. 그러나, AtERF1, DREB1A 및 CBF1 식물 전사활성화 상호작용 모티프는 효모에서 *Me11*의 발현을 구동하기는 하였다. ORCA2 (v3) 및 DOF1 (v2) 식물 전사활성화 상호작용 모티프만이 효모 검정에서 어떠한 *Me11*의 발현도 초래하지 않았다.
- [0187] 변형된 변이 (v2) 식물 전사활성화 상호작용 모티프에 있어서 식물 전사활성화 도메인에 의해 생성되는 MEL1의 수준은 일반적으로 *Me11* 효모 검정에서 고유 (v3) 식물 전사활성화 상호작용 모티프와 비교하였을 때 더 높았다. 효모 검정에서 *Me11*의 발현을 구동하지 않은 유일한 변형된 식물 전사활성화 상호작용 모티프는 DOF1

(v2) 상호작용 모티프이었다. 이 식물 전사활성화 상호작용 모티프는 효모 검정에서 어떠한 MEL1 발현도 산출하지 않았다.

- [0188] 실시예 4: 징크 핑거 DNA 결합 도메인을 포함하는 리포터 구성체를 포함하는 담배에서의 식물 활성화 도메인 상호작용 모티프의 기능
- [0189] 리포터 구성체 pDAB9897
- [0190] 클로닝을 용이하게 하기 위하여 5' 및 3' 말단에 *SacII* 부위를 부가하면서, Z6 DNA 결합 도메인 폴리뉴클레오티드 서열 (서열 67; 문헌 [Yokoi *et al.* (2007) *Mol Ther.* 15(11):1917-23])의 8개 연속 반복체를 새로 합성하였다 (IDT 사, 아이오와 코랄스빌 소재). 이후, 전체 8×-Z6 결합 도메인 (서열 68)을 원하는 식물 발현 요소를 포함하는 기존 게이트웨이(Gateway)<sup>®</sup> 진입 벡터에 클로닝하였다. 8×-Z6 결합 부위를 *SacII* 단편 상에 이동화하고, 백본 벡터에서 발견되는 유일한 *SacII* 부위를 사용하여 *아라비도시스 탈리아나*(*Arabidopsis thaliana*) 액틴-2 프로모터 (AtAct2 프로모터 v2; 문헌 [An *et al.* (1996) *Plant J.* 10:107-21])의 바로 상류에 클로닝하였다. 이어서, 유일한 *NcoI/SacI* 부위를 사용하여 *에이. 탈리아나* 액틴-2 프로모터의 직접 조절하에 있는 이와 같은 벡터에 *gus* 유전자 (GUS; 문헌 [Jefferson (1989) *Nature* 342:837-8])를 클로닝하였다 (*NcoI* 부위의 ATG 코돈이 개시 코돈을 형성함). 전사를 종료시키는 데에는 *Atu* ORF23 3'UTR (*아그로박테리움 투메파시엔스* 오픈 리딩 프레임-23, 3' 비번역 영역; 유럽 특허 출원 제EP 222493 A1호)을 사용하였다.
- [0191] *에이. 탈리아나* 유비퀴틴-10 프로모터 (At Ubi10 프로모터 v2 (문헌 [Callis *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:12486-93])); 포스포노트리신 아세틸 트랜스퍼라제 유전자 (*pat* v3 (문헌 [Wohlleben *et al.* (1988) *Gene* 70:25-37])); *에이. 투메파시엔스* 오픈 리딩 프레임-1, 3' 비번역 영역 (AtuORF1 3'UTR v3 (문헌 [Huang *et al.* (1990) *J. Bacteriol.* 172:1814-22])) 선택가능 마커 카세트 (식물 선택용)를 포함하는 전달 벡터 (destination vector)와의 게이트웨이<sup>®</sup> 결합의 결과는 최종 형질전환 벡터 pDAB9897 (도 12)이었다. 서열분석을 통하여 최종 형질전환 벡터를 확인하고, *에이. 투메파시엔스* 균주 LBA4404 (인비트로젠 사, 캘리포니아 칼스배드 소재)에 형질전환시켰다.
- [0192] pDAB9897을 사용한 담배의 *아그로박테리움*-매개 형질전환
- [0193] 트랜스제닉 리포터 식물 사례를 만들기 위하여, *페티트 하바나*(*Petit Havana*) 담배 식물로부터 절단된 잎 디스크 (1 cm<sup>2</sup>)를 플라스미드 pDAB9897을 보유하며 OD<sub>600</sub> ~1.2 nm까지 성장시킨 *에이. 투메파시엔스* 균주 LBA4404의 밤샘 배양물 중에서 인큐베이팅하여, 무균 여과지 상에서 흡수 건조시킨 다음, 네스코필름(Nescofilm)<sup>®</sup> (카를란 리서치 프라덕츠 코포레이션(Karlan Research Products Corporation) 사, 애리조나 코튼우드 소재)로 밀봉된 60×20 mm 접시 (접시 당 5개 디스크)에서, MS 배지 (피토테크놀로지 랩스(Phytotechnology Labs) 사, 캔자스 쇼우니 미션 소재) 및 30 g/L의 수크로스 상에 위치시키고, 1 mg/L의 인돌아세트산 및 1 mg/L의 벤지아미노 퓨린을 첨가하였다. 공동-배양 48시간 후, 잎 디스크를 250 mg/L의 세포탁심 및 5 mg/L의 바스타(BASTA)<sup>®</sup>를 포함하는 동일 배지로 이전하였다. 3-4주 후, 잎 수확 및 분자 분석 전에, 식물체를 피타트레이스(PhytaTrays)<sup>™</sup>에서 250 mg/L의 세포탁심 및 10 mg/L의 바스타<sup>®</sup>를 포함하는 MS 배지로 추가 2-3주 동안 이전하였다.
- [0194] 리포터 사례의 카피 수 및 PTU 분석
- [0195] PCR DNA 단리. 새로-성장된 식물체로부터 트랜스제닉 담배 식물 조직을 수확하고, 96-웰 수집 플레이트 (키아젠(Qiagen) 사, 캘리포니아 발렌시아 소재)에서 2일 이상 동안 동결건조하였다 (랩콘코(Labconco) 사, 미주리 캔사스 시티 소재). 다음에, DNEasy<sup>™</sup> 96 웰 추출 키트 (키아젠 사)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 DNA를 단리하였다. 조직 파괴에는 모델 2-96A 클레코(Kleco)<sup>™</sup> 조직 분쇄기 (가르시아 매뉴팩처링(Garcia Manufacturing) 사, 캘리포니아 비살리아 소재)를 사용하였다.
- [0196] 서던 DNA 단리. 새로-성장된 식물체로부터 트랜스제닉 담배 식물 조직을 수확하고, 2 mL 원추형 튜브 (에펜도르프(Eppendorf) 사)에서 2일 이상 동안 동결건조하였다 (랩콘코 사, 미주리 캔사스 시티 소재). 다음에, DNEasy<sup>™</sup> 식물 미니 추출 키트 (키아젠 사)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 DNA를 단리하였다. 조직 파괴에는 모델 2-96A 클레코<sup>™</sup> 조직 분쇄기 (가르시아 매뉴팩처링 사)를 사용하였다.
- [0197] DNA 정량. 퀀트(Quant)-iT<sup>™</sup> 피코그린(PicoGreen)<sup>®</sup> DNA 검정 키트 (몰큘라 브로브스(Molecular Probes), 인비트로젠 사, 캘리포니아 칼스배드 소재)를 사용하여 생성 계승 DNA를 정량하였다. 표준 곡선 생성을 위하여, 20

ng/μL 내지 1.25 ng/μL (연속 희석) 범위의 5종의 사전-정량 DNA 표준물을 사용하였다. 1:10 또는 1:20 희석을 사용하여 먼저 샘플을 검정의 선형 범위에 속하도록 희석한 후, 제조자의 프로토콜에 따라 계놈 DNA의 농도를 측정하였다. 다음에, 시너지(Synergy)2™ 플레이트 해독기 (바이오텍(Biotek) 사, 버몬트 위누스키 소재)를 사용하여 형광을 기록하였다. 계놈 DNA 농도는 바탕 형광 보정으로부터 계산된 표준 곡선으로부터 추정하였다. 다음에, 바이오로봇(Biorobot)3000™-자동화 액체 핸들러 (키아젠 사)를 사용한 PCR을 위하여, TE 또는 물을 사용하여 10 ng/μL의 통상적인 농도로 DNA를 희석하였다. 서던 분석용 DNA는 희석하지 않고 유지하였다.

[0198] 카피 수 추정. 타크만(TaqMan)<sup>®</sup> 검정 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 사, 캘리포니아 칼스 배드 소재)과 유사한 다중화 DNA 가수분해 프로브 검정을 사용하여 추정상 트랜스제닉 사례들을 통합 복잡도에 대하여 분석하였다. *pat* 이전유전자 및 내인성 담배 참조 유전자 *pal* (페닐알라닌 암모늄 리아제; 진뱅크 사 등재 번호 AB008199) 양자에 대하여, 서열-특이적 프라이머 및 프로브들을 사용하여 이전유전자 삽입물의 카피 수를 추정하였다. 라이트사이클러(LightCycler)<sup>®</sup> 프로브 설계 소프트웨어 2.0 (로체 어플라이드 사이언스 (Roche Applied Science) 사, 인디애나 인디애나폴리스 소재)을 사용하여, 양 유전자에 대한 검정을 설계하였다. 라이트사이클러<sup>®</sup> 480 시스템 (로체 어플라이드 사이언스 사)을 사용하여 양 유전자에 대한 실시간 PCR을 평가하였다.

[0199] 증폭을 위하여, 0.4 μM의 각 프라이머 및 0.2 μM의 각 프로브를 함유하는 10 μL 부피의 다중 반응액 중 1×의 최종 농도로, 라이트사이클러<sup>®</sup> 480 프로브스 모 혼합물 (로체 어플라이드 사이언스 사)을 제조하였다 (표 1). 58 °C에서 38초 동안의 연장(extension)을 사용하여 2-단계 증폭 반응을 수행함으로써, 형광을 획득하였다. 모든 샘플은 3반복으로 진행하였으며, 각 샘플의 분석에는 평균 Ct 값을 사용하였다. 실시간 PCR 데이터의 분석은 상대적 정량분석 모듈(relative quant module)을 통해 라이트사이클러<sup>®</sup> 소프트웨어 (로체 어플라이드 사이언스 사)를 사용하여 수행되었는데, ΔΔCt법을 바탕으로 한다. 결과를 표준화하기 위하여, 단일 카피 보정자(calibrator)로부터의 gDNA 샘플이 포함되었다. 단일 카피 보정자 사례는 서던 분석에 의해 앞서 확인된 바 있어서, *pat* 유전자의 단일 삽입물을 가지고 있다는 것이 확인되었다.

표 1. *pat* 및 *pal* 가수분해 프로브 (HP) 검정 양자에 사용된 프라이머 및 프로브의 서열. 각 프로브의 형광 항원결정인자는 서로 달랐는데, 이는 검정이 다중 반응으로서 동시에 진행되는 것을 가능케 하였음.

프라이머	뉴클레오티드 서열(5'-3')	유형
TQPATS	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT (서열 69)	프라이머
TQPATA	CTTTGATGCCTATGTGACACGTAACAGT (서열 70)	프라이머
TQPATFQ	CY5-GGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGG-BHQ2 (서열 71)	Cy5 프로브
TQPALS	TACTATGACTTGATGTTGTGTGGTGACTGA (서열 72)	프라이머
TQPALA	GAGCGGTCTAAATTCCGACCCCTTATTC (서열 73)	프라이머
TQPALFQ	6FAM-AAACGATGGCAGGAGTGCCCTTTTCTATC AAT-BHQ1 (서열 74)	6FAM 프로브

[0200]

[0201] PTU PCR. 이후, 무손상 식물 전사 유닛 (PTU)용으로 PCR에 의해 저카피 사례를 스크리닝하였다. Blu636 (서열 75) 및 Blu637 (서열 76) 프라이머를 사용한 올바른 증폭은 Z6-Act2/GUS/AtORF23 PTU (3,771 bp)로 구성되는 3.7 kb 생성물로 이어졌다. 하기의 반응 조건과 함께, 푸전(Phusion)<sup>®</sup> GC 모 혼합물 (뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs) 사, 매사추세츠 비버리 소재)을 사용하였다: 98 °C로 30초 동안, 이어서 98 °C로 10초, 67 °C로 30초, 72 °C로 2분, 및 최종 연장으로서 72 °C로 10분 동안 30 주기. 상기에 상세하게 설명한 PTU PCR 반응 이외에도, 계놈 DNA 주형의 질을 확인하기 위하여, 내인성 유전자인 *chs* (칼콘 신타제; 진뱅크 사 등재 번호 FJ969391.1)의 증폭 역시 포함되었다. 3'CHS 순방향 (서열 77) 및 3'CHS 역방향 (서열 78) 프라이머가 반응에 포함됨으로써, 350 bp의 증폭 생성물을 생성시켰다. 이전유전자 프라이머 0.5 μM 및 내인성 참조 유전자 0.2 μM의 최종 농도와 함께, 20 μL의 반응액을 사용하였다.

- [0202] 서던 분석. 각 샘플에 대하여, 제한 효소인 *AseI* (뉴 잉글랜드 바이오랩스 사)를 사용하여 37 °C에서의 밤샘 인큐베이션에 의해, 5 µg의 게놈 DNA를 철저히 분해시켰다. 퀵 프레시프(Quick Precip)<sup>TM</sup> 용액 (엣지 바이오시스템즈(Edge Biosystems) 사, 메틸랜드 게이터스부르크 소재)을 사용한 침전에 의해 제조자 제안 프로토콜에 따라 분해된 DNA를 농축하였다. 다음에, 게놈 DNA를 65 °C에서 1시간 동안 25 µL의 물에 재현탁하였다. 재현탁된 샘플을 1× TAE 완충제 중에 제조된 0.8% 아가로스 겔 상에 적재하고, 1× TAE 중에서 1.1 V/cm로 밤새 전기영동시켰다. 겔을 변성 완충제 (0.2 M NaOH/0.6 M NaCl)에 30분 동안 침지한 후, 이어서 중화 완충제 (0.5 M 트리스-HCl (pH 7.5)/1.5 M NaCl)에 30분 동안 침지하였다.
- [0203] 크로마토그래피 페이퍼 심지 및 페이퍼 타월을 사용하여, 처리된 이모빌론(Immobilon)<sup>TM</sup>-NY+ 전달 멤브레인 (밀리포어(Millipore) 사, 매사추세츠 빌레리카 소재) 상에 겔을 통하여 밤새 20× SSC 완충제를 수동 삼출 (passively wicking)시킴으로써, 나일론 멤브레인으로서의 DNA 단편의 전달을 수행하였다. 전달 후, 2× SSC를 사용하여 멤브레인을 간략하게 세척하고, 스트라타링커(Stratalinker)<sup>®</sup> 1800 (스트라타진(Stratagene) 사, 캘리포니아 라졸라 소재)을 사용하여 가교-결합시킨 후, 80 °C에서 3시간 동안 진공 소성하였다.
- [0204] 로빈스 사이언티픽(Robbins Scientific) 모델 400 혼성화 인큐베이터 (로빈스 사이언티픽 사, 캘리포니아 서니베일 소재)를 사용하여 유리 플라 병에서 65 °C로 1시간 동안, 예비-혼성화 용액 (퍼펙트(Perfect)Hyb<sup>TM</sup> 플러스, 시그마-알드리치 사)을 사용하여 블럿(blot)을 인큐베이션하였다. 전체 코딩 서열을 포함하는 PCR 단편으로부터 프로브를 제조하였다. 키아엑스(Qiaex) II<sup>®</sup> 겔 추출 키트 (키아젠 사)를 사용하여 PCR 앰플리콘을 정제하고, 랜덤 RT 프라이머(Prime)-iT<sup>®</sup> 표지 키트 (스트라타젠 사, 캘리포니아 라졸라 소재)를 통하여 [<sup>α</sup><sup>32</sup>P]dCTP로 표지하였다. 대략 2백만 계수 블럿<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>까지 예비-혼성화 용액에 직접 첨가된 변성 프로브를 사용하여 65 °C로 밤새 블럿을 혼성화하였다. 혼성화 후, 65 °C에서 0.1× SSC/0.1% SDS를 사용하여 40분 동안, 순차적으로 블럿을 세척하였다. 최종적으로, 저장 인 영상화 스크린에 블럿을 노출시키고, 몰클라 다이내믹스(Molecular Dynamics)<sup>TM</sup> 스톰(Storm)<sup>TM</sup> 860 영상화 시스템을 사용하여 영상화하였다. 단일 혼성화 밴드의 확인에 의해 진정한 단일 카피 통합 사례를 확인하였다.
- [0205] 동형접합성 T<sub>2</sub> 리포터 식물의 생성
- [0206] 총 51종의 바스타<sup>®</sup>-내성 식물을 생성시켰는데, 이들 중 24종이 카피 수의 가수분해 프로브 분석으로 볼 때 저-복잡도 (1-2 카피의 *pat*)인 것으로 밝혀졌다. 이러한 저-복잡도 사례들 중, PCR 분석에 의해 측정하였을 때, 18종이 무손상 PTU를 나타내었다. 서던 블럿 분석 후, 2종의 단일-카피인 무손상 PTU 사례를 선택하여, 온실에서 성숙시까지 성장시키고, 거기에서 그것을 자가-수분시켰다. 다음에, T<sub>1</sub> 종자를 수집하여, 표면-멸균한 후 (20% 표백제 중에서 3분 후 이어지는 2회의 멸균 증류수 세정), 피타트레이스<sup>TM</sup> (시그마 사, 미주리 세인트루이스 소재)에서 MS 배지 (피토테크놀로지 랩스 사, 캔자스 쇼우니 미션 소재) 및 30 g/L의 슈크로스 상에 발아시켰다. *pat* 카피 수 분석을 통한 접합성 스크리닝 후, 동종접합성 T<sub>1</sub> 식물을 선택하여, 온실에서 성숙시까지 성장시키고, 자가-수분시켰다. 다음에, T<sub>2</sub> 종자를 수집하여, 표면-멸균하고, 전기한 바와 같이 발이시킨 후, 식물 전사활성화 시험을 위한 리포터 식물을 생성시키는 데에 사용하였다.
- [0207] 식물 ZFP-식물 전사 활성화인자 발현 구성체
- [0208] 변이 또는 고유 식물 전사활성화 상호작용 모티프를 포함하는 식물 ZFP-전사 활성화인자 구성체들을 구성하였다. 클로닝을 위한 제한 효소 부위 *BamHI/SacI*를 측면동반한 식물 전사활성화 상호작용 모티프 (고유 및 변형된 변이체 모두)를 새로 합성하였다 (DNA2.0 사, 캘리포니아 멘로 파크 소재). 식물 전사활성화 상호작용 모티프를 *BamHI/SacI* 단편 상에 이동화하고, 기존 게이트웨이<sup>®</sup> 진입 백본 벡터에서 발견되는 유일한 *BamHI/SacI* 부위를 사용하여 Z6 징크 핑거 DNA 결합 도메인의 바로 하류에 클로닝하였다 (상기 문헌 [Yokoi *et al.* (2007)]). 이와 같은 단계가 완료되면, ZFP-전사 활성화인자 구성체 (식물 전사활성화 상호작용 모티프에 융합된 Z6 DNA 징크 핑거 단백질 결합 도메인 포함)는 상시성 카사바 베인 모자이크 바이러스(Cassava Vein Mosaic Virus) 프로모터 (CsVMV 프로모터 v2; 문헌 [Verdaguer *et al.* (1996) *Plant Mol. Biol.* 31:1129-39])의 조절하에 위치되며, *에이. 투메파시엔스* 유래의 ORF23 3'UTR로 종료된다. 최종 형질전환 벡터 (표 2)는 식물 선택에 사용되었던 *에이. 탈리아나* 유비퀴틴-3 프로모터 (At Ubi3 프로모터 v2; 문헌 [Callis *et al.* (1995) *Genetics*, 139(2):921-39])/하이그로마이신 포스포프렌스퍼라제 II (HPTII v1; 문헌 [Gritz *et al.* (1983) *Gene* 25(2-3):179-88])/*에이. 투메파시엔스* 오픈 리딩 프레임-24 3' 비번역 영역 (Atu ORF24 3'UTR v2)

카세트를 포함하는 전달 벡터를 사용한 게이트웨이<sup>®</sup>-매개 결찰 (인비트로젠 사, 캘리포니아 칼스배드 소재)로부터 생성된다.

표 2. 담배에서 시험된 식물 ZFP-전사 활성화인자 구성체. 서열 식별자는 Z6 징크 핑거 결합 단백질에 융합되어 이원 벡터에서 발현된 식물 전사활성화 상호작용 모티프의 DNA 서열을 제공함.

식물 전사활성화 상호작용 모티프	구성체 번호 및 식물 전사활성화 상호작용 모티프 서열			
	고유		변형	
Pti4	pDAB107881	도 13 서열 81	pDAB106273	도 22 서열 88
AtERF1	pDAB107882	도 14 서열 82	pDAB106274	도 23 서열 89
ORCA2	pDAB107883	도 15 서열 83	pDAB106275	도 24 서열 90
Dreb1a	pDAB107884	도 16 서열 84	pDAB106276	도 25 서열 91
Dof1	pDAB107885	도 17 서열 86	pDAB106277	도 26 서열 93
ERF2	pDAB107886	도 18 서열 80	pDAB106278	도 27 서열 87
Cbfl	pDAB107887	도 19 서열 85	pDAB106279	도 28 서열 92
VP16	pDAB106272	도 20 서열 79	--	--
빈 벡터 - 징크 핑거 단백질 (전사활성화 상호작용 모티프 없음)	pDAB106238	도 21	--	--

[0209]

[0210]

DNA 서열분석을 통하여 최종 이원 벡터를 확인하고, *에이. 투메파시엔스* 균주인 LBA4404 (인비트로젠 사)로 형질전환시켰다. 더하여, 징크 핑거 결합 도메인을 포함하며 전사활성화 상호작용 모티프로 구성되는 활성화인자는 포함하지 않는 대조 벡터 pDAB106238 (도 21)을 포함시켰다. 이와 같은 구성물에서, 징크 핑거 결합 도메인은 상시성 *에이. 투메파시엔스* MAS 프로모터 (AtuMas 프로모터 v4; U.S. 특허 제5,001,060호; 5,573,932호 및 5,290,924호)의 조절하에 위치되며, *에이. 투메파시엔스* 유래의 ORF23 3'UTR로 종료된다. 또한, 벡터는 식물 선택에 사용되었던 *에이. 탈리아나* 유비퀴틴-3 프로모터/하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 II/*에이. 투메파시엔스* 오픈 리딩 프레임-24 3' 비번역 영역 카세트를 포함한다.

[0211]

식물 ZFP-전사 활성화인자 구성체를 포함하는 식물 사례를 생성시키기 위하여, T<sub>2</sub> 리포터 담배 식물로부터 절단된 잎 디스크 (1 cm<sup>2</sup>)를 표 2에 열거되어 있는 16종의 플라스미드들 중 1종을 보유하며 OD<sub>600</sub> ~1.2 nm까지 성장시킨 *에이. 투메파시엔스* 균주 LBA4404 (인비트로젠 사, 캘리포니아 칼스배드 소재)의 밤샘 배양물 중에서 인큐베이팅하여, 무균 여과지 상에서 흡수 건조시킨 다음, 네스코필름<sup>®</sup> (카를란 리서치 프라덕츠 코포레이션 사, 애리조나 코튼우드 소재)로 밀봉된 60×20 mm 접시 (접시 당 5개 디스크)에서, MS 배지 (피토테크놀로지 랩스 사, 캔자스 쇼우니 미션 소재) 및 30 g/L의 수크로스 상에 위치시키고, 1 mg/L의 인돌아세트산 및 1 mg/L의 벤지아미노 퓨린을 첨가하였다. 공동-배양 48시간 후, 잎 디스크를 250 mg/L의 세포탁심 및 10 mg/L의 하이그로마이신을 포함하는 동일 배지로 이전하였다. 3-4주 후, 식물체를 피타트레이스<sup>™</sup>에서 250 mg/L의 세포탁심 및 10 mg/L의 하이그로마이신을 포함하는 MS 배지로 추가 2-3주 동안 이전한 후, 이어서 잎을 수확하여 *gus* 발현을 분석하였다. 16종의 식물 전사 활성화인자 구성체 각각에 대하여 총 20-30종의 식물 사례가 생성되었다.

[0212]

*gus* 발현 분석

[0213]

mRNA 단리. 새로 성장하는 식물체로부터 트랜스제닉 담배 식물 조직을 수확하여, 96-웰 수집 플레이트 (키아젠 사) 내의 드라이 아이스 상에서 급속 냉동시켰다. 다음에, RNEasy<sup>®</sup> 96 웰 추출 키트 (키아젠 사)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 RNA를 단리하였다. 조직 파괴에는 모델 2-96A 클레코<sup>™</sup> 조직 분쇄기 (가르시아 매뉴팩처링 사)를 사용하였다.

[0214]

RNA 정량. 나노드롭(NanoDrop)<sup>™</sup> 8000 분광광도측정기 (서모 사이언티픽(Thermo Scientific) 사, 텔라웨어 일

밍턴 소재)를 사용하여, 생성 mRNA를 정량하였다. 4 µL의 미희석 샘플을 적제 및 정량하기 전에, 4 µL의 RNase가 없는 물을 사용하여 각 웰을 바탕화하였다. mRNA 농도는 표준 RNA 핵산 측정법을 사용하여 나노드롭™ 8000 소프트웨어로부터 추정되었다. mRNA는 ~83 ng/µL까지 RNase가 없는 물을 사용하여 수동-희석되었다.

[0215] cDNA 제조. 퀀티테스트(Quantitect)<sup>®</sup> RT 키트 (키아젠 사, 캘리포니아 칼스배드 소재)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 희석된 mRNA로부터 cDNA를 제조하였다. 1 µg의 총 mRNA를 각 반응에 사용하였다. 완료되면, 분석이 완료될 때까지 -20 °C에서 cDNA를 저장하였다.

[0216] RT-PCR. 모두 타크만<sup>®</sup> 검정과 유사한 2종의 DNA 가수분해 프로브 검정을 사용하여, 하이그로마이신에서 선택된 사례들을 *gus* 유전자 전사체 농도에 대하여 분석하였다. 서열-특이적 프라이머 및 프로브를 사용하여, 각 개별 사례에 있어서의 *gus* mRNA의 정상 상태 농도를 추정하였다. 내인성 담배 참조 유전자인 *BYEEF* (진뱅크 사 등재 번호 GI:927382)에 대하여, 정상 상태 mRNA 농도를 사용하여 mRNA를 표준화하였다. 양 유전자에 대한 검정은 라이트사이클러<sup>®</sup> 프로브 설계 소프트웨어 2.0 (로체 어플라이드 사이언스 사)을 사용하여 설계하였다. 라이트 사이클러<sup>®</sup> 480 시스템을 사용하여 양 유전자에 대한 실시간 PCR을 평가하였다. *gus* 증폭을 위하여, 0.4 µM의 각 프라이머 및 0.2 µM의 프로브를 포함하는 10 µL 부피의 다중 반응액 중 1×의 최종 농도로, 라이트사이클러<sup>®</sup> 480 프로브 모 혼합물을 제조하였다 (표 3).

[0217] 56 °C에서 40초 동안의 연장을 사용하여 2-단계 증폭 반응을 수행함으로써, 형광을 획득하였다. 모든 샘플은 희석 없이 3반복으로 진행하였으며, 각 샘플의 분석에는 평균 Ct 값을 사용하였다. *BYEEF* 증폭을 위하여, 0.25 µM의 각 프라이머 (표 3) 및 0.1 µM의 UPL 119 프로브 (로체 어플라이드 사이언스 사)를 포함하는 10 µL 부피의 다중 반응액 중 1×의 최종 농도로, 라이트사이클러<sup>®</sup> 480 프로브 모 혼합물을 제조하였다. 58 °C에서 25초 동안의 연장을 사용하여 2-단계 증폭 반응을 수행함으로써, 형광을 획득하였다. 모든 샘플은 1:10으로 희석하여 3반복으로 진행하였으며, 각 샘플의 분석에는 평균 Ct 값을 사용하였다. 실시간 PCR 데이터의 분석은 상대적 정량분석 모듈을 사용하는 라이트사이클러<sup>®</sup> 소프트웨어를 사용하여 수행되었는데, ΔΔCt법을 바탕으로 한다. 다음에, 여러 식물 전사 활성화인자 처리에서의 상대적 발현 수준을 비교하였다 (도 29).

표 3. *gus* 및 *BYEEF* 가수분해 프로브 (HP) 검정 양자에 사용된 프라이머 및 프로브의 서열.

프라이머	뉴클레오티드 서열 (5'-3')	유형
TQGUSS	AGACAGAGTGTGATATCTACCC (서열 75)	프라이머
TQGUSA	CCATCAGCACGTTATCGAAT (서열 76)	프라이머
TQUSFQ	6FAM-CACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTT-BHQ1 (서열 77)	6FAM 프로브
BYEEFU119F	AGGCTCCCACTTCAGGATG (서열 78)	프라이머
BYEEFU119R	CACGACCAACAGGGACAGTA (서열 79)	프라이머

[0218]  
[0219] **결과:**

[0220] 도 29는 *BYEEF* 내인성 유전자 발현 수준에 의해 표준화되었을 때의 여러 식물 전사활성화 상호작용 모티프에 있어서의 *gus* 전사체 농도의 최종 비를 나타낸다. 여러 식물 전사활성화 상호작용 모티프로부터의 *gus* 유전자의 활성을 빈 벡터 대조, 및 VP16 전사활성화 도메인 하위도메인 II의 상호작용 모티프와 비교하였다. 수종의 식물 전사활성화 상호작용 모티프들이 VP16 전사활성화인자의 하위도메인 II와 비교하였을 때 예상치 못한 높은 수준의 발현을 나타내었다. 예를 들어, PTI4, DREB1A, ERF2 및 CBF1 식물 전사활성화 상호작용 모티프는 VP16 전사 활성화 도메인의 하위도메인 II에 비해 더 많은 *gus* mRNA를 발현하였다.

[0221] 고유 버전 (v3)과 비교하였을 때의 변형된 변이체 (v2)의 식물 전사활성화 상호작용 모티프에 의해 생성되는 mRNA의 농도는 식물 전사활성화 상호작용 모티프들간에 가변적이었다. ERF2 식물 전사활성화 상호작용 모티프의 변형된 버전은 ERF2 고유 서열 상호작용 모티프에 비해 상당히 더 많은 *gus* mRNA를 생성시켰다. 마찬가지로, 변형된 CBF1 식물 전사활성화 상호작용 모티프는 CBF1 고유 서열 상호작용 모티프에 비해 더 많은 mRNA를 생성시켰다. 반대로, PTI4 및 DREB1A 전사활성화 상호작용 모티프 내에 도입된 변형들은 PTI4 및

DREB1A 식물 전사활성화 상호작용 모티프의 고유 버전과 비교하였을 때 더 낮은 *gus* mRNA 농도의 생성을 초래하였다.

[0222] 실시예 5: GAL4 리포터 구성체를 포함하는 담배에서의 상호작용 모티프 기능

[0223] GAL4 결합 도메인으로 구성되는 리포터 구성체를 포함하는 담배 주

[0224] 하기의 전략을 사용하여 리포터 구성체인 pGalGUS를 구성한다. 클로닝을 용이하게 하기 위하여 *SacII* 부위를 부가하면서, 효모 GAL4 결합 서열 및 23 bp 스페이서 영역 (문헌 [Baleja *et al.* (1997) *J. Biomol. NMR* 10:397-401]에 기술되어 있는 바와 같음)의 6개 연속 반복체를 새로 합성한다 (IDT 사). 상기 6× Gal4 결합 부위를 *SacII* 단편 상에 이동화하여, 역시 *SacII*를 사용하여 분해되는 기존 진입 벡터로부터의 Z6 결합 부위를 대체하는 데에 사용한다. 이와 같은 클로닝 단계는 GAL4 결합 부위를 *gus* 유전자의 발현을 구동하는 *아라비돕시스* 액틴 2 프로모터의 바로 상류에 위치시킨다. 최종 형질전환 벡터인 pGalGUS (도 30)는 식물 선택에 사용되는 *아라비돕시스* 유비퀴틴10 프로모터-*pat* 유전자 발현 카세트를 포함하는 전달 벡터를 사용하는 게이트웨이<sup>®</sup> 형질전환 반응으로부터 생성된다. 서열분석을 통하여 최종 형질전환 벡터를 확인한 후, *에이. 투메파시엔스* 균주인 LBA4404 (인비트로젠 사)로 형질전환시킨다.

[0225] pGALGUS를 사용한 담배의 아그로박테리움-매개 형질전환

[0226] 상기한 프로토콜을 사용하여 트랜스제닉 리포터 식물을 생성시킨다. "pDAB9897을 사용한 담배의 아그로박테리움-매개 형질전환"을 참조하라.

[0227] 리포터 사례의 카피 수 및 PTU 분석

[0228] 저-복잡도 카피 수의 바스타<sup>®</sup>-내성 트랜스제닉 식물을 생성시키고, 타크만<sup>®</sup> 카피 수 분석을 바탕으로 확인한다. 저-복잡도 사례들 중, PCR 분석에 의해 측정하였을 때, 일 하위군이 무손상 PTU를 나타낸다. 서던 블롯 분석을 통하여 이들 사례를 추가 분석한다. 서던 블롯 분석 후, 1종 이상의 단일-카피 무손상 PTU 사례를 선택하여, 온실에서 성숙시까지 성장시킨 후, 자가-수분시킨다. T<sub>1</sub> 종자를 수집하고, 표면 멸균한 후, 발아시킨다. *pat* 카피 수 분석을 통한 접합성 스크리닝 후, 동종접합성 T<sub>1</sub> 식물을 선택하여, 온실에서 성숙시까지 성장시킨 후, 자가-수분시킨다. 다음에, T<sub>2</sub> 종자를 수집하고, 표면 멸균한 후, 발아시켜 (전기한 바와 같음), 활성화인자 시험을 위한 리포터 식물을 생성시키는 데에 사용한다.

[0229] 식물 GAL4-전사 활성화인자 발현 구성체

[0230] 변이 또는 고유 식물 전사활성화 상호작용 모티프를 포함하는 식물 GAL4-전사 활성화인자 구성체들을 구성한다. 징크 핑거 결합 단백질 폴리뉴클레오티드 서열 대신 GAL4 결합 단백질 폴리뉴클레오티드 서열을 삽입함으로써, 실시예 4 ("식물 ZFP-식물 전사 활성화인자 발현 구성체")에서 기술된 식물 ZFP-전사 활성화인자 발현 구성체를 변형시킨다. 징크 핑거 결합 단백질 폴리뉴클레오티드 서열 대신, *NcoI/BamHI* 단편으로서 헤미코트(hemicot) 식물-최적화 GAL4 DNA 결합 도메인 폴리뉴클레오티드 서열 (문헌 [Keegan *et al.* (1986) *Science* 231(4739):699-704])을 삽입한다. 이와 같은 단계가 완료되면, GAL4-전사 활성화인자 구성체는 상시성 카사바 배인 모자이크 바이러스 프로모터의 조절하에 위치되며, *에이. 투메파시엔스* 유래의 ORF23 3'UTR로 종료된다. 최종 이원 형질전환 벡터는 식물 선택용의 *아라비돕시스* 유비퀴틴3-HptII 카세트를 포함하는 전달 벡터를 사용한 게이트웨이<sup>®</sup> 형질전환으로부터 생성되어 완료된다. 서열분석을 통하여 최종 형질전환 벡터를 확인한 후, *에이. 투메파시엔스* 균주인 LBA4404 (인비트로젠 사)로 형질전환시킨다.

[0231] 식물 GAL4-전사 활성화인자 구성체를 포함하는 식물 사례를 생성시키는 데에는, 실시예 4에 기술되어 있는 일시적 형질전환 프로토콜을 사용한다. 16종의 GAL4-전사 활성화인자 구성체들 각각에 대하여 총 20-30종의 식물 사례를 생성시킨다.

[0232] *gus* 발현 분석

[0233] 2종의 DNA 가수분해 프로브 검정을 사용하여, 하이그로마이신 상에서 선택된 사례들을 *gus* 유전자 전사체 농도에 대하여 분석한다. 서열 특이적 프라이머 및 프로브를 사용하여, 각 개별 사례에 있어서의 *gus* mRNA의 정상 상태 농도를 추정한다. 내인성 담배 참조 유전자, 예컨대 *BYEFP*에 대하여, 정상 상태 mRNA 농도를 사용하여 각 사례의 mRNA를 표준화한다. 양 유전자에 대한 검정은 실시예 4에 기술되어 있는 프로토콜을 사용하여

설계한다. 실시간 PCR 데이터의 분석은 상대적 정량분석 모듈을 사용하는 라이트사이클러<sup>®</sup> 소프트웨어를 사용하여 수행되는데,  $\Delta \Delta Ct$ 법을 바탕으로 한다. 여러 활성화인자 구성체에 있어서의 상대적 발현 수준을 비교한다. 결과는 식물 전사활성화 상호작용 모티프들, 및 이러한 식물 전사활성화 상호작용 모티프의 조각된 변이체들이 전사 활성화인자로서 사용될 수 있으며, 유전자의 전사 활성화용으로 GAL4 결합 단백질과 융합될 수 있다는 것을 나타낸다.

- [0234] 실시예 6: TAL 리포터 구성체를 포함하는 담배에서의 상호작용 모티프 기능
- [0235] TAL 결합 도메인으로 구성되는 리포터 구성체를 포함하는 담배 주
- [0236] 하기의 전략을 사용하여 리포터 구성체인 pTaIGUS를 구성한다. 클로닝을 용이하게 하기 위하여 *SacII* 부위를 부가하면서, AVRBS3-유도가능 유전자의 공통 결합 서열로부터 유래하며 UPA DNA 결합 도메인 (문헌 [Kay *et al.* (2009) *Plant J.* 59(6):859-71])으로 지칭되는 8개 연속 반복체 서열 (TATATAAACCTNNCCCTCT (서열 99))을 새로 합성한다 (IDT 사). 상기 8× UPA 결합 부위를 *SacII* 단편 상에 이동화하여, 역시 *SacII*를 사용하여 분해되는 기존 진입 벡터로부터의 Z6 결합 부위를 대체하는 데에 사용한다. 이와 같은 클로닝 단계는 UPA 결합 부위를 *gus* 유전자의 발현을 구동하는 *아라비도시스* 액틴 2 프로모터의 바로 상류에 위치시킨다. 최종 형질전환 벡터인 pTaIGUS (도 31)는 식물 선택에 사용되는 *에이. 탈리아나* 유비퀴틴10 프로모터/*pat* 유전자 발현 카세트를 포함하는 전달 벡터를 사용하는 게이트웨이<sup>®</sup> 형질전환 반응으로부터 생성된다. 서열분석을 통하여 최종 형질전환 벡터를 확인한 후, *에이. 투메파시엔스* 균주인 LBA4404 (인비트로젠 사)로 형질전환시킨다.
- [0237] pTALGUS를 사용한 담배의 아그로박테리움-매개 형질전환
- [0238] 상기한 프로토콜을 사용하여 트랜스제닉 리포터 식물을 생성시킨다. "pDAB9897을 사용한 담배의 아그로박테리움-매개 형질전환"을 참조하라.
- [0239] 리포터 사례의 카피 수 및 PTU 분석
- [0240] 저-복잡도 카피 수의 바스타<sup>®</sup>-내성 트랜스제닉 식물을 생성시키고, 타크만<sup>®</sup> 카피 수 분석을 이용하여 확인한다. 저-복잡도 사례들 중, PCR 분석에 의해 측정하였을 때, 일 하위군이 무손상 PTU를 나타낸다. 서던 블롯 분석을 통하여 이들 사례를 추가 분석한다. 서던 블롯 분석 후, 1종 이상의 단일-카피 무손상 PTU 사례를 선택하여, 온실에서 성숙시까지 성장시킨 후, 자가-수분시킨다. T<sub>1</sub> 종자를 수집하고, 표면 멸균한 후, 발아시킨다. *pat* 카피 수 분석을 통한 접합성 스크리닝 후, 동종접합성 T<sub>1</sub> 식물을 선택하여, 온실에서 성숙시까지 성장시킨 후, 자가-수분시킨다. 다음에, T<sub>2</sub> 종자를 수집하고, 표면 멸균한 후, 발아시켜 (전기한 바와 같음), 활성화인자 시험을 위한 리포터 식물을 생성시키는 데에 사용한다.
- [0241] 식물 TAL-전사 활성화인자 발현 구성체
- [0242] 변이 또는 고유 식물 전사활성화 상호작용 모티프를 포함하는 식물 TAL-전사 활성화인자 구성체를 구성한다. 징크 핑거 결합 단백질 폴리뉴클레오티드 서열 대신 TAL 결합 단백질 폴리뉴클레오티드 서열을 삽입함으로써, 실시예 4에서 기술된 식물 ZFP-전사 활성화인자 발현 구성체를 변형시킨다. DNA 결합에 요구되는 17.5 TAL 반복체를 새로 합성하여, *제아 메이스* 오패크-2 핵 국소화 서열 (문헌 [Van Eenennaam *et al.* (2004) *Metabolic Engineering* 6:101-8])에 융합시킨다. UPA-box 공통 서열에 대하여 예상되는 바와 같이, 각 도메인의 서열은 DNA 결합에 영향을 주는 가변 잔기들 (12 및 13 위치)에 상이한 아미노산을 이용한다 (문헌 [Boch *et al.* (2009) *Science* 326(5959):1509-12]). 징크 핑거 결합 단백질 폴리뉴클레오티드 서열 대신, *NcoI/BamHI* 단편으로서 헤미코트 식물-최적화 TAL DNA 결합 도메인 폴리뉴클레오티드 서열을 삽입한다. 이와 같은 단계가 완료되면, TAL-전사 활성화인자 구성체는 상시성 카사바 베인 모자이크 바이러스 프로모터의 조절하에 위치되며, *에이. 투메파시엔스* 유래의 ORF23 3'UTR로 종료된다. 최종 형질전환 벡터는 식물 선택용의 *아라비도시스* 유비퀴틴3-Hpt II 카세트를 포함하는 전달 벡터를 사용한 게이트웨이<sup>®</sup> 형질전환으로부터 완료된다. 서열분석을 통하여 최종 형질전환 벡터를 확인한 후, *에이. 투메파시엔스* 균주인 LBA4404 (인비트로젠 사)로 형질전환시킨다.
- [0243] 식물 TAL-전사 활성화인자 구성체를 포함하는 식물 사례를 생성시키는 데에는, 실시예 4에 기술되어 있는 일시적 형질전환 프로토콜을 사용한다. 16종의 TAL-전사 활성화인자 구성체들 각각에 대하여 총 20-30종의 식물 사례를 생성시킨다.
- [0244] *gus* 발현 분석

[0245]

2종의 DNA 가수분해 프로브 검정을 사용하여, 하이그로마이신 상에서 선택된 사례들을 *gus* 유전자 전사체 농도에 대하여 분석한다. 서열 특이적 프라이머 및 프로브를 사용하여, 각 개별 사례에 있어서의 *gus* mRNA의 정상 상태 농도를 추정한다. 내인성 담배 참조 유전자, 예컨대 *BYEEF*에 대하여, 정상 상태 mRNA 농도를 사용하여 mRNA를 표준화한다. 양 유전자에 대한 검정은 실시예 4에 기술되어 있는 프로토콜을 사용하여 설계한다. 실시간 PCR 데이터의 분석은 상대적 정량분석 모듈을 사용하는 라이트사이클러<sup>®</sup> 소프트웨어를 사용하여 수행되는데, ΔΔCt법을 바탕으로 한다. 여러 활성화인자 구성체에 있어서의 상대적 발현 수준을 비교한다.

**도면**

**도면1**

```

                473                480
VP16 TAD: D D F E F E Q M F T D
                *   * *   * *   *
    
```

**도면2**

```

                                * * * * *
VP16 (서열 1)  GMTHD-PVSYG-A-LDV--D-D-EEF-EQMF-TDALGIDD
ERF2 (서열 2)  NDS-ED-MLVY-GL-L-K-DAFHFDTS-SS---D-LSCLF
PTI4 (서열 3)  CLT-ET-WGDL--P-L-KVDDSE-DMVIYGLKDALSVGW
AtERF1 (서열 4) CFT-ES-WGDL--P-L-K-EN-DSE-D--ML-V-YGILN
ORCA2 (서열 5) -FN-ENC-EEII SPNYAS-EDLS-D--I--ILTDFIKDQD
DREB1A (서열 6) GFDMEETLVEAIYTAEQS-ENAFYMHDEAMFEMPSLLANM
CBF1 (서열 7)  ----EQS--EGAFYM----D-E----ETMFGMETLLDNM
DOF1 (서열 8)  --SAG-K-A-V---LDD--ED-SEVWPAASF--DMGACWA

FGG-----
DFPA-----
SPFSFTAG
DAFHGG--
NYEDE---
AEGM----
AEG-----
GAGFAD--
    
```

도면3

ERF2	
VP16 모터프 (서열 9)	DD FE FE Q M F T D
코유 ERF2 (서열 10)	DA FH FD T S S S D
vERF2_1 (서열 17)	DD FX1 FD X2 X3 F X4 D
vERF2_2 (서열 18)	DX5 FX6 FX7 X8 X9 F X10 D
vERF2_3 (서열 19)	DX11 FX12 FX13 X14 X15 X16 X17 D
vERF2_4 (서열 20)	DX18 FX19 FX20 X21 X22 X23 X24 D
vERF2_5 (서열 21)	DX25 FX26 FX27 X28 X29 X30 X31 D
vERF2_6 (서열 22)	DD FH FE T M F S D
vERF2_7 (서열 121)	DX32 FH FX33 T X34 X35 S D

여기에서:

- X<sub>1</sub> = E 또는 H
- X<sub>2</sub> = Q 또는 T
- X<sub>3</sub> = M 또는 S
- X<sub>4</sub> = T 또는 S
- X<sub>5</sub> = D 또는 A
- X<sub>6</sub> = E 또는 H
- X<sub>7</sub> = D 또는 E
- X<sub>8</sub> = Q 또는 T
- X<sub>9</sub> = M 또는 S
- X<sub>10</sub> = T 또는 S
- X<sub>11</sub> = D, 또는 E
- X<sub>12</sub> = D, E, 또는 H
- X<sub>13</sub> = D 또는 E
- X<sub>14</sub> = Q 또는 T
- X<sub>15</sub> = A, V, I, L, 또는 M
- X<sub>16</sub> = F, W, 또는 Y
- X<sub>17</sub> = S, T, N, Q, C, G, 또는 P

- X<sub>18</sub> = D 또는 E
- X<sub>19</sub> = H, R, K, D, 또는 E
- X<sub>20</sub> = D 또는 E
- X<sub>21</sub> = S, T, N, Q, C, G, Y, 또는 P
- X<sub>22</sub> = A, V, I, L, M, F, Y, 또는 W
- X<sub>23</sub> = A, V, I, L, M, F, Y, 또는 W
- X<sub>24</sub> = S, T, N, Q, C, G, P, 또는 Y

- X<sub>25</sub> = A, D, 또는 E
- X<sub>26</sub> = 임의
- X<sub>27</sub> = D 또는 E
- X<sub>28</sub> = 임의
- X<sub>29</sub> = A, V, I, L, M, F, Y, W, 또는 S
- X<sub>30</sub> = A, V, I, L, M, F, Y, W, 또는 S
- X<sub>31</sub> = 임의

- X<sub>32</sub> = D 또는 E
- X<sub>33</sub> = D 또는 E
- X<sub>34</sub> = A, V, I, L, 또는 M
- X<sub>35</sub> = F, W, 또는 Y

도면4

PTI4	
VP16 모터프 (서열 9)	DDF EF E Q M - F - T - - D
코유 PTI4 (서열 11)	DDS E- D M V I Y G L L K D
vPTI4_1 (서열 23)	DDX1 E- X2 X3 X4 I X5 G X6 L K D
vPTI4_2 (서열 24)	DDX7 E- X8 X9 X10 X11 X12 X13 X14 X15 X16 D
vPTI4_3 (서열 25)	DDX17 EF X18 X19 X20 - X21 - X22 - - D
vPTI4_4 (서열 26)	DDX23 E X24 X25 X26 X27 - X28 - X29 - - D
vPTI4_5 (서열 27)	DDX30 E X31 X32 X33 X34 - X35 - X36 - - D
vPTI4_6 (서열 28)	DDF EF E M M - E - T - - D
vPTI4_7 (서열 122)	DDX37 E X38 X39 M X40 - X41 - X42 - - D

여기에서:

- X<sub>1</sub> = F 또는 S
- X<sub>2</sub> = D 또는 E
- X<sub>3</sub> = Q 또는 M
- X<sub>4</sub> = M 또는 V
- X<sub>5</sub> = F 또는 Y
- X<sub>6</sub> = T 또는 L
- X<sub>7</sub> = 임의
- X<sub>8</sub> = D 또는 E
- X<sub>9</sub> = 임의
- X<sub>10</sub> = A, V, I, L, 또는 M
- X<sub>11</sub> = 임의
- X<sub>12</sub> = F, W, 또는 Y
- X<sub>13</sub> = 임의
- X<sub>14</sub> = 임의
- X<sub>15</sub> = 임의
- X<sub>16</sub> = 임의
- X<sub>17</sub> = F 또는 S
- X<sub>18</sub> = D 또는 E
- X<sub>19</sub> = Q 또는 M
- X<sub>20</sub> = M 또는 V
- X<sub>21</sub> = F 또는 Y
- X<sub>22</sub> = T 또는 L
- X<sub>23</sub> = 임의
- X<sub>24</sub> = F, W, 또는 Y
- X<sub>25</sub> = D 또는 E
- X<sub>26</sub> = 임의
- X<sub>27</sub> = A, V, I, L, 또는 M
- X<sub>28</sub> = F, W, 또는 Y
- X<sub>29</sub> = 임의
- X<sub>30</sub> = 임의
- X<sub>31</sub> = F, W, Y, A, V, I, L, 또는 M
- X<sub>32</sub> = D 또는 E
- X<sub>33</sub> = 임의
- X<sub>34</sub> = A, V, I, L, M, F, W, 또는 Y
- X<sub>35</sub> = F, W, Y, A, V, I, L, 또는 M
- X<sub>36</sub> = 임의
- X<sub>37</sub> = F 또는 S
- X<sub>38</sub> = F, W, 또는 Y
- X<sub>39</sub> = E 또는 D
- X<sub>40</sub> = A, V, I, L, 또는 M
- X<sub>41</sub> = F, W, 또는 Y
- X<sub>42</sub> = T 또는 L

도면5

AtERF1	
VP16 모터프 (서열 9)	D - D F E F E Q M F T D
고유 AtERF1 (서열 12)	E N D S E - D - M L V -
vAtERF1_1 (서열 29)	X <sub>1</sub> N D X <sub>2</sub> E - X <sub>3</sub> - M X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> -
vAtERF1_2 (서열 30)	X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> D X <sub>8</sub> E - X <sub>9</sub> - M X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> -
vAtERF1_3 (서열 31)	X <sub>12</sub> - D X <sub>13</sub> E F X <sub>14</sub> Q M X <sub>15</sub> X <sub>16</sub> D
vAtERF1_4 (서열 32)	X <sub>17</sub> - D X <sub>18</sub> E X <sub>19</sub> X <sub>20</sub> X <sub>21</sub> M X <sub>22</sub> X <sub>23</sub> X <sub>24</sub>
vAtERF1_5 (서열 33)	X <sub>25</sub> - D X <sub>26</sub> E X <sub>27</sub> X <sub>28</sub> X <sub>29</sub> M X <sub>30</sub> X <sub>31</sub> X <sub>32</sub>
vAtERF1_6 (서열 34)	E N D F E F E - M F T D
vAtERF1_7 (서열 123)	E N D X <sub>33</sub> E X <sub>34</sub> X <sub>35</sub> - M X <sub>36</sub> X <sub>37</sub> X <sub>38</sub>

여기에서:

X <sub>1</sub> = D 또는 E	X <sub>6</sub> = 임의
X <sub>2</sub> = F 또는 S	X <sub>7</sub> = 임의
X <sub>3</sub> = D 또는 E	X <sub>8</sub> = 임의
X <sub>4</sub> = F 또는 L	X <sub>9</sub> = D 또는 E
X <sub>5</sub> = T 또는 V	X <sub>10</sub> = F, L, A, V, I, M, Y, 또는 W
	X <sub>11</sub> = 임의

X <sub>12</sub> = D 또는 E	X <sub>17</sub> = D 또는 E
X <sub>13</sub> = F 또는 S	X <sub>18</sub> = 임의
X <sub>14</sub> = D 또는 E	X <sub>19</sub> = F, W, 또는 Y
X <sub>15</sub> = F 또는 L	X <sub>20</sub> = D 또는 E
X <sub>16</sub> = T 또는 V	X <sub>21</sub> = S, T, N, Q, C, G, P, 또는 Y
	X <sub>22</sub> = F, L, A, V, I, M, Y, 또는 W
	X <sub>23</sub> = 임의
	X <sub>24</sub> = D 또는 E

X<sub>25</sub> = 임의  
 X<sub>26</sub> = 임의  
 X<sub>27</sub> = F, L, A, V, I, M, Y, 또는 W  
 X<sub>28</sub> = D, E, H, R, 또는 K  
 X<sub>29</sub> = S, T, N, Q, C, G, P, 또는 Y  
 X<sub>30</sub> = F, L, A, V, I, M, Y, 또는 W  
 X<sub>31</sub> = 임의  
 X<sub>32</sub> = D 또는 E

X<sub>33</sub> = F 또는 S  
 X<sub>34</sub> = F, W, 또는 Y  
 X<sub>35</sub> = E 또는 D  
 X<sub>36</sub> = F, W, Y, 또는 L  
 X<sub>37</sub> = T 또는 V  
 X<sub>38</sub> = D 또는 E

도면6

ORCA2	
VP16 모티프 (서열 9)	D D F E F E Q M F T D
교유 ORCA2 (서열 13)	E D L S D I - I L T D
VORCA2_1 (서열 35)	X <sub>1</sub> D X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> - X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> T D
VORCA2_2 (서열 36)	X <sub>8</sub> D X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> - X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> T D
VORCA2_3 (서열 37)	X <sub>15</sub> D X <sub>16</sub> X <sub>17</sub> X <sub>18</sub> X <sub>19</sub> Q X <sub>20</sub> X <sub>21</sub> T D
VORCA2_4 (서열 38)	X <sub>22</sub> D X <sub>23</sub> X <sub>24</sub> X <sub>25</sub> X <sub>26</sub> X <sub>27</sub> X <sub>28</sub> X <sub>29</sub> T D
VORCA2_5 (서열 39)	X <sub>30</sub> D X <sub>31</sub> X <sub>32</sub> X <sub>33</sub> X <sub>34</sub> X <sub>35</sub> X <sub>36</sub> X <sub>37</sub> T D
VORCA2_6 (서열 40)	E D F - D I E M L T D
VORCA2_7 (서열 124)	E D X <sub>38</sub> - X <sub>39</sub> X <sub>40</sub> X <sub>41</sub> X <sub>42</sub> X <sub>43</sub> T D

여기에서:

- |   |   |
|---|---|
| X <sub>1</sub> = D 또는 E                     | X <sub>8</sub> = 임의                                     |
| X <sub>2</sub> = F 또는 L                     | X <sub>9</sub> = 임의                                     |
| X <sub>3</sub> = E 또는 S                     | X <sub>10</sub> = 임의                                    |
| X <sub>4</sub> = F 또는 D                     | X <sub>11</sub> = F, L, A, V, I, M, Y, 또는 W             |
| X <sub>5</sub> = E 또는 I                     | X <sub>12</sub> = D 또는 E                                |
| X <sub>6</sub> = M 또는 I                     | X <sub>13</sub> = F, L, A, V, I, M, Y, 또는 W             |
| X <sub>7</sub> = F 또는 L                     | X <sub>14</sub> = F, L, A, V, I, M, Y, 또는 W             |
| <br>  |   |
| X <sub>15</sub> = D 또는 E                    | X <sub>22</sub> = H, R, K, D, 또는 E                      |
| X <sub>16</sub> = F 또는 L                    | X <sub>23</sub> = F, L, A, V, I, M, Y, 또는 W             |
| X <sub>17</sub> = E 또는 S                    | X <sub>24</sub> = S, T, N, Q, C, G, P, R, H, K, D, 또는 E |
| X <sub>18</sub> = F 또는 D                    | X <sub>25</sub> = F, W, 또는 Y                            |
| X <sub>19</sub> = E 또는 I                    | X <sub>26</sub> = D 또는 E                                |
| X <sub>20</sub> = M 또는 I                    | X <sub>27</sub> = S, T, N, Q, C, G, P, R, H, K, D, 또는 E |
| X <sub>21</sub> = F 또는 L                    | X <sub>28</sub> = L, A, V, I, 또는 M                      |
|   | X <sub>29</sub> = F, Y, 또는 W                            |
| <br>  |   |
| X <sub>30</sub> = 임의                        |   |
| X <sub>31</sub> = 임의                        |   |
| X <sub>32</sub> = 임의                        |   |
| X <sub>33</sub> = F, L, A, V, I, M, Y, 또는 W |   |
| X <sub>34</sub> = D 또는 E                    |   |
| X <sub>35</sub> = 임의                        |   |
| X <sub>36</sub> = F, L, A, V, I, M, Y, 또는 W |   |
| X <sub>37</sub> = F, L, A, V, I, M, Y, 또는 W |   |
| <br>  |   |
| X <sub>38</sub> = F 또는 L                    |   |
| X <sub>39</sub> = F, Y, W, 또는 D             |   |
| X <sub>40</sub> = D, E, I, 또는 L             |   |
| X <sub>41</sub> = Q 또는 E                    |   |
| X <sub>42</sub> = A, V, I, L, 또는 M          |   |
| X <sub>43</sub> = F, Y, W, 또는 L             |   |

도면7

DREB1A	
VP16 모터프 (서열 9)	D D - FE F - - - EQ MF- T D
교유 DREB1A (서열 14)	E N A F- Y M H D EA MFE M P
vDREB1A_1 (서열 41)	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A F- X <sub>3</sub> M H D EX <sub>4</sub> MF X <sub>5</sub> X <sub>6</sub>
vDREB1A_2 (서열 42)	X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> F- X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> EX <sub>14</sub> MF X <sub>15</sub> X <sub>16</sub> X <sub>17</sub>
vDREB1A_3 (서열 43)	X <sub>18</sub> X <sub>19</sub> - FE X <sub>20</sub> - - - EX <sub>21</sub> MF- X <sub>22</sub> X <sub>23</sub>
vDREB1A_4 (서열 44)	X <sub>24</sub> X <sub>25</sub> - FX <sub>26</sub> X <sub>27</sub> - - - EX <sub>28</sub> MF- X <sub>29</sub> X <sub>30</sub>
vDREB1A_5 (서열 45)	X <sub>31</sub> X <sub>32</sub> - FX <sub>33</sub> X <sub>34</sub> - - - EX <sub>35</sub> MF- X <sub>36</sub> X <sub>37</sub>
vDREB1A_6 (서열 46)	E D - FE F - - - EA MF- M D
vDREB1A_7 (서열 125)	E X <sub>38</sub> - FE X <sub>39</sub> - - - EA MF- M X <sub>40</sub>

여기에서:

- |  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| X <sub>1</sub> = D 또는 E  | X <sub>7</sub> = 임의                   |
| X <sub>2</sub> = D 또는 E  | X <sub>8</sub> = N, H, R, K, D, 또는 E  |
| X <sub>3</sub> = F 또는 Y  | X <sub>9</sub> = 임의                   |
| X <sub>4</sub> = Q 또는 A  | X <sub>10</sub> = F, Y, 또는 W          |
| X <sub>5</sub> = T 또는 M  | X <sub>11</sub> = 임의                  |
| X <sub>6</sub> = D 또는 E  | X <sub>12</sub> = 임의                  |
|  | X <sub>13</sub> = 임의                  |
| X <sub>18</sub> = D 또는 E   | X <sub>14</sub> = 임의                  |
| X <sub>19</sub> = D 또는 E   | X <sub>15</sub> = 임의                  |
| X <sub>20</sub> = F 또는 Y   | X <sub>16</sub> = 임의                  |
| X <sub>21</sub> = Q 또는 A   | X <sub>17</sub> = P, H, R, K, D, 또는 E |
| X <sub>22</sub> = T 또는 M   |                                       |
| X <sub>23</sub> = D 또는 E   |                                       |
| X <sub>24</sub> = H, R, K, D, 또는 E                               |                                       |
| X <sub>25</sub> = D 또는 E   |                                       |
| X <sub>26</sub> = D 또는 E   |                                       |
| X <sub>27</sub> = F 또는 Y   |                                       |
| X <sub>28</sub> = S, T, N, Q, C, G, P, A, V, L, I, F, Y, W, 또는 M |                                       |
| X <sub>29</sub> = S, T, N, Q, C, G, P, A, V, L, I, F, Y, W, 또는 M |                                       |
| X <sub>30</sub> = D 또는 E   |                                       |
| X <sub>31</sub> = 임의   | X <sub>38</sub> = D, E, 또는 N          |
| X <sub>32</sub> = D, E, 또는 N                                     | X <sub>39</sub> = F, Y, 또는 W          |
| X <sub>33</sub> = 임의   | X <sub>40</sub> = D, E, 또는 P          |
| X <sub>34</sub> = F, Y, 또는 W                                     |                                       |
| X <sub>35</sub> = 임의   |                                       |
| X <sub>36</sub> = 임의   |                                       |
| X <sub>37</sub> = D, E, 또는 P                                     |                                       |

도면8

CBF1	
VP16 모터프 (서열 9)	D D F EF EQ MF- T D
교유 CBF1 (서열 15)	D - - E- ET MFG M P
vCBF1_1 (서열 47)	D - - E- EX <sub>1</sub> MFG X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>
vCBF1_2 (서열 48)	D - - E- EX <sub>4</sub> MFX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub>
vCBF1_3 (서열 49)	DD F EF EX <sub>8</sub> MF- X <sub>9</sub> X <sub>10</sub>
vCBF1_4 (서열 50)	DX <sub>11</sub> X <sub>12</sub> EX <sub>13</sub> EX <sub>14</sub> MF- X <sub>15</sub> X <sub>16</sub>
vCBF1_5 (서열 51)	DX <sub>17</sub> X <sub>18</sub> EX <sub>19</sub> EX <sub>20</sub> MF- X <sub>21</sub> X <sub>22</sub>
vCBF1_6 (서열 52)	DD F EF ET MF- M D
vCBF1_7 (서열 126)	DX <sub>23</sub> F EX <sub>24</sub> ET MF- M X <sub>25</sub>

여기에서:

- |  |                             |                          |
|--|-----------------------------|--------------------------|
| X <sub>1</sub> = Q 또는 T  | X <sub>4</sub> = 임의         | X <sub>8</sub> = Q 또는 T  |
| X <sub>2</sub> = T 또는 M  | X <sub>5</sub> = 임의         | X <sub>9</sub> = T 또는 M  |
| X <sub>3</sub> = D 또는 E  | X <sub>6</sub> = 임의         | X <sub>10</sub> = D 또는 E |
|  | X <sub>7</sub> = D, E, 또는 P |                          |
| X <sub>11</sub> = D 또는 E   |                             |                          |
| X <sub>12</sub> = F, W, 또는 Y                                     |                             |                          |
| X <sub>13</sub> = F, W, 또는 Y                                     |                             |                          |
| X <sub>14</sub> = G, S, T, C, N, Q, 또는 Y                         |                             |                          |
| X <sub>15</sub> = G, S, T, C, N, Q, Y, A, V, L, I, F, W, P, 또는 M |                             |                          |
| X <sub>16</sub> = D 또는 E   |                             |                          |
| X <sub>17</sub> = D 또는 E   |                             |                          |
| X <sub>18</sub> = 임의   |                             |                          |
| X <sub>19</sub> = F, W, 또는 Y                                     |                             |                          |
| X <sub>20</sub> = 임의   |                             |                          |
| X <sub>21</sub> = 임의   |                             |                          |
| X <sub>22</sub> = D, E, 또는 P                                     |                             |                          |
| X <sub>23</sub> = D 또는 E   |                             |                          |
| X <sub>24</sub> = F, W, 또는 Y                                     |                             |                          |
| X <sub>25</sub> = D, E, 또는 P                                     |                             |                          |

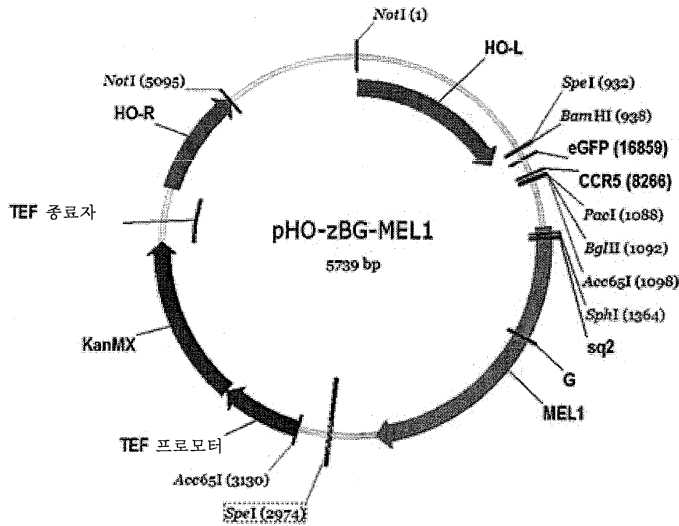
도면9

DOF1	D	D	-	FE	F	E	Q	M	-	FT	D
VP16 모티프 (서열 9)	E	D	S	FV	W	P	A	A	S	E	-
고유 DOF1 (서열 16)	X <sub>1</sub>	D	S	FX <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	S	E	-
vDOF1_1 (서열 53)	X <sub>7</sub>	D	X <sub>8</sub>	FX <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	X <sub>13</sub>	X <sub>14</sub>	E	-
vDOF1_2 (서열 54)	X <sub>15</sub>	D	-	FX <sub>16</sub>	X <sub>17</sub>	X <sub>18</sub>	X <sub>19</sub>	X <sub>20</sub>	-	FT	D
vDOF1_3 (서열 55)	X <sub>21</sub>	D	-	FX <sub>22</sub>	X <sub>23</sub>	X <sub>24</sub>	X <sub>25</sub>	X <sub>26</sub>	-	FX <sub>27</sub>	D
vDOF1_4 (서열 56)	X <sub>28</sub>	D	-	FX <sub>29</sub>	X <sub>30</sub>	X <sub>31</sub>	X <sub>32</sub>	X <sub>33</sub>	-	FX <sub>34</sub>	D
vDOF1_5 (서열 57)	E	D	-	FE	F	E	A	M	-	FT	D
vDOF1_6 (서열 58)	E	D	-	FX <sub>35</sub>	X <sub>36</sub>	X <sub>37</sub>	A	X <sub>38</sub>	-	FT	D
vDOF1_7 (서열 127)											

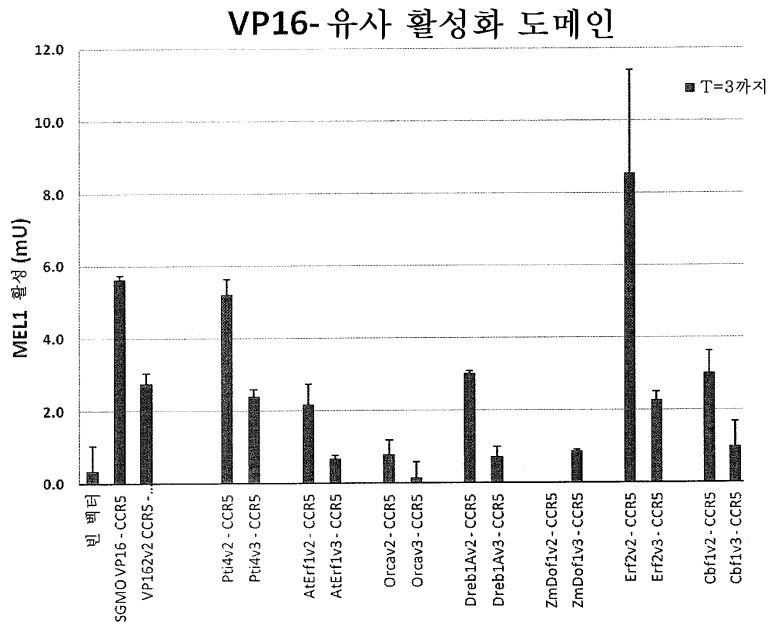
여기에서:

- |   |   |
|---|---|
| X <sub>1</sub> = D 또는 E                     | X <sub>7</sub> = 임의                         |
| X <sub>2</sub> = E 또는 V                     | X <sub>8</sub> = 임의                         |
| X <sub>3</sub> = F 또는 W                     | X <sub>9</sub> = 임의                         |
| X <sub>4</sub> = D 또는 E                     | X <sub>10</sub> = F, W, 또는 Y                |
| X <sub>5</sub> = Q 또는 A                     | X <sub>11</sub> = D, E, 또는 P                |
| X <sub>6</sub> = M 또는 A                     | X <sub>12</sub> = 임의                        |
|   | X <sub>13</sub> = A, V, I, L, M, F, Y, 또는 W |
| X <sub>15</sub> = D 또는 E                    | X <sub>14</sub> = 임의                        |
| X <sub>16</sub> = E 또는 V                    |   |
| X <sub>17</sub> = F 또는 W                    | X <sub>21</sub> = H, R, K, D, 또는 E          |
| X <sub>18</sub> = D 또는 E                    | X <sub>22</sub> = 임의                        |
| X <sub>19</sub> = Q 또는 A                    | X <sub>23</sub> = F, W, 또는 Y                |
| X <sub>20</sub> = M 또는 A                    | X <sub>24</sub> = D 또는 E                    |
|   | X <sub>25</sub> = 임의                        |
| X <sub>28</sub> = 임의                        | X <sub>26</sub> = A, V, I, L, 또는 M          |
| X <sub>29</sub> = 임의                        | X <sub>27</sub> = S, T, N, Q, C, G, P, 또는 Y |
| X <sub>30</sub> = F, W, 또는 Y                |   |
| X <sub>31</sub> = D, E, 또는 P                |   |
| X <sub>32</sub> = 임의                        |   |
| X <sub>33</sub> = A, V, I, L, M, F, Y, 또는 W |   |
| X <sub>34</sub> = 임의                        |   |
| X <sub>35</sub> = E 또는 V                    |   |
| X <sub>36</sub> = F, W, 또는 Y                |   |
| X <sub>37</sub> = D, E, 또는 P                |   |
| X <sub>38</sub> = A, V, I, L, 또는 M          |   |

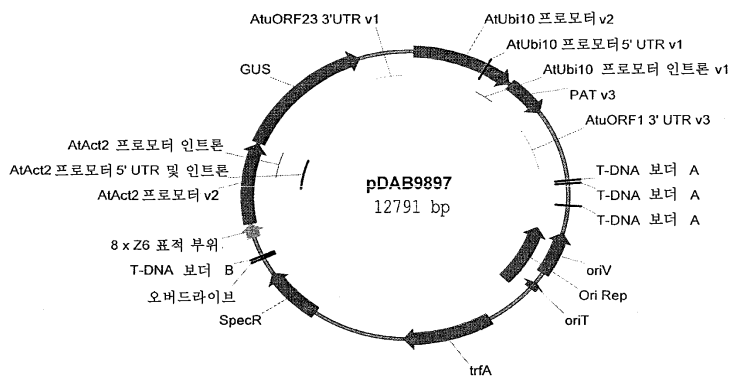
도면10



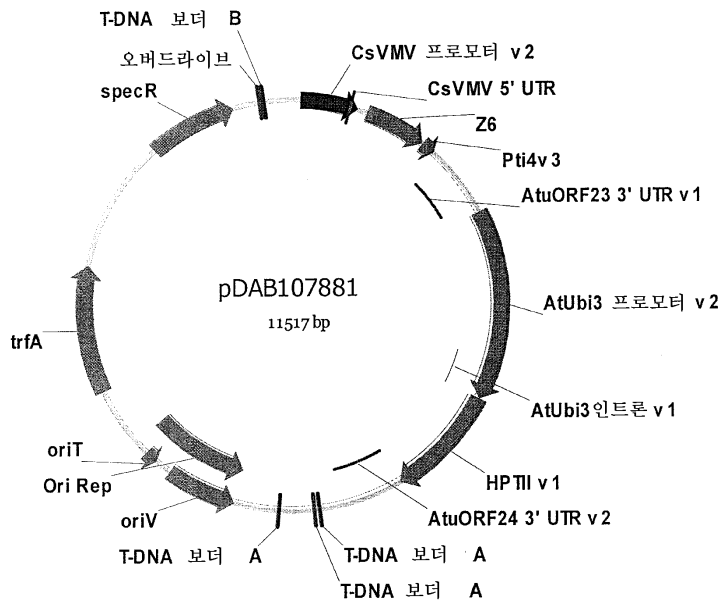
도면11



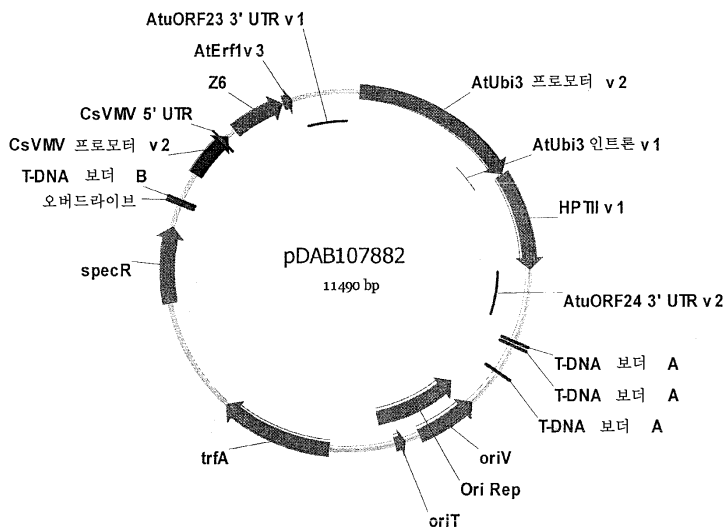
도면12



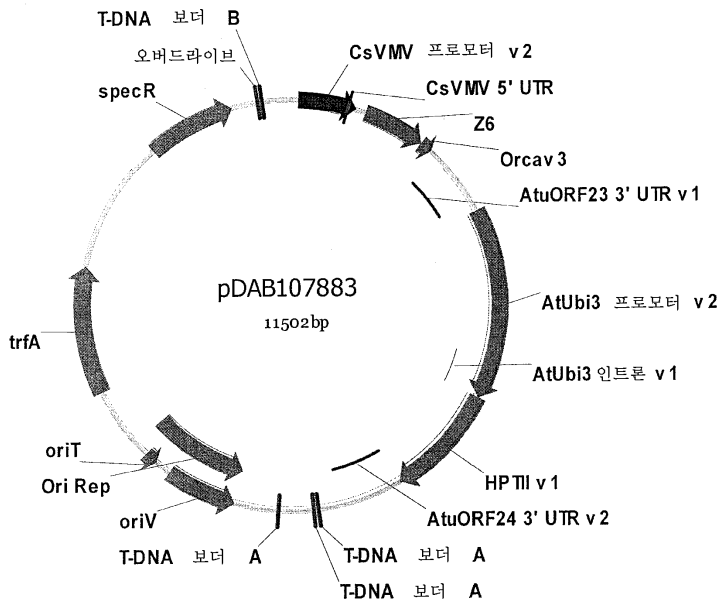
도면13



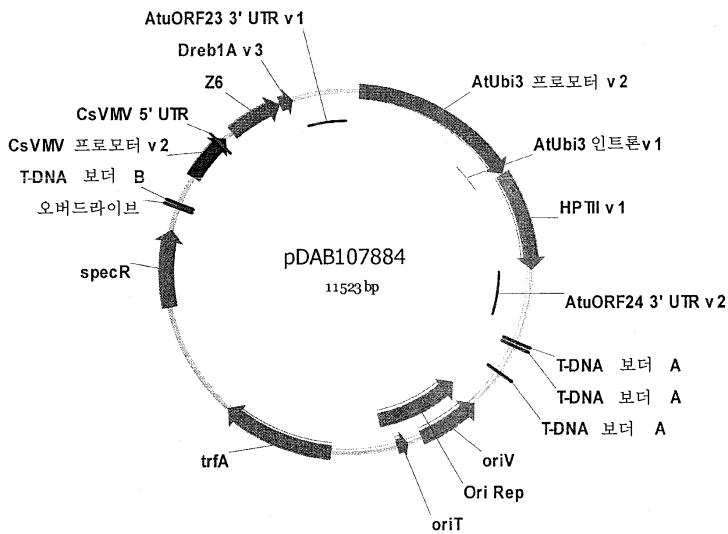
도면14



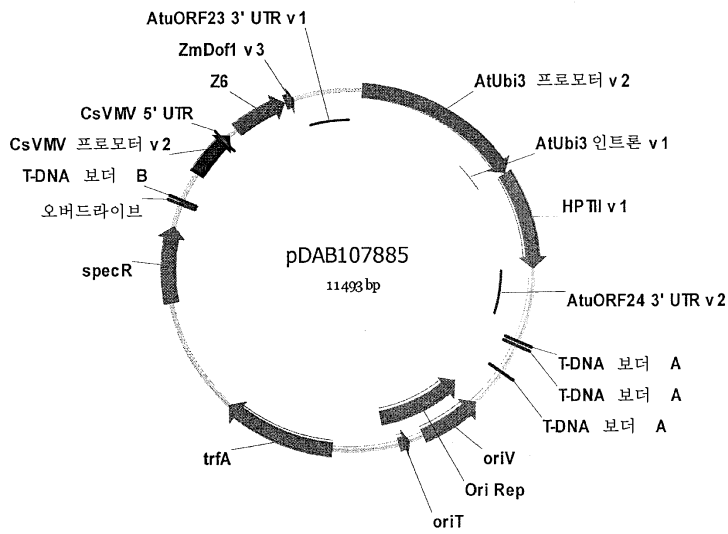
도면15



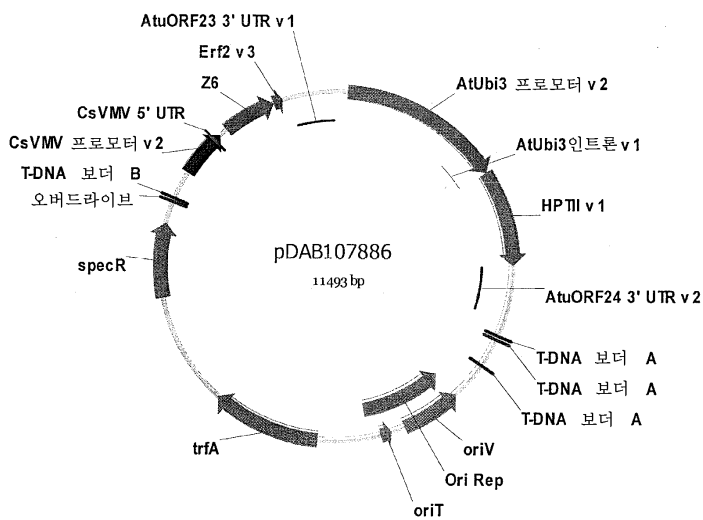
도면16



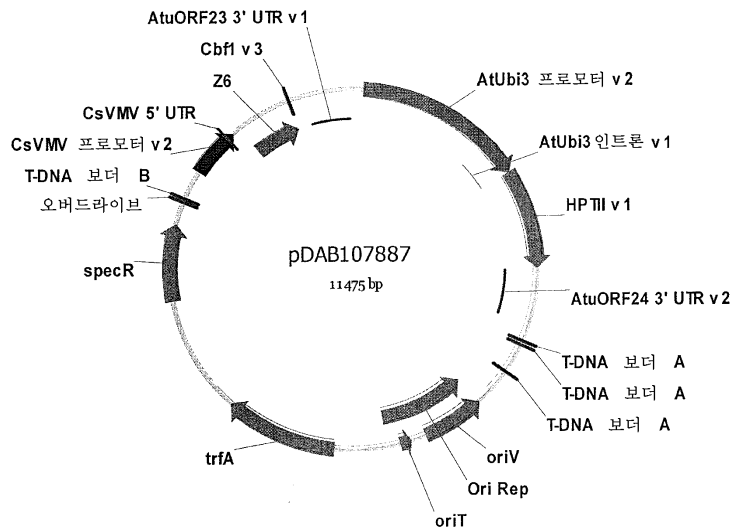
도면17



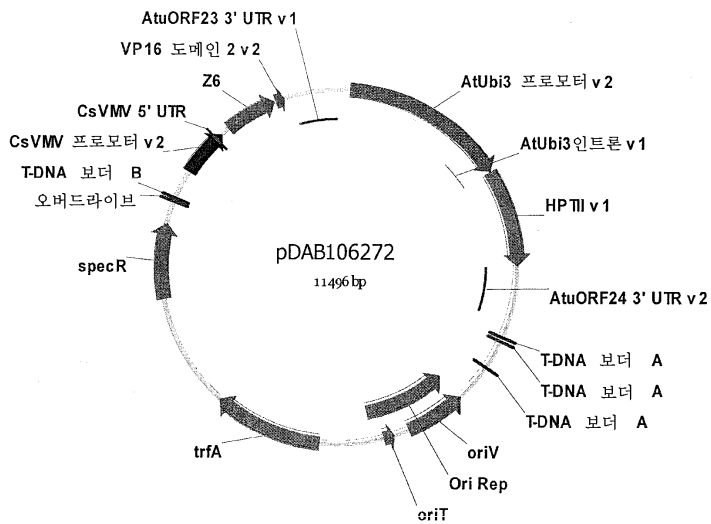
도면18



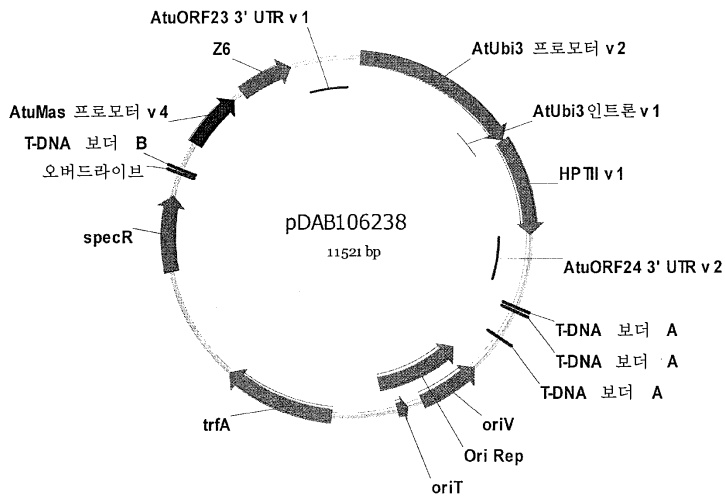
도면19



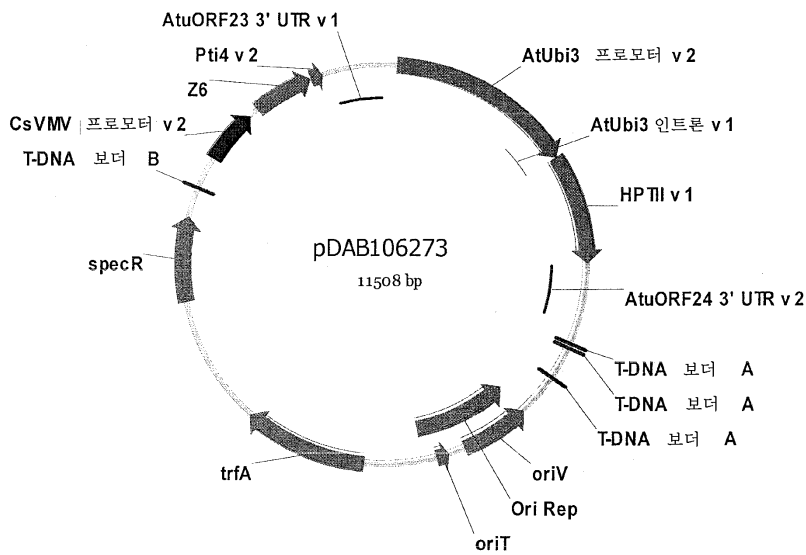
도면20



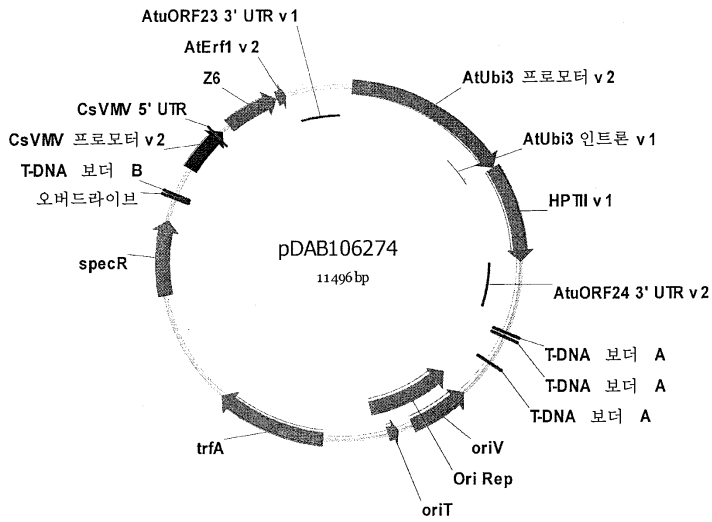
도면21



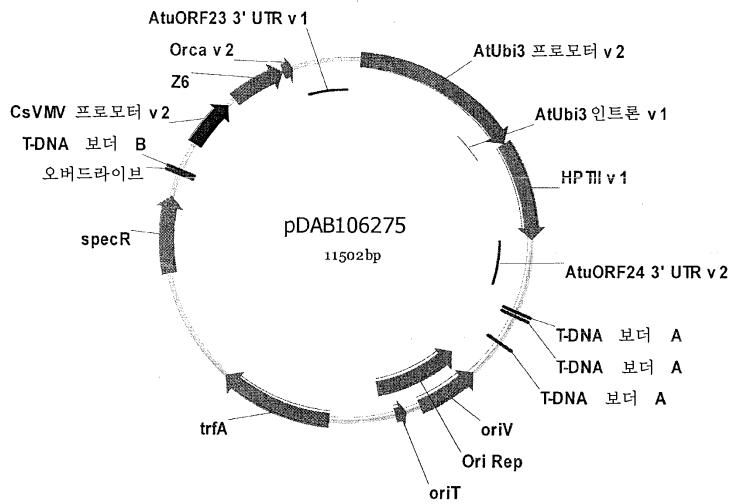
도면22



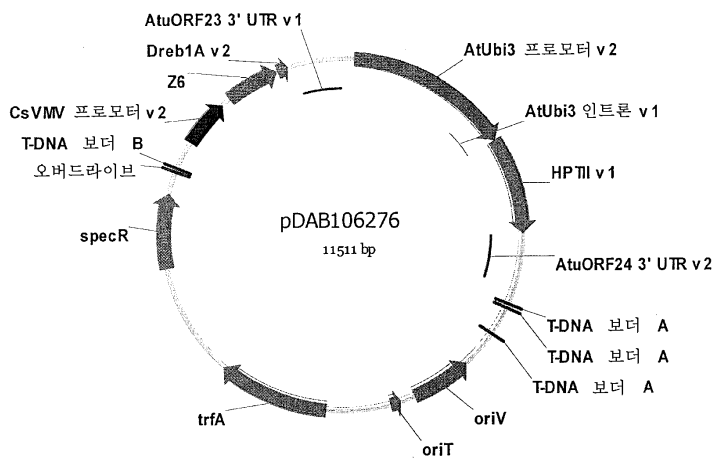
도면23



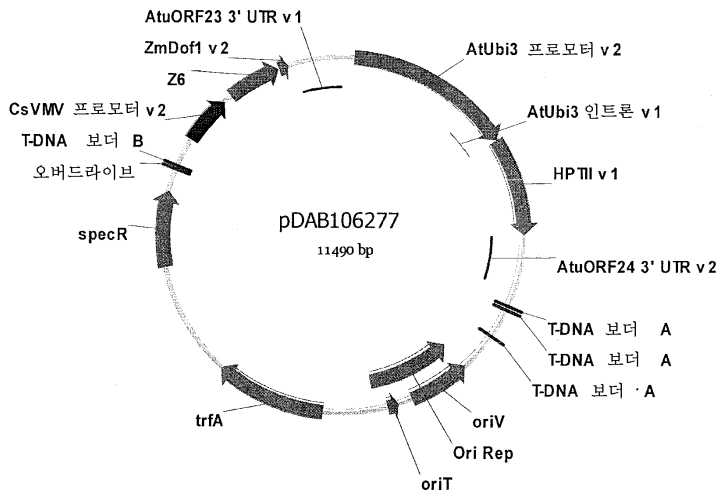
도면24



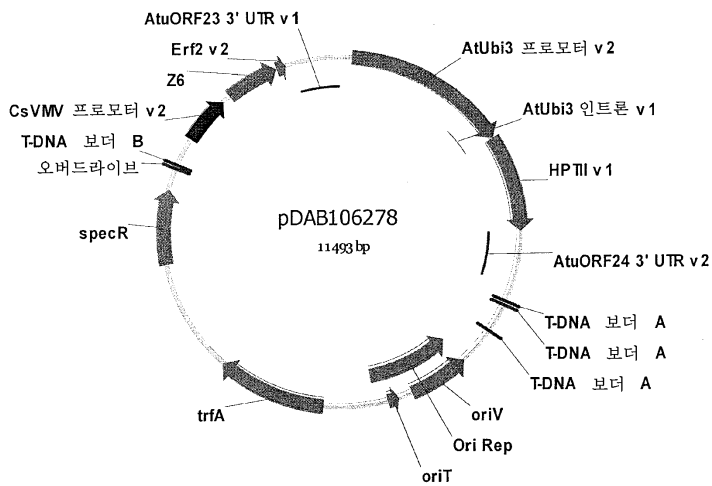
도면25



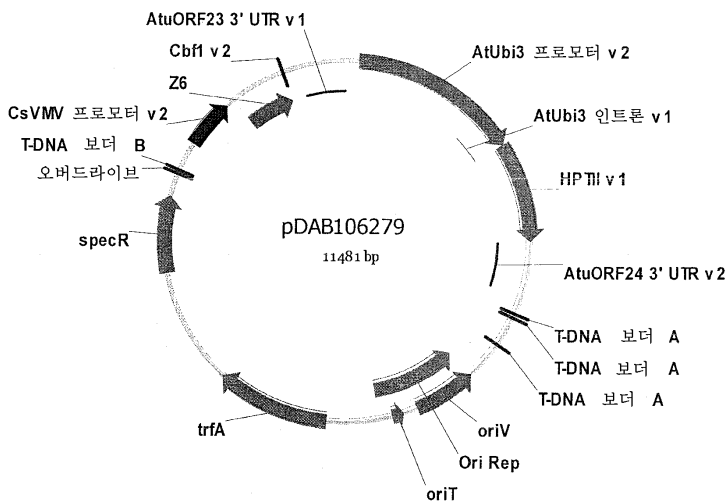
도면26



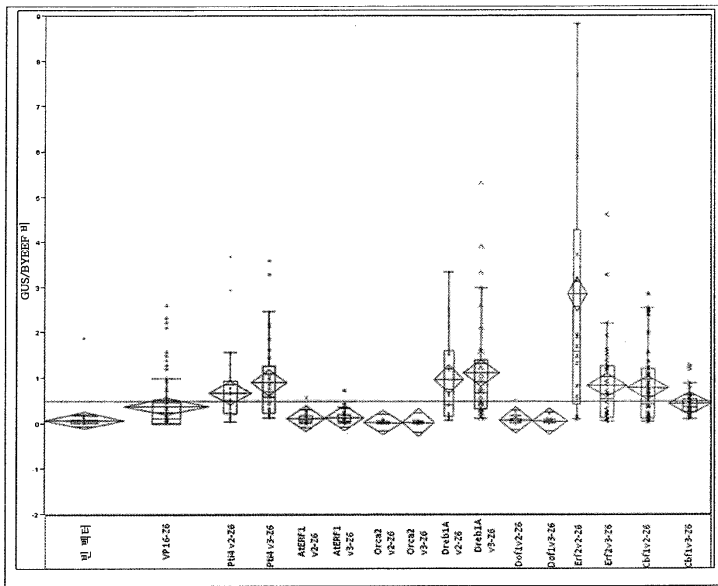
도면27



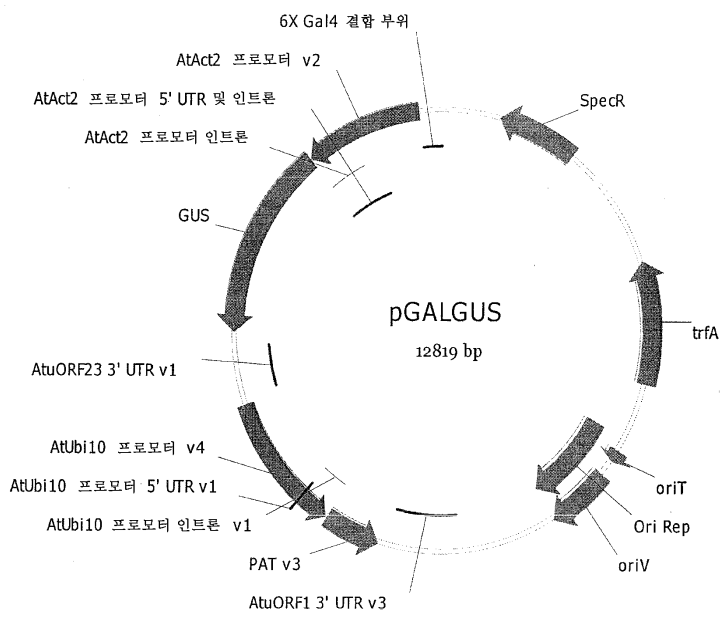
도면28



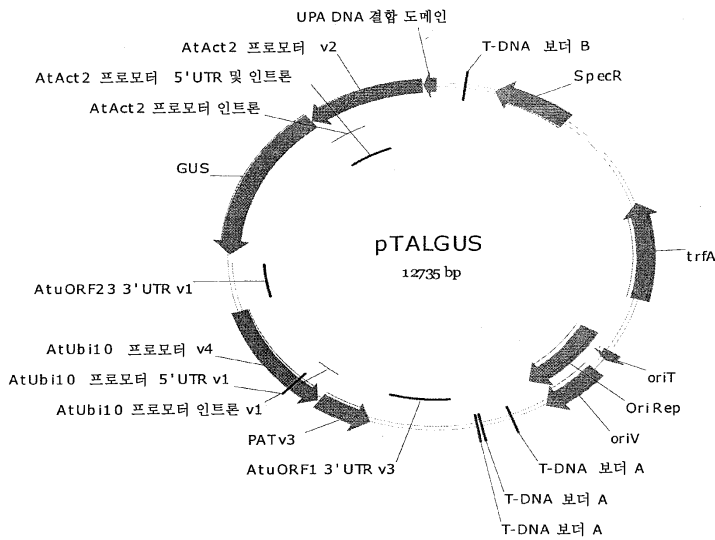
도면29



도면30



도면31



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Dow Agrosciences, LLC  
 Joseph Petolino  
 Jianquan Li  
 Steven L. Evans  
 Ryan C. Blue

<120> PLANT TRANSACTIVATION INTERACTION MOTIFS AND USES THEREOF

<130> 2971-P10810US (69643)

<160> 127

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 34

<212> PRT

<213> herpes simplex virus

<400> 1

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Asp Asp

1                    5                    10                    15

Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe

20                    25                    30

Gly Gly

<210> 2

<211> 33

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Asn Asp Ser Glu Asp Met Leu Val Tyr Gly Leu Leu Lys Asp Ala Phe

1                    5                    10                    15

His Phe Asp Thr Ser Ser Ser Asp Leu Ser Cys Leu Phe Asp Phe Pro

                  20                    25                    30

Ala

<210> 3

<211> 41

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 3

Cys Leu Thr Glu Thr Trp Gly Asp Leu Pro Leu Lys Val Asp Asp Ser

1                    5                    10                    15

Glu Asp Met Val Ile Tyr Gly Leu Leu Lys Asp Ala Leu Ser Val Gly

                  20                    25                    30

Trp Ser Pro Phe Ser Phe Thr Ala Gly

                  35                    40

<210> 4

<211> 32

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

Cys Phe Thr Glu Ser Trp Gly Asp Leu Pro Leu Lys Glu Asn Asp Ser

1                    5                    10                    15

Glu Asp Met Leu Val Tyr Gly Ile Leu Asn Asp Ala Phe His Gly Gly

                  20                    25                    30

<210> 5  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Catharanthus roseus  
 <400> 5  
 Phe Asn Glu Asn Cys Glu Glu Ile Ile Ser Pro Asn Tyr Ala Ser Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Leu Ser Asp Ile Ile Leu Thr Asp Ile Phe Lys Asp Gln Asp Asn  
                   20                    25                    30  
 Tyr Glu Asp Glu  
                   35

<  
 210> 6  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 <400> 6  
 Gly Phe Asp Met Glu Glu Thr Leu Val Glu Ala Ile Tyr Thr Ala Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Ser Glu Asn Ala Phe Tyr Met His Asp Glu Ala Met Phe Glu Met  
                   20                    25                    30  
 Pro Ser Leu Leu Ala Asn Met Ala Glu Gly Met  
                   35                    40

<210> 7  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 <400> 7  
 Glu Gln Ser Glu Gly Ala Phe Tyr Met Asp Glu Glu Thr Met Phe Gly  
  
 1                    5                    10                    15  
 Met Pro Thr Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu Gly  
                   20                    25

<210> 8  
 <211> 33

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 8

Ser Ala Gly Lys Ala Val Leu Asp Asp Glu Asp Ser Phe Val Trp Pro

1                    5                    10                    15

Ala Ala Ser Phe Asp Met Gly Ala Cys Trp Ala Gly Ala Gly Phe Ala

                  20                    25                    30

Asp

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> herpes simplex virus

<400> 9

Asp Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp

1                    5                    10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

Asp Ala Phe His Phe Asp Thr Ser Ser Ser Asp

1                    5                    10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 11

Asp Asp Ser Glu Asp Met Val Ile Tyr Gly Leu Leu Lys Asp

1                    5                    10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

Glu Asn Asp Ser Glu Asp Met Leu Val

1                    5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Catharanthus roseus

<400> 13

Glu Asp Leu Ser Asp Ile Ile Leu Thr Asp

1                    5                    10

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 14

Glu Asn Ala Phe Tyr Met His Asp Glu Ala Met Phe Glu Met Pro

1                    5                    10                    15

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 15

Asp Glu Glu Thr Met Phe Gly Met Pro

1                    5

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 16

Glu Asp Ser Phe Val Trp Pro Ala Ala Ser Phe Asp

1                    5                    10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vERF2\_1  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is Glu or His  
 <220><221>  
 > MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Gln or Thr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Met or Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Thr or Ser  
 <400> 17  
 Asp Asp Phe Xaa Phe Asp Xaa Xaa Phe Xaa Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 18  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vERF2\_2  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Asp or Ala  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is Glu or His  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Gln or Thr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Met or Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Thr or Ser  
 <400> 18  
 Asp Xaa Phe Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 19  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vERF2\_3  
  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is Asp, Glu, or His  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Gln or Thr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, or Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, or Pro

<400> 19  
 Asp Xaa Phe Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp  
 1                    5                    10

<210> 20  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vERF2\_4  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Asp, or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is His, Arg, Lys, Asp, or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Tyr, or Pro

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Tyr, or Pro

<400> 20

Asp Xaa Phe Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp

1                    5                    10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vERF2\_5

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Ala, Asp, or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Asp or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, or Ser

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, or Ser

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 21

Asp Xaa Phe Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp

1                    5                    10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vERF2\_6  
 <400> 22  
 Asp Asp Phe His Phe Glu Thr Met Phe Ser Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 23  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vPTI\_1  
 <220><221  
 > MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Phe or Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Gln or Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Met or Val  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Phe or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Thr or Leu  
 <400> 23  
 Asp Asp Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Gly Xaa Leu Lys Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 24

<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220><223> Variant TAD interaction motif vPTI4\_2  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa is Asp or Glu  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, or Met  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
  
<222> (9)..(9)  
<223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (11)..(11)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (12)..(12)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (13)..(13)  
<223> Xaa is any amino acid

<400> 24  
 Asp Asp Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 25  
 <211> 11  
  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vPTI4\_3  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Phe or Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Gln or Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Met or Val  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Phe or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Thr or Leu

<400> 25  
 Asp Asp Xaa Glu Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 26  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vPTI4\_4

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Asp or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, or Met

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 26

Asp Asp Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp

1                    5                    10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vPTI4\_5

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is any amino acid

<400> 27  
 Asp Asp Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp  
 1                    5                    10

<210> 28  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vPTI4\_6  
 <400> 28  
 Asp Asp Phe Glu Phe Glu Met Met Phe Thr Asp  
 1                    5                    10

<210> 29  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vAtERF1\_1

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is Phe or Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Phe or Leu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Thr or Val  
 <400> 29  
  
 Xaa Asn Asp Xaa Glu Xaa Met Xaa Xaa  
 1                    5  
 <210> 30  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vAtERF1\_2  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is any amino acid  
  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <400> 30  
 Xaa Xaa Asp Xaa Glu Xaa Met Xaa Xaa  
 1                    5  
 <210> 31  
 <211> 11  
  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vAtERF1\_3  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Phe or Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Phe or Leu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Thr or Val  
 <400> 31  
 Xaa Asp Xaa Glu Phe Xaa Gln Met Xaa Xaa Asp

1                    5                    10

<210> 32  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vAtERF1\_4  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Tyr, or Pro  
 <  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <400> 32

Xaa Asp Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Met Xaa Xaa Xaa

1                    5                    10

<210> 33  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vAtERF1\_5  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp, Glu, His, Arg, or Lys  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Tyr, or Pro  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221>  
 > MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <400> 33  
 Xaa Asp Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Met Xaa Xaa Xaa  
 1                    5                    10  
 <210> 34

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vAtERF1\_6  
 <400> 34  
 Glu Asn Asp Phe Glu Phe Glu Met Phe Thr Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 35  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vORCA2\_1  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Phe or Leu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is Glu or Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe or Asp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Glu or Ile  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Met or Ile  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <  
 222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Phe or Leu

<400> 35  
Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Asp  
1                    5                    10

<210> 36  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220><223> Variant TAD interaction motif vORCA2\_2  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa is Asp or Glu  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp

<400> 36  
Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Asp  
1                    5                    10

<210> 37  
<211> 11

<212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vORCA2\_3  
  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Phe or Leu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is Glu or Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe or Asp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Glu or Ile  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Met or Ile  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Phe or Leu  
 <400> 37

Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Thr Asp

1                    5                    10

<210> 38  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vORCA2\_4  
 <220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is His, Arg, Lys, Asp, or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Arg, His, Lys, Asp, or  
 Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Arg, His, Lys, Asp, or  
 Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, or Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <400> 38  
 Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Asp

1                    5                    10  
 <210> 39  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vORCA2\_5

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <400> 39  
 Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 40  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vORCA2\_6  
  
 <400> 40

Glu Asp Phe Asp Leu Glu Met Leu Thr Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 41  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vDREB1A\_1  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Gln or Ala  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Xaa is Thr or Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <400> 41  
 Xaa Xaa Ala Phe Xaa Met His Asp Glu Xaa Met Phe Glu Xaa Xaa  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 42  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vDREB1A\_2  
 <220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa is Asn, His, Arg, Lys, Asp, or Glu  
  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa is Phe, Tyr, or Trp  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (13)..(13)  
<223> Xaa is any amino acid  
  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (14)..(14)  
<223> Xaa is any amino acid  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (15)..(15)  
<223> Xaa is Pro, His, Arg, Lys, Asp, or Glu  
<400> 42

Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Met Phe Xaa Xaa Xaa

1                    5                    10                    15

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vDREB1A\_3

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Asp or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Asp or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Phe or Tyr

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Gln or Ala

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is Thr or Met

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is Asp or Glu

<400> 43

Xaa Xaa Phe Glu Xaa Glu Xaa Met Phe Xaa Xaa

1                    5                    10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vDREB1A\_4

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is His, Arg, Lys, Asp, or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile,  
 Phe, Tyr, Trp, or Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile,  
 Phe, Tyr, Trp, or Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <400> 44  
 Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Glu Xaa Met Phe Xaa Xaa  
 1                    5                    10  
 <210> 45  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vDREB1A\_5  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Asp, Glu, or Asn  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Asp, Glu, or Pro  
 <400> 45  
 Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Glu Xaa Met Phe Xaa Xaa  
 1                    5                    10  
 <210> 46  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223>  
 > Variant TAD interaction motif vDREB1A\_7  
 <400> 46  
 Glu Asp Phe Glu Phe Glu Ala Met Phe Met Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 47  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vCBF1\_1

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Gln or Thr

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Thr or Met

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Asp or Glu

<400> 47

Asp Glu Glu Xaa Met Phe Gly Xaa Xaa

1                    5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vCBF1\_2

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Asp, Glu, or Pro

<400> 48

Asp Glu Glu Xaa Met Phe Xaa Xaa Xaa

1                    5

<210> 49  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vCBF1\_3  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Gln or Thr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Thr or Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <400> 49

Asp Asp Phe Glu Phe Glu Xaa Met Phe Xaa Xaa

1                    5                    10

<210> 50  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vCBF1\_4  
  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, or Tyr

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile,  
 Phe, Trp, Tyr, or Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <400> 50  
 Asp Xaa Xaa Glu Xaa Glu Xaa Met Phe Xaa Xaa  
 1                    5                    10  
 <210> 51  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vCBF\_5  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223>  
 > Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Asp, Glu, or Pro

<400> 51

Asp Xaa Xaa Glu Xaa Glu Xaa Met Phe Xaa Xaa

1                    5                    10

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vCBF1\_6

<400> 52

Asp Asp Phe Glu Phe Glu Thr Met Phe Met Asp

1                    5                    10

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vDOF1\_1

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Asp or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Glu or Val

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Phe or Trp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Asp or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Gln or Ala

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Met or Ala

<400> 53

Xaa Asp Ser Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Phe Asp

1                    5                    10

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vDOF1\_2

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Asp, Glu, or Pro

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 54  
 Xaa Asp Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp  
 1                    5                    10

<210> 55  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220><223>  
 > Variant TAD interaction motif vDOF1\_3

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Asp or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Glu or Val

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Phe or Trp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Asp or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Gln or Ala

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Met or Ala

<400> 55

Xaa Asp Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Thr Asp  
 1                    5                    10

<210> 56  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vDOF1\_4  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is His, Arg, Lys, Asp, or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)

<223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, or Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, or Tyr  
 <400> 56  
 Xaa Asp Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Asp  
 1                    5                    10

<210> 57  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vDOF1\_5  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp, Glu, or Pro  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <400> 57  
 Xaa Asp Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Asp

1                    5                    10  
 <210> 58  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vDOF1\_6  
 <400> 58

Glu Asp Phe Glu Phe Glu Ala Met Phe Thr Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 59  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Primer KanMX-For

<400> 59  
aagaaactag tggatccgct agcttaatta aagatctggg accgttttagc ttgcctcgtc 60  
<210> 60  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Primer KanMX-Rev

<400> 60  
aagaaggaat tcagagctcg ttttcgacac 30  
<210> 61  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Primer HO-For

<400> 61  
ttgcccgaat tcctg 15  
<210> 62  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Primer HO-Rev

<400> 62  
aagaagacta gtcgtacgac gccattt 27  
<210> 63  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Primer MEL1-For

<400> 63  
acggaacggg taccaagaag aaaggaagac atg 33  
<210> 64  
<211> 18  
<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer MEL1-Rev

<400> 64

ctaaagggaa caaaagct 18

<210> 65

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer HAS-For-F1

<400> 65

tagattggga tcctgggggg cgcggaac 28

<210> 66

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer HAS-For-R1

<400> 66

tagattgtta attaatggtc atcctcatcc tgc 33

<210> 67

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Z6 sequence

<400> 67

tgtggtggga gaggagggtg g 21

<210> 68

<211> 201

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 8x Z6 repeated sequence

<400> 68

ggtgtggtgg gagaggagg tgggagtgtg gtgggagagg agggtggctc tgtggtggga 60

gaggagggtg gagatgtggt gggagaggag ggtggtcttg tgggtgggaga ggagggtggg 120

gatgtggtgg gagaggagg tggccttgtg gtgggagagg aggggtggagg tgtggtggga 180  
gaggagggtg gcttaagccg c 201  
<210> 69  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Primer TQPATS  
<400> 69  
acaagagtgg attgatgatc tagagaggt 29  
<210> 70  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Primer TQPATA  
<400> 70  
ctttgatgcc tatgtgacac gtaaacagt 29  
<210> 71  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Primer TQPATFQ  
<400> 71  
ggtgttgg ctggtattgc ttacgctgg 29  
<210> 72  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Primer TQPALS  
<400> 72  
tactatgact tgatgttgtg tgggtactga 30  
<210> 73  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220><223> Primer TQPALA  
 <400> 73  
 gagcgggtcta aattccgacc cttatttc 28  
 <210> 74  
 <211> 33

<212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> 6FAM probe TQPALFQ  
 <400> 74  
 aaacgatggc aggagtgcc tttttctatc aat 33  
 <210> 75  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Primer Blu636  
 <400> 75  
 gagaggaggg tggagatgt 19  
 <210> 76  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Primer Blu637  
 <400> 76  
 accttgact cccatgttg 19  
 <210> 77  
 <211>  
 > 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Primer 3'CHS forward  
 <400> 77  
 ctgatccaat tccagaggtc g 21  
 <210> 78  
 <211> 24

<212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Primer 3'CHS reverse  
 <400> 78  
 acacacaagc actagacatg ttgc 24  
 <210> 79  
 <211> 102  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Synthetic sequence encoding VP16 TAD interaction motif fused to  
 Z6 DNA binding motif  
 <400>  
 79  
 ggcatgacc atgatcctgt gtcttatgga gccttggatg ttgatgactt tgagtttgag 60  
 cagatgttca cagatgcact gggcatcgat gactttggtg ga 102  
 <210> 80  
 <211> 99  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Synthetic sequence encoding ERF2 TAD interaction motif fused to  
 Z6 DNA binding motif  
 <400> 80  
 aatgactctg aggacatgct ggtgatggt ttgctcaagg atgcctttca ctttgacacc 60  
 tccagctcag acctctctg cctctttgac ttcccagcc 99  
 <210> 81  
 <211> 123  
 <212>  
 > DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Synthetic sequence encoding PTI4 TAD interaction motif fused to  
 Z6 DNA binding motif  
 <400> 81  
 tgctgacag aaacttgggg agacttgcct ctcaaggttg atgactctga ggacatggtg 60  
 atctatggtc tgttgaagga tgcactctca gtggggtggt cccattctc tttcacggct 120  
 ggt 123

<210> 82

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence encoding ATERF1 TAD interaction motif fused to  
Z6 DNA binding motif

<400> 82

tgcttcacgg aatcctgggg agaccttcct ttgaaggaga atgactctga ggacatgttg 60

ggtacggaa tcctcaatga tgcttttcat ggtggc 96

<210> 83

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence encoding ORCA2 TAD interaction motif fused to  
Z6 DNA binding motif

<400> 83

ttcaatgaga attgtgaaga aatcatctct ccaaactacg catcagagga ctgtctgac 60

atcatcttga cggacatctt caaggaccaa gacaactatg aggatgag 108

<210> 84

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence encoding DREB1A TAD interaction motif fused to  
Z6 DNA binding motif

<400> 84

ggctttgaca tggaagaaac attggtggag gccatctaca ctgctgaaca gagcgagaat 60

gccttctaca tgcgatgaga ggcaatgttt gagatgcat ctcttctggc caacatggct 120

gagggaatg 129

<210> 85

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence encoding CBF1 TAD interaction motif fused to

Z6 DNA binding motif

<400> 85

gaacagtcag aaggtgcttt ctacatggat gaagagacca tgtttgggat gccaacctt 60  
ctggataaca tggcagaggg a 81

<210> 86

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence encoding DOF1 TAD interaction motif fused to

Z6 DNA binding motif

<400> 86

tcagctggga aggacgtctt ggatgatgag gacagctttg tttggcctgc tgcaccttt 60  
gacatgggtg cctgctgggc tggagctggc tttgctgac 99

<210> 87

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence encoding exemplary variant ERF2 TAD

interaction motif fused to Z6 DNA binding motif

<400> 87

aatgactctg aggacatgct ggtgatggt ttgctcaagg atgatttcca ctttgagaca 60  
atgttctcag acctgtcctg cctctttgac ttcccagcc 99

<210> 88

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence encoding exemplary variant PTI4 TAD

interaction motif fused to Z6 DNA binding motif

<400> 88

tgccctgacag aaacttgggg agacttgcct ctcaagttg atgactttga gtttgagatg 60  
atgttcacag atgcactctc agtggggtgg tccccattct ctttcacggc tggc 114

<210> 89  
 <211> 102  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Synthetic sequence encoding exemplary variant AtERF1 TAD  
 interaction motif fused to Z6 DNA binding motif  
 <400> 89  
 tgcttcacgg aatcctgggg agaccttctt ttgaaggaga atgactttga gtttgaatg 60  
 ttcacagatt acggaatcct caatgatgct tttcatggtg gc 102  
 <210>  
 > 90  
 <211> 108  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Synthetic sequence encoding exemplary variant ORCA2 TAD  
 interaction motif fused to Z6 DNA binding motif  
 <400> 90  
 ttcaatgaga attgtgaaga aatcatctct ccaactacg catcagagga ctttgatctt 60  
 gagatgttga cggacatctt caaggaccaa gacaactatg aggatgag 108  
 <210> 91  
 <211> 117  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Synthetic sequence encoding exemplary variant DREB1A TAD  
 interaction motif fused to Z6 DNA binding motif  
 <400> 91  
 ggctttgaca tggaagaaac attggtggag gccatctaca ctgctgaaca gagcgaggac 60  
 tttgagtttg aagcaatggt catggattct cttctggcca acatggctga gggaatg 117  
 <210> 92  
 <211> 87  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Synthetic sequence encoding exemplary variant CBF1 TAD  
 interaction motif fused to Z6 DNA binding motif

<400> 92  
 gaacagtcag aaggctcttt ctacatggat gactttgagt tcgagacaat gttcatggac 60  
 acccttctgg ataacatggc agaggga 87

<210> 93

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence encoding exemplary variant DOF1 TAD  
 interaction motif fused to Z6 DNA binding motif

<400> 93  
 tcagctggga aggcagctctt ggatgatgag gactttgagt ttgaagccat gttcacggac 60  
 atgggtgcct gctgggctgg agctggcttt gctgac 96

<210> 94

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer TQGUS

<400> 94  
 agacagagtg tgatatctac cc 22

<210> 95

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer TQGUSA

<400> 95  
 ccatcagcac gttatcgaat 20

<210> 96

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 6FAM probe TQGUSFQ

<400> 96  
 cacaaccgt tctactttac tgctt 26

<210> 97  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Primer BYEEFU119F  
 <400> 97  
 aggctccac ttcaggatg 19

<210> 98  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Primer BYEEFU119R  
 <400> 98  
 cagaccaac agggacagta 20

<210> 99  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> UPA DNA binding domain  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (12)..(13)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 99  
 tatataaacc tnnccctct 19

<210> 100  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a ERF2 plant TAD interaction  
 motif  
 <400> 100  
 Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Asp Ala  
 1 5 10 15

Phe His Phe Asp Thr Ser Ser Ser Asp Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe  
                   20                  25                  30

Gly Gly

<210> 101

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a PTI4 plant TAD interaction  
                   motif

<400> 101

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Asp Asp

1                  5                  10                  15  
 Ser Glu Asp Met Val Ile Tyr Gly Leu Leu Lys Asp Ala Leu Gly Ile  
                   20                  25                  30

Asp Asp Phe Gly Gly  
                   35

<210> 102

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a AterF1 plant TAD interaction  
                   motif

<400> 102

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Glu Asn  
 1                  5                  10                  15

Asp Ser Glu Asp Met Leu Val Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe Gly Gly  
                   20                  25                  30

<210> 103

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a ORCA2 plant TAD interaction

motif

<400> 103

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Glu Asp

1                    5                    10                    15

Leu Ser Asp Ile Ile Leu Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe Gly

                  20                    25                    30

Gly

<210> 104

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a DREB1A plant TAD interaction

motif

<400> 104

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Glu Asn

1                    5                    10                    15

Ala Phe Tyr Met His Asp Glu Ala Met Phe Glu Met Pro Ala Leu Gly

                  20                    25                    30

Ile Asp Asp Phe Gly Gly

35

<210> 105

<211

> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a CBF1 plant TAD interaction

motif

<400> 105

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Asp Glu

1                    5                    10                    15

Glu Thr Met Phe Gly Met Pro Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe Gly Gly

                  20                    25                    30

<210> 106

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a DOF1 plant TAD interaction

motif

<400> 106

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Glu Asp

1                    5                    10                    15

Ser Phe Val Trp Pro Ala Ala Ser Phe Asp Ala Leu Gly Ile Asp Asp

                  20                    25                    30

Phe Gly Gly

35

<210> 107

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant ERF2 TAD interaction

motif

<400> 107

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Asp Asp

1                    5                    10                    15

Phe His Phe Glu Thr Met Phe Ser Asp Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe

                  20                    25                    30

Gly Gly

<210> 108

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant ERF2 TAD interaction

motif

<400> 108

Asn Asp Ser Glu Asp Met Leu Val Tyr Gly Leu Leu Lys Asp Asp Phe

1                    5                    10                    15

His Phe Glu Thr Met Phe Ser Asp Leu Ser Cys Leu Phe Asp Phe Pro

                  20                    25                    30

Ala

<210> 109

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant PTI4 TAD interaction motif

<400> 109

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Asp Asp

1                    5                    10                    15

Phe Glu Phe Glu Met Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe

                  20                    25                    30

Gly Gly

<210> 110

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant PTI4 TAD interaction motif

<400> 110

Cys Leu Thr Glu Thr Trp Gly Asp Leu Pro Leu Lys Val Asp Asp Phe

1                    5                    10                    15

Glu Phe Glu Met Met Phe Thr Asp Ala Leu Ser Val Gly Trp Ser Pro

                  20                    25                    30

Phe Ser Phe Thr Ala Gly

                  35

<210> 111

<211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant AtERF1 TAD  
 interaction motif  
 <400> 111  
 Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Glu Asn  
 1 5 10 15  
 Asp Phe Glu Phe Glu Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe  
 20 25 30  
 Gly Gly

<210> 112  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant AtERF1 TAD  
 interaction motif  
 <400> 112  
 Cys Phe Thr Glu Ser Trp Gly Asp Leu Pro Leu Lys Glu Asn Asp Phe  
 1 5 10 15  
 Glu Phe Glu Met Phe Thr Asp Tyr Gly Ile Leu Asn Asp Ala Phe His  
 20 25 30  
 Gly Gly

<210> 113  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant ORCA2 TAD  
 interaction motif  
 <400> 113  
 Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Glu Asp

1                    5                    10                    15  
Phe Asp Leu Glu Met Leu Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe Gly  
                         20                    25                    30

Gly

<210> 114

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant ORCA2 TAD  
interaction motif

<400> 114

Phe Asn Glu Asn Cys Glu Glu Ile Ile Ser Pro Asn Tyr Ala Ser Glu

1                    5                    10                    15

Asp Phe Asp Leu Glu Met Leu Thr Asp Ile Phe Lys Asp Gln Asp Asn

                         20                    25                    30

Tyr Glu Asp Glu

                         35

<210> 115

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant DREB1A TAD  
interaction motif

<400> 115

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Glu Asp

1                    5                    10                    15

Phe Glu Phe Glu Ala Met Phe Met Asp Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe

                         20                    25                    30

Gly Gly

<210> 116

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant DREB1A TAD interaction motif

<400> 116

Gly Phe Asp Met Glu Glu Thr Leu Val Glu Ala Ile Tyr Thr Ala Glu

1                    5                    10                    15

Gln Ser Glu Asp Phe Glu Phe Glu Ala Met Phe Met Asp Ser Leu Leu

                  20                    25                    30

Ala Asn Met Ala Glu Gly Met

                  35

<210> 117

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant CBF1 TAD interaction motif

<400> 117

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Asp Asp

1                    5                    10                    15

Phe Glu Phe Glu Thr Met Phe Met Asp Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe

                  20                    25                    30

Gly Gly

<210> 118

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant CBF1 TAD interaction motif

<400> 118

Glu Gln Ser Glu Gly Ala Phe Tyr Met Asp Asp Phe Glu Phe Glu Thr

1                    5                    10                    15

Met Phe Met Asp Thr Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu Gly

20 25

<210> 119

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant DOF1 TAD interaction

motif

<400> 119

Gly Met Thr His Asp Pro Val Ser Tyr Gly Ala Leu Asp Val Glu Asp

1 5 10 15

Phe Glu Phe Glu Ala Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Asp Phe

20 25 30

Gly Gly

<210> 120

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Exemplary synthetic TAD comprising a variant DOF1 TAD interaction

motif

<400> 120

Ser Ala Gly Lys Ala Val Leu Asp Asp Glu Asp Phe Glu Phe Glu Ala

1 5 10 15

Met Phe Thr Asp Met Gly Ala Cys Trp Ala Gly Ala Gly Phe Ala Asp

20 25 30

<210> 121

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vERF2\_7

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, or Met  
  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <400> 121  
 Asp Xaa Phe His Phe Xaa Thr Xaa Xaa Ser Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 122  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vPTI4\_7  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Phe or Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, or Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Thr or Leu  
 <400> 122  
 Asp Asp Xaa Glu Xaa Xaa Met Xaa Xaa Xaa Asp  
 1                    5                    10  
 <210> 123  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vAtERF1\_7  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is Phe or Ser  
  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, Tyr, or Leu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa is Thr or Val  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <400> 123  
 Glu Asn Asp Xaa Glu Xaa Xaa Met Xaa Xaa Xaa  
 1                    5                    10  
 <210> 124  
 <211> 10

<

212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vORCA2\_7

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Phe or Leu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Phe, Tyr, Trp, or Asp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Asp, Glu, Ile, or Leu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Gln or Glu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, or Met

<220><221> MISC\_FEATURE

<222

> (8)..(8)

<223> Xaa is Phe, Tyr, Trp, or Leu

<400> 124

Glu Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Asp

1                    5                    10

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Variant TAD interaction motif vDREB1A\_7

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Asp, Glu, or Asn

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe, Tyr, or Trp  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Asp, Glu, or Pro  
 <400> 125  
 Glu Xaa Phe Glu Xaa Glu Ala Met Phe Met Xaa

1                    5                    10  
 <210> 126  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vCBF1\_7  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Asp, Glu, or Pro  
 <400> 126  
 Asp Xaa Phe Glu Xaa Glu Thr Met Phe Met Xaa

1                    5                    10  
 <210> 127  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Variant TAD interaction motif vDOF1\_7  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is Glu or Val

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Phe, Trp, or Tyr

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Asp, Glu, or Pro

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Ala, Val, Ile, Leu, or Met

<400> 127

Glu Asp Phe Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Phe Thr Asp

1

5

10