



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0068586

(43) 공개일자 2015년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0154370

(22) 출원일자 2013년12월12일

심사청구일자 2013년12월12일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

윤대진

경상남도 진주시 평거로39번길 9 107동 1106호

차준영

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교

(74) 대리인

김동완

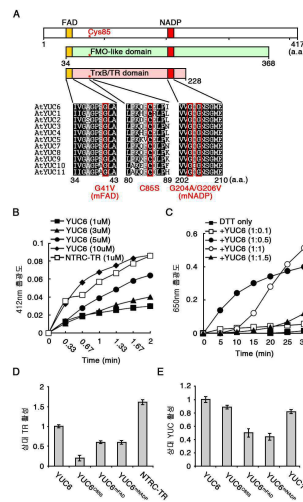
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 티오레독신 환원효소 활성으로 인해 가뭄 저항성이 증진된 YUCCA6 단백질 과발현 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 아라비도시스 YUCCA6 단백질을 과발현하는 아라비도시스 형질전환 식물체에 있어서, 상기 YUCCA6 단백질의 과발현은 티오레독신B(TrxB)/티오레독신 환원효소(TR) 도메인을 통해 활성산소(ROS) 항상성 유지 기능을 발현시킴으로써 산화 스트레스에 의한 가뭄 저항성을 증진시킨 아라비도시스 형질전환 식물체에 관한 것이다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-0111

부처명 농림수산부

연구관리전문기관 경상대학교 산학협력단

연구사업명 차세대 바이오그린21사업

연구과제명 시스템생물학 및 비교유전체학을 이용한 식물 할로필리즘 연구

기 여 율 1/2

주관기관 농촌진흥청

연구기간 2013.02.01 ~ 2013.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-0550

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 경상대학교 산학협력단

연구사업명 세계수준의 연구중심대학 육성 사업

연구과제명 극지생존 식물로부터 유용유전자 확보 및 재해저항성 작물체 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한국연구재단

연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 아라비돕시스 YUCCA6 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 단백질은 보존된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드(FAD) 결합 도메인(34-43 아미노산 잔기), NADP 결합 도메인(202-210 아미노산 잔기), 플라빈-함유 모노옥시게나제(FMO)-유사 도메인(34-368 아미노산 잔기) 및 티오레독신B(TrxB)/티오레독신 환원효소(TR) 도메인(34-228 아미노산 잔기)으로 이루어져 있고, 티오레독신 산화환원 효소 활성을 지니는 특징으로 하는 아라비돕시스 YUCCA6 단백질을 포함하는 조성물

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 아라비돕시스 YUCCA6 단백질의 티오레독신 환원효소 활성은 티오레독신B(TrxB)/티오레독신 환원효소(TR) 도메인을 통해 활성산소(ROS) 항상성 유지 기능을 발현시킴을 특징으로 하는 아라비돕시스 YUCCA6 단백질을 포함하는 조성물

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 아라비돕시스 YUCCA6 단백질의 티오레독신 환원효소 활성은 서열번호: 1의 아미노산 서열 중 85번째 아미노산 잔기 시스테인(Cys-85)이 필수적임을 특징으로 하는 아라비돕시스 YUCCA6 단백질을 포함하는 조성물

청구항 4

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 아라비돕시스 YUCCA6 단백질을 과발현하는 아라비돕시스 형질전환 식물체에 있어서, 상기 YUCCA6 단백질의 과발현은 티오레독신B(TrxB)/티오레독신 환원효소(TR) 도메인을 통해 활성산소(ROS) 항상성 유지 기능을 발현시킴으로써 산화 스트레스에 의한 가뭄 저항성을 증진시킨 아라비돕시스 형질전환 식물체

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 아라비돕시스 형질전환 식물체는 페록시다제 활성이 증가함을 특징으로 하는 산화 스트레스에 의한 가뭄 저항성을 증진시킨 아라비돕시스 형질전환 식물체

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 YUCCA6 티오레독신 환원효소 활성으로 인해 가뭄 저항성이 증진된 YUCCA6 단백질 과발현 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 식물체 내에서 아라비돕시스 YUCCA6 단백질(서열번호: 1)을 과발현시켜 YUCCA6(YUC6) 단백질 내의 티오레독신 환원효소(TR) 활성을 증진시킴으로써 가뭄저항성을 증진시킨 YUC6 단백질 과발현 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

식물호르몬은 외부 자극 및 내부 신호에 응답하여 성장 및 발달을 조절하는 중요한 역할을 한다. 식물호르몬 옥

신(인돌-3-아세트산, IAA)은 많은 측면에서 식물 성장과 발전을 조절하며 특히 애피컬(apical) 우세, 빛 및 중력에 대한 트로픽(tropic) 반응, 뿌리 및 슈트의 설계, 관상 분화, 배아 형성 및 슈트 신장 등을 들 수 있다. IAA의 생합성은 트립토판(Trp)-의존적으로 진행되며 트립토판-비의존적 경로는 더욱 자세한 분자적 해명을 요구하고 있다.

[0003] 그러나 트립토판으로부터 IAA의 생합성은 4개의 서로 다른 경로를 통해 진행되고 이는 인돌-3-피루브산(IPA), 인돌-3-아세탈독심(IAO), 인돌-3-아세트아미드(IAM) 및 트립타민(TAM)을 반응 중간체로 관여하고 있는 것이다. 트립토판 탈카르복실화 반응산물인 TAM은 식물 플라빈-함유 모노옥시게나제(FMO) 단백질의 YUCCA(YUC) 패밀리를 위한 기질이다.

[0004] YUC 단백질은 시험관 내에서 TAM의 N-하이드록실화를 촉매반응 시키고 유전학적 증거는 IAA 생합성 내에서 YUC 단백질의 역할을 지적하고 있다. 최근 생화학 및 유전학적 실험은 YUC 단백질이 IPA 전환에 효소로 작용하고 이는 IPA가 트립토판 아미노트랜스퍼라아제(TAA1/TAR1/TAR2) 작용을 통해 트립토판으로부터 생체내에서 IAA를 생성하는 것이다.

[0005] 아라비도시스 탈리아나는 YUC 단백질을 코드화시킨 11개의 유전자를 지니고 있다. 패밀리 멤버간에 기능적 반복성 때문에 단일 YUC 유전자의 비활성화 변이는 현저한 표현형의 변화를 야기하지 않는다. 그러나 4개의 변이 yuc1yuc4yuc10yuc11를 지닌 변이체는 꽃 및 관상 패턴 형성에 심각한 결함을 나타낸다. 몇 개의 YUC 유전자(YUC1/4/5/6/7)의 활성화-표지 변이체와 이 변이 YUC 유전자를 과발현 하는 형질전환 식물체는 IAA의 상승된 레벨을 나타냄을 특징으로 한다. 결과적으로 이 형질전환체는 고 옥신의 표현형인 연장된 배축(hypocotyl), 에피나스틱 코틸레돈(epinastic cotyledon), 하부 꺾형 잎 및 강한 애피컬 우세와 같은 옥신 축적에 의한 발달장애를 나타낸다.

[0006] 또한 YUC6를 과발현하는 식물체는 고 옥신 함량과 관련된 어둠-유도 잎 노화의 지연을 나타낸다. 활성화-표지 yuc7-1D 변이 식물체는 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 지니고 감자내의 YUC6의 이형적(heterologous) 과발현은 가뭄 스트레스 저항성을 향상시킨다. YUC 유전자 패밀리는 다양한 식물종에 존재하고 YUC 단백질은 종을 뛰어넘어 유사한 기능을 지닌다.

[0007] 벼의 YUC 패밀리 단백질인 Constitutively Wilted 1 (OsCOW1)가 수분 항상성에 관련되어 있음이 발견되었다. oscow 1 변이체는 낮은 뿌리 대 슈트 비율을 지니고 수분 부족에 기인하는 발달 장애와 구조적으로 수분감소(wilt)된 표현형을 지닌다. 옥수수 sparse inflorescence 1 변이체의 발달 결함은 YUC 단백질이 옥신 평형에 관여함을 제시하는 것이다. IAA 풀이 생합성, 콘주게이션, 퇴화 및 수송에 관련되어 적절한 수준을 유지하기 때문에 상기 결과는 전체적으로 YUC 단백질이 (i) 다양한 식물종 내에서 옥신 균형에 중요한 역할을 함과 (ii) 직접 또는 간접적으로 가뭄 저항성에 관련되어 있음을 나타내는 것이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 대한민국 특허출원 제 10-2012-114060호 '아라비도시스 YUCCA6를 과발현하는 가뭄 저항성이 향상된 형질전환 감자'를 출원한 바 있다. 이때 YUCCA6 단백질의 과발현은 옥신 생합성 경로를 활성화시킴으로써 가뭄 저항성을 향상시킨 것으로 간주하였다.

[0009] 한편 성장률, 발달, 대사의 변화와 항산화성의 증가는 스트레스 조건에 적응성을 증진시키고 세포사멸을 지연시킨다. 활성산소종(ROS)는 식물호르몬과 서로 관련하여 스트레스 반응 적응에 매개한다. 예를 들면 ROS는 앱시스산(ABA) 및 살리실산(SA)으로부터 기공 차단까지의 경로에 매개한다. ROS는 또한 gibberellin(GA) 경로를 통해 식물성장 반응을 조절하는데 관련되어 있다. GA-자극 트랜스크립트 1(GAST1)-유사 유전자 4(GASA4)는 GA-유도 유전자로써 GA 응답 증진에 관여하고 ROS 축적을 저해하며 시험관 내에서 산화환원 활성을 나타낸다. 산화환원 기능을 제거시킨 변이체는 GA 응답을 또한 제거시키고 이는 ROS가 GA 신호화를 조절하는 것을 의미한다. ROS와

옥신은 스트레스-유도 발달 변화를 조절하는데 중요한 역할을 한다. 외부 옥신 처리는 ROS 트랜지언트를 생성하고, 옥수수 뿌리 세포 내의 카탈라제(CAT)의 발현을 증진시킨다.

[0010] 손상된 티오레독신[티오레독신/NADPH-의존 티오레독신 리덕타제(NTR)]를 지닌 형질전환 아라비돕시스와 글루타치온(GSH/글루타레독신) 시스템은 세포 산화환원 항상성의 유지에 매우 중요한 역할을 한다. 예를 들면 ntra ntrb cab 2 삼중 변이체는 에피컬 우세의 손실, 맥관구조 결함 및 감소된 2차 뿌리생성과 같은 형태학적 결함뿐만 아니라 옥신과 ROS 경로간의 엇갈린 형태를 나타내는 감소된 옥신 수송을 나타낸다. ROS는 옥신과 유사한 생존 및 노화의 조절역할을 하며 이는 ROS와 옥신 간에는 중복된 기능을 나타내는 것이다.

[0011] 본 발명자들은 YUC6 단백질(서열번호: 1, 아라비돕시스 GenBank 데이터베이스 접근번호: At5g25620)을 과발현하는 아라비돕시스 식물체가 낮은 양의 ROS 축적을 나타내고 향상된 항산화 활성과 가뭄 저항성을 나타낸다는 것을 발견하였다. 보존된 도메인 검색은 YUC6의 FMO 도메인 내의 티오레독신 환원효소(TR) 도메인을 확인하였다.

[0012] 본 발명자들은 또한 모든 아라비돕시스 YUC 단백질간에 고도로 보존된 시스테인 잔기의 자리지정 변이에 의해 일반적인 YUC 활성으로부터 TR활성이 분리될 수 있음을 발견하였다. 본 발명자들은 YUC 과발현에 의해 제공되는 가뭄 저항성은 YUC6의 TR활성에 기인하는 것으로 옥신 함량의 증가에 근거하지 않음을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 YUC6 단백질(서열번호: 1)을 과발현하는 아라비돕시스 식물체가 낮은 양의 ROS 축적을 나타내고 향상된 항산화 활성과 가뭄 저항성을 나타낸다는 것과 보존된 도메인 검색을 통해 YUC6의 FMO 도메인 내의 티오레독신 환원효소(TR) 도메인을 확인코자 하는 것이다. 또한 모든 아라비돕시스 YUC 단백질간에 고도로 보존된 시스테인 잔기의 자리지정 변이에 의해 일반적인 YUC 활성으로부터 TR활성이 분리될 수 있음을 확인코자 하는 것이다. 본 발명자들은 YUC 과발현에 의해 제공되는 가뭄 저항성은 YUC6의 TR활성에 기인하는 것을 확인코자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 아라비돕시스 YUCCA6 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 단백질은 보존된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드(FAD) 결합 도메인(34-43 아미노산 잔기), NADP 결합 도메인(202-210 아미노산 잔기), 플라빈-함유 모노옥시게나제(FMO)-유사 도메인(34-368 아미노산 잔기) 및 티오레독신B(TrxB)/티오레독신 환원효소(TR) 도메인(34-228 아미노산 잔기)으로 이루어져 있고, 티오레독신 산화환원 효소 활성을 지님을 특징으로 하는 아라비돕시스 YUCCA6 단백질을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 이때 상기 아라비돕시스 YUCCA6 단백질의 티오레독신 환원효소 활성은 티오레독신B(TrxB)/티오레독신 환원효소(TR) 도메인을 통해 활성산소(ROS) 항상성 유지 기능을 발현시킴을 특징으로 한다.

[0016] 또한 상기 아라비돕시스 YUCCA6 단백질의 티오레독신 환원효소 활성은 서열번호: 1의 아미노산 서열 중 85번째 아미노산 잔기 시스테인(Cys-85)이 필수적임을 특징으로 한다.

[0017] 한편 본 발명의 또다른 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 아라비돕시스 YUCCA6 단백질을 과발현하는 아라비돕시스 형질전환 식물체에 있어서, 상기 YUCCA6 단백질의 과발현은 티오레독신B(TrxB)/티오레독신 환원효

소(TR) 도메인을 통해 활성산소(ROS) 항상성 유지 기능을 발현시킴으로써 산화 스트레스에 의한 가뭄 저항성을 증진시킨 아라비도시스 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[0018]

이때 상기 아라비도시스 형질전환 식물체는 페록시다제 활성이 증가함을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0019]

본 발명의 효과는 YUC6 단백질(서열번호: 1)을 과발현하는 아라비도시스 식물체가 낮은 양의 ROS 축적을 나타내고 향상된 항산화 활성과 가뭄 저항성을 나타낸다는 것을 확인하고 YUC6의 FMO 도메인 내의 티오레독신 환원효소(TR) 도메인을 확인함으로써 YUC6 티오레독신 환원효소 활성으로 인해 가뭄 저항성이 증진된 YUC6 단백질 과발현 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 yuc6-1D 형질전환 식물체의 감소된 ROS 축적에 관련한 가뭄저항성을 나타내는 도면이다.

도 1A는 생존 에세이이다. 3주령 야생형(WT, Col-g1), yuc6-1D, 35S:iaaL 및 yuc6-1DX35S:iaaL 식물체(상부 패널)를 사용하여 9일간 수분공급을 중단한 후 사진촬영하였다(중간 패널). 다시 수분공급후 2일 후의 식물체를 사진촬영하였다(하부 패널). 생존률(퍼센트)를 도면의 하단에 정량화하여 기재하였다.

도 1B는 수분손실을 에세이이다. 3주령 잘 수분공급된 토양식물체의 통기 부위를 떨어뜨려 즉시 무게를 측정하고 그 후 자연스럽게 건조시켜 지정된 시점의 무게를 측정한다. 수분 함량은 최초시점의 생무게에 대한 퍼센트로 계산하였다.

도 1C는 가뭄저항성에 대한 H₂O₂ 생성을 시각화한 것이다. 3주령 수분공급된 식물체를 6일간 수분공급(건조-) 시키거나 수분공급없이(건조+) 성장시킨다. 이들 식물체의 3번째 또는 4번째 로제트 잎을 DAB-염색으로 수행하였다. H₂O₂ 생성은 어두운 갈색으로 시각화하였다.

도 2는 yuc6-1D 형질전환 식물체의 MV-유도 산화 스트레스에 대한 증가된 저항성을 나타내는 도면이다.

도 2A는 지시된 농도의 MV를 포함하는 MS 한천 플레이트 내에서 2주간 성장시킨 야생형 WT(Col-g1) 및 yuc6-1D 형질전환 식물체를 나타낸 것이다. 도 2B는 상기 식물체의 생중량을 나타내는 것이다. 도 2C는 MS 한천 플레이트 상의 2주령 식물체를 MV로 처리하지 않거나(-MV) 10 μM MV로 4시간 노출시킨 경우(+MV) H₂O₂ 함량을 나타낸 것이다.

도 3은 YUC6 단백질은 티오레독신 환원효소 활성을 지니고 Cys-85는 활성에 필수적임을 나타내는 도면이다.

도 3A는 YUC6 단백질의 도메인 구조를 나타내는 것이다. YUC6 단백질의 전체길이(417 아미노산 잔기) 내에 보존된 FAD 결합 도메인(34-43 아미노산 잔기), Cys-85(아스트라 표시), NADP 결합 도메인(202-210 아미노산 잔기), FMO-유사 도메인(34-368 아미노산 잔기) 및 TrxB/TR 도메인(34-228 아미노산 잔기)로 이루어져 있음을 나타내는 것이다. FAD 및 NADP 결합 도메인과 Cys-85 부분의 서열은 모든 아라비도시스 YUC 단백질에서 정렬되어 있고 자리지정 돌연변이에 해당하는 부위는 붉은색 박스로 나타내었다. 각각의 지점에서 실질적 아미노산 치환을 나타낸다.

도 3B는 정제된 재조합 YUC6 단백질의 NADPH-의존적 티오레독신 환원효소(TR) 활성을 나타낸다. TR 활성은 5,5'-디티오비스-(2-니트로벤조산)(DTNB)를 기질로 사용하여 측정하였다. 412nm에서 흡광도의 증가로 표시하였다. 정제된 재조합 아라비도시스 NADPH-의존적 티오레독신 환원효소 C TR 도메인(NTRC-TR)을 대조군으로 사용하였다.

도 3C는 재조합 YUC6 단백질의 DTT-의존적 인슐린 리덕타제 활성을 나타낸 것이다. 인슐린 리덕타제 활성은 650nm에서 흡광도의 증가로 표시하였다. DTT는 오직 인슐린과 DTT를 포함한 샘플을 의미하며 YUC6는 포함되지 않았다. 다른 샘플은 동일한 양의 인슐린과 증가된 양의 YUC6를 DTT와 더불어 포함하는 것이다.

도 3D 및 도 3E는 야생형과 변이 YUC6 단백질의 TR 활성의 비교를 나타내는 것이다. 정제된 재조합 YUC6 단백질

의 TR 활성을 상기한 바와 같이 DTNB를 사용하여 측정하였다. 상대활성을 412nm에서 흡광비율의 증가로 언급하였으며 야생형 YUC6의 412nm에서 흡광을 1로 나타내었다.

도 4는 Cys-85는 YUC6 과발현 형질전환 식물체의 고 옥신 표현형에는 요구되지 않는다.

35S 프로모터로부터 과발현 형질전환 식물체 라인 YUC6-GFP(YUC6-OX), YUC6^{C85S}-GFP(YUC6-OX^{C85S}), YUC6^{mFAD}-GFP(YUC6-OX^{mFAD}), YUC6^{mNADP}-GFP(YUC6-OX^{mNADP}), CYP79B2-HA(CYP79B2-OX) 및 NTRA-HA(NTRA-OX)를 야생형 Col-0 백그라운드내에 DR5:GUS 형질전환 라인으로 형질전환시켜 획득하였다.

도 4A는 형질전환 식물체 내에 GFP- 및 HA-태그 단백질의 발현을 나타낸 Western 블로트 사진이다. 태그 단백질은 항-GFP 및 항-HA 항체를 통해 감지하였다. 적하 대조군으로 알파-HSP90 및 알파-튜블린 시그널이 나타난다. 도 4B는 30일령 형질전환 식물체를 대표하는 식물체 사진이다(상부열). 10일령 묘목의 GUS 염색은 오직 YUC6-OX, YUC6-OX^{C85S} 및 CYP79B2-OX 식물체만이 DR5:GUS 활성화에 반응하는 옥신의 증가를 나타내었다. 도 4C는 IAA1과 TUBULIN2의 발현수준을 2주령 식물조직으로부터 추출물의 qRT-PCR을 통해 측정한 것이다.

도 5는 Cys-85가 YUC6 과발현 식물체 내에서 가뭄 저항성, 향상된 페록시다제 활성 및 낮은 ROS 함량에 필수적임을 나타내는 도면이다.

야생형 DR5:GUS(Col-0) 식물체(WT)를 2개의 독립적인 YUC6-OX 형질전환 라인(7-3, 17-2), 하나의 YUC6-OX^{C85S} 라인, 및 하나의 NTRA-OX 라인과 동일한 백그라운드에서 비교한 것이다.

도 5A는 도 1A에 기술된 바와 동일하게 수행된 생존율 에세이이다. 도 5B는 도 1B에 기술된 바와 동일하게 수행된 수분 손실율 에세이이다. 도 5C는 가뭄저항성에 대한 H₂O₂의 생성이다. 네 번째 및 다섯 번째 로제트 잎을 도 5A에 나타난 식물체를 6일간 가뭄상태에 놓이게 한 후 획득하였다. 잎을 4시간동안 DAB(1mg/ml, pH 3.8)로 염색하고 H₂O₂는 어두운 갈색으로 시각화 하였다.

도 6은 TR 활성이 YUC6 과발현에 동반하는 조직 페록시다제 활성의 증가에 필요한 것임을 나타내는 도면이다.

MS 한천에서 성장시킨 2주령의 식물체를 효소 활성 에세이에 사용하였다. 도 6A는 yuc-1D와 이소제닉 야생형(WT) 식물체의 추출물 내에서 페록시다제 및 카탈라제 활성을 나타내는 막대그래프이다. 도 6B는 이소제닉 비형질전환체(WT), YUC6-OX 및 YUC6-OX^{C85S} 형질전환 식물체의 추출물 내 페록시다제 활성을 나타내는 막대그래프이다.

도 7은 YUC6 구조-기능 관련성을 설명하는 모형이다.

YUC6는 FMO 활성을 통해 옥신 생합성 경로로 기능한다. YUC6는 또한 페록시다제(Prx)를 활성화시키기 위한 티오레독신(TRX) 시스템과 관련된 TR 활성을 지닌다. 따라서 ROS 함량은 감소된다. FAD 및 NADP 결합부위는 FMO 및 TR 활성 모두에 필수적인 부위이다. Cys-85는 오직 TR 활성화에만 요구된다. 따라서 옥신 생합성 효소로써 YUC6는 식물 발달에 기여하고 TR 유사단백질로써 ROS 조절 및 산화 및 가뭄 스트레스에 보호기능을 지닌다.

도 8은 YUC6 과발현이 가뭄 저항성을 증가시킴을 나타내는 도면이다.

도 8A와 도 8B는 가뭄 저항성을 비교한 것이다. 도 8A는 야생형(WT), yuc6-1D 식물체를 3주간 잘 수분 공급시킨 후 성장시키고(대조군) 그 후 14일 동안 수분공급을 중단시킨 것이다(가뭄). 도 8B는 토양성장 식물체를 3주간 잘 수분 공급시켜 성장시킨 후 수분 공급 없이 성장케 한 것이다. YUC6 과발현 식물체(yuc6-1D, yuc6-2D 및 36S::YUC6)와 대조군 야생형(WT) 식물체를 12일 동안 수분공급을 중단한 후 사진 촬영하였다. yuc6-3k 형질전환체와 그의 대조군은 야생형(WT) 식물체는 10일간 수분 공급을 중단한 후 사진 촬영하였다. 도 8C는 수분감소율을 비교한 것이다. 잘 수분 공급된 3주령 식물체의 통기 부분을 떨어뜨려 실온 및 실 습도 하에서 필터 페이퍼에 놓고 자연스럽게 건조하였다. 통기 부분의 중량은 떨어뜨린 후 지정된 시간에 기록하였다. 수분 함량은 생중량에 대한 건조중량의 비율로 환산하였으며 최초 시기의 수분함량으로 객관화시켰다.

도 9는 산화 스트레스에 유도된 yuc6-1D 내의 ROS 축적의 저해가 고 옥신 함량에 기인하지 않음을 나타내는 도면이다.

도 9A는 H₂O₂ 생성을 위한 형광 염색이다. 5일령 묘목을 MV로 처리하지 않거나(-MV) 10 μM 메틸바이올로겐(+MV)에 4시간 노출시킨 후 2',7'-디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트(H₂DCF-DA)로 염색하였다. 형광과 흰

색 광선이미지는 염색된 뿌리 팁을 나타내는 것이다. 도 9B는 H_2O_2 생성을 위한 조직화학적 염색이다. 2주령 WT, yuc6-1D, 36S::YUC6, 35S::iaaL, yuc6-1DX35S::iaaL 식물체의 떨어진 잎을 처리하지 않거나 $10\ \mu M$ MV로 4시간 처리하였다. H_2O_2 축적을 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)으로 검은 갈색 염색을 통해 시각화하였다.

도 10은 YUC6가 홀다제 활성을 나타냄을 표시하는 도면이다.

정제된 말레이트 데하이드로게나제(MDH)와 정제된 재조합 YUC6 단백질을 표시된 물 비율로 함유하는 용액을 지정된 시간동안 $45^\circ C$ 로 가열하였다. MDH의 열 의집이 흡광도 $340nm$ 에서 증가함을 관찰하였다.

도 11은 Cys-213 과 Cys-217이 재조합 YUC6 단백질의 TR 및 홀다제 활성화에 필요하지 않음을 나타내는 도면이다.

도 11A는 아라비도시스 NADPH-의존 티오레독신 환원효소 A(NTRA)의 TR 도메인을 정렬한 것이다. 붉은 색 박스로 표시한 NTR 단백질의 NTRB 및 NTRC 및 YUC6의 활성 시스테인 페어(CXXC)를 나타낸다. YUC6의 파란색 박스로 표시된 시스테인(C213 및 C217)은 유사한 활성 시스테인 위로 여겨지며 자리지정 돌연변이를 통해 세린으로 동시에 치환하였다.

도 11B는 MBP-태그 단백질 부존재(대조군) 또는 재조합 MBP, MBP-YUC6, MBP-YUC6^{C85S}, 및 MBP-YUCCA6^{C213/217S} 단백질을 ($1\ \mu M$)을 포함하는 반응 내에서 DTNB를 기질로 사용하여 NADPH-의존적 TR 활성을 측정하는 것이다. TR 활성을 $412nm$ 에서 흡광도 증가로 모니터링하였다. 도 11C는 도 10에서 측정된 홀다제 사페론 활성을 MDH와 재조합 MBP-태그 YUC6 단백질을 1:1 물비율로 사용하여 측정하는 것이다.

도 12는 Cys-85가 YUC6 과발현 식물체 내에서 산화적 스트레스 하에 감소된 ROS 축적에 필요한 것임을 나타내는 도면이다.

도면에 나타난 5일령 식물체의 뿌리는 MS 한천 배지에서 성장시키고 상부열은 MV를 처리하지 않은 것이며 하부열은 $10\ \mu M$ MV를 4시간 처리한 후 H_2O_2 의 감지를 위해 H_2DCF -DA 염색시킨 것이다.

도 13은 가뭄-응답 유전자 RD29A와 DREB1A의 발현은 YUC6의 과발현에 영향받지 않음을 나타내는 도면이다.

RD29A(좌측) 및 DREB1A(우측) 전사 수준을 3주령 토양성장 식물체 WT(Co1-0), YUC6-OX, YUC6-OX^{C85S} 및 YUC6-OX^{nNADP} 형질전환 식물체의 지정시간동안 자연공기 건조를 허용한 통기 부위로부터 총 RNA를 qRT-PCR 방법으로 측정하였다. 발현 수준을 TUB의 발현수준과 비교하여 객관화 하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

YUCCA(YUC) 단백질은 플라빈 모노옥시게나제(FMO) 패밀리를 구성하는 것으로 옥신(IAA) 생합성에 중요한 역할을 하며 YUC6 과발현 식물은 높은 IAA 표현형을 나타낸다. 본 발명자들은 아라비도시스 내에서 YUC6의 과발현이 가뭄 및 산화 스트레스 조건 하에서 가뭄 스트레스 저항성, 낮은 수분손실 및 ROS 축적의 조절을 나타냄을 보고한다. IAA 콘주게이트 효소의 동시-과발현은 상승효과를 나타내지 않으며 이는 가뭄스트레스 저항성이 IAA 과생산에 근거하지 않음을 나타내는 것이다. 서열분석은 YUC6가 종전에 인식되지 않았던 보존된 티오레독신 환원효소(TR) 도메인을 포함하고 있으며 이는 FMO 도메인과 중복되는 것이다. 재조합 YUC6 는 티오레독신 환원효소(TR)를 지니고 분자 사페론 활성은 보존된 시스테인 장기(Cys-85)에 의존한다. C85S 변이는 YUC 활성화에 영향을 미치지 않으며 반면 FAD 및 NADP 결합 부위의 변이는 TR 및 FMO 도메인에 모두 공통된 것으로 TR 및 YUC 활성 모두를 저해시킨다. YUC6의 Cys85-의존 TR 활성화는 YUC6 과발현에 의한 명백히 향상된 가뭄 저항성, 제한 스트레스-유도 ROS 축적 및 향상된 페록시다제 활성을 재생산하는 것이다.

[0022]

이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0023]

(1) YUC6 과발현은 가뭄저항성과 감소된 과산화수소(H_2O_2) 축적을 야기한다.

[0024]

식물 호르몬은 염분, 온도, 가뭄 및 병충해 감염을 포함하는 환경적 스트레스에 적응하는 주요한 역할을 함이 알려져 있으며 이에 따라 성장 발달 및 자원절약이 이루어진다. 앱시스산, 자스몬산, 살리실산, 브라시노스테로

이드, 사이토카인, 에틸렌 및 옥신과 같은 식물 호르몬 민감도 및 조직내 수준의 변화는 가뭄 저항성에 영향을 미침이 보고되고 있다. YUC6 과발현은 형질전환 감자 식물체 내에서 가뭄 저항성을 증가시킨다. YUC 과발현에 의해 부여된 가뭄 저항성의 표현형이 고옥신 함량에 기여하는지 여부를 조사하기 위해 본 발명자들은 먼저 YUC 과발현이 아라비도시스 내에서 가뭄 저항성의 증가를 확인하기 위한 실험을 수행하였다(도 8).

[0025] 이 실험을 통하여 3주령 토양-성장 식물체를 10-14일간 수분 공급을 없애고 잎 내의 수분감소에 따른 현상을 주기적으로 기록하였다. 수분감소(wilt) 증상은 종래 보고하였던 yuc6-1D 와 yuc6-2D 활성 변이체 및 35S:YUC6 형질전환 식물체와 같은 YUC6 과발현 전환체의 잎에서보다도 더 심각하게 야생형 식물체의 잎에서 나타난다. 반면 yuc6-3k 변이체의 기능손실은 야생형보다도 더 민감하게 수분결핍을 나타내었다.

[0026] 따라서 yuc6-1D 변이체의 떨어진(detached) 로제트는 야생형 로제트보다 더욱 천천히 수분감소를 나타낸다. 가뭄저항성과 옥신 함량간의 관련성을 조사하기 위해서 본 발명자들은 3주령 잘 수분 공급된 야생형, yuc6-1D, 35S:iaaL 및 yuc6-1DX35S:iaaL 식물체를 사용하여 9일간 수분공급을 중단한 후 다시 수분공급후 이틀 후의 생존률을 모니터링 하였다(도 1A).

[0027] yuc6-1D 전환체는 옥신을 과생성시키며 35S:iaaL 전환체는 CaMV35S 프로모터로부터 Pseudomonas savastanoi IAA-라이신 신타제(iaaL)을 보존적으로 과발현시키고 유리 IAA 수준의 감소를 유지하는 표현형을 지니며 yuc6-1DX35S:iaaL 전환체는 정상 옥신수준과 가까운 야생형 수준의 회복된 yuc6-1D의 고옥신 표현형을 거의 지님을 나타내고 있다. 야생형의 생존률(25%)와 35S:iaaL 식물체의 생존률(22.5%)는 비교할만하였으나 YUC6 과발현 전환체 yuc6-1D의 생존률(45%) 및 yuc6-1DX35S:iaaL의 생존률(50%) 보다는 현저히 낮은 것이었다. 이들 식물체의 수분 결핍 저항성은 떨어진 대기 식물부분으로부터의 수분 감소를 평가함으로써 비교할 수 있다(도 1B). yuc6-1D와 yuc6-1DX35S:iaaL 로제트는 야생형 및 35S:iaaL 로제트에 비해 더욱 느리게 수분을 감소시킨다. 떨어진 yuc6-1D와 yuc6-1DX35S:iaaL 로제트로부터의 수분감소율은 거의 비슷하다. 이 데이터는 YUC6 과발현에 의해 실현되는 가뭄 저항성 표현형은 옥신 과생성과 관련되어 있지 않음을 나타낸 것이다.

[0028] ROS 수준은 야생형 식물체의 잎에 비해 아라비도시스 YUC6 과발현 식물체 (yuc6-1D)의 잎에서 더욱 낮게 나타난다. 유리 라디칼 및 과산화수소수(H_2O_2)와 같은 ROS는 가뭄과 같은 스트레스 조건하에서 축적되는 것으로 알려져 있으며 고농도시에는 세포사멸을 유발한다. 따라서 본 발명자들은 yuc6-1D 변이체의 가뭄저항성이 변경된 ROS 항상성에 의해 매개될 가능성을 고려하였다. 토양 성장야생형, yuc6-1D, 35S:iaaL 및 yuc6-1DX35S:iaaL 식물체의 잎을 7일간 가뭄 스트레스에 놓이게 하거나 놓이지 않게 하고 H_2O_2 축적을 감지하기 위해 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)로 조직화학 염색하였다. 가뭄 스트레스 후 yuc6-1D 및 yuc6-1DX35S:iaaL의 잎은 ROS 생성에 큰 증가를 나타내지 않았으나 야생형 및 35S:iaaL의 잎에는 상당한 ROS 생성의 증가가 관찰되었다(도 1C). 따라서 yuc6-1D 변이체의 가뭄 저항성은 가뭄 스트레스에 응답하여 감소된 ROS 축적 능력에 관련된 것이며 고 옥신 함량과는 관련이 없음을 확인하였다(도 1A 내지 도 1C).

[0029] (2)yuc6-1D 변이체는 야생형보다 산화 스트레스에 더욱 저항성을 지닌다.

[0030] 가뭄조건 하에서 YUC6 과발현 식물체가 감소된 ROS 수준을 나타내는지 여부를 확인하기 위해 본 발명자들은 산화적 스트레스에 대한 YUC6 과발현 식물체의 반응을 조사하였다. 메틸 비올로젠(MV)는 식물체 내에서 산화적 스트레스의 작용제로써 ROS의 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 yuc6-1D, 35S:YUC6, 35S:iaaL 및 yuc6-1DX35S:iaaL의 형질전환 식물체를 MV로 처리하였다. MV-유발 ROS 축적이 2',7'-디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트($H_2DCF-DA$)와 DAB를 각각 사용한 조직화학적 염색에 의해 야생형 및 35S:iaaL 형질전환 식물체의 뿌리와 잎에서 검출되었다.(도 9) 그러나 35S:YUC6 잎 또는 yuc6-1D 및 yuc6-1DX35S:iaaL 식물체의 뿌리와 잎에서는 MV 처리에 의한 ROS 축적이 유도되지 않았다(도 9). 이는 YUC6 과발현이 옥신 함량 증가가 동반되는 것이 아니라 산화적 스트레스 조건 하에서 더 낮은 ROS 축적을 야기시키는 것을 확인한 것이다.

- [0031] ROS의 과축적은 세포 사멸을 유도하기 때문에 야생형 식물체의 성장은 MV-함유 배지위의 yuc6-1D 식물체의 성장보다 더 저해되었다(도 2A 및 2B). 조직 H₂O₂ 함량의 예측은 ROS 수준이 스트레스 부재시에서 조차 야생형에 비해 yuc6-1D 식물체에서 더 낮게 나타난다. 이는 이전의 결과와 일치하는 것이다(도 2C). 조직화학적 염색데이터에 일치하는 것이며(도 9) MV 처리는 야생형에서 H₂O₂의 레벨을 증가시키나 yuc6-1D 식물체 내의 H₂O₂ 레벨의 증가를 야기시키지는 못하였다.
- [0032] (3) YUC6는 티오레독신-환원효소 유사 활성을 지니며 YUC6의 Cys-85는 그 활성에 필수적이다.
- [0033] YUC6의 ROS 항상성에 직접적 역할 가능성을 조사하기 위해서 본 발명자들은 보존된 도메인을 확인하기 위해 BLAST 검색에 의해 YUC6 단백질 서열을 분석하였다. YUC 단백질은 매우 보존된 FMO 도메인을 지니는 FMO의 일종으로 알려져 있다. YUC6의 FMO 도메인(아미노산 잔기 34-368)은 캐노니컬 FAD 및 NADP 결합부위(각각 아미노산 잔기 34-43, 잔기 202-210)를 지니고 있다. 이는 아라비돕시스 YUC 단백질 11개 모두가 고도로 보존된 것이다(도 3A). 본 발명자들은 BLAST에 의해 YUC6서열 내의 TrxB, 티오레독신 환원효소(TR) 도메인(아미노산 잔기 33-228)을 발견하였다(도 3A). 티오레독신 시스템은 NADPH, 티오레독신으로 이루어져 있으며 항산화활성인 TR 활성을 지니고 단백질 기능의 산화환원 조절 및 세포신호화 기능을 지닌다. 따라서 본 발명자들은 박테리아에서 발견된 말토오즈 결합 단백질(MBP)-태그 YUC6를 정제하고 TR 활성을 측정하였다. NADPH와 아라비돕시스 티오레독신 h3 존재하에서 YUC6(1-10 μM)은 농도 의존적 방법으로 5,5-디티오-비스(2-니트로벤조산)(DTNB)의 환원에 관여한다(도 3B).
- [0034] YUC6는 양성대조 단백질인 NADPH-의존 티오레독신 환원효소 C의 TR도메인 (NTRC-TR)의 1/10 정도의 특이활성을 나타낸다. 재조합 YUC6는 인슐린을 기질로 하여 환원제로써 DTT(10mM)과 함께 단백질 이황화 환원 활성을 또한 지닌다(도 3C). 650nm에서 탁도의 증가는 없었으며 인슐린의 환원증가 및 유리 인슐린 B 체인의 침강도 YUC6 존재 부재시 관측되지 않았다. 인슐린의 환원은 1:0.5 또는 1:1 몰비율의 인슐린:재조합 YUC6에서 관찰되었다. YUC6의 더 높은 함량비율은 저해적이었으며 이는 고농도에서 YUC6는 유리 인슐린의 체인의 침강을 방지하며 아마도 용해성 YUC6-환원 인슐린 복합체를 형성하는 것으로 여겨진다. 이와 같은 행태는 홀다제 사페론의 통상적 특성이다. 또한 홀다제 사페론 활성을 지니는 아라비돕시스 티오레독신-유사 단백질(AtTDX)는 인슐린 이황화 환원효소 에세이내에서 YUC6와 같은 행태를 나타내는 것이다. 따라서 재조합 YUC6 단백질은 말레이트 데하이드로게나제(MDH)의 열 유도응집을 효과적으로 방지하며 340nm에서 탁도가 증가함이 관찰되었고 이는 홀다제 사페론 활성을 농도 의존적으로 나타내는 것이다(도 10). 따라서 YUC6는 TR-유사 도메인을 지니고 또한 TR-유사 이황화 환원효소 활성을 나타내며 홀다제 사페론 활성을 나타내는 것이다.
- [0035] FMO에서 발견되는 모티프를 포함하는 단백질을 코드화시킨 29개의 아라비돕시스 유전자가 존재하며 이 중 11개의 유전자는 YUC 패밀리에 속한다. YUC 단백질은 순서대로 N-터미널, 보존된 FAD(GxGxxG) 결합부위, FMO 확인서열, 보존된 NADP(GxGxxG/A) 결합부위와 또 다른 보존된 서열(FATGY)를 FMO 내에서 지니고 있다. FAD와 NADP는 FMO와 TR을 위한 보조인자이며 따라서 FAD와 NADP 결합부위는 FMO와 TR 도메인 모두에 존재하는 것이다. 도 3A에 나타난 바와 같이 YUC6의 FMO 및 TR 도메인은 서로 중복되고 동일한 FAD 및 NADP 결합부위를 공유하는 것이다. FAD 및 NADP 결합부위 내에 Gly 잔기는 보조인자 결합 및 아라비돕시스 FMO의 FMO 활성에 반드시 필요한 것이다.
- [0036] 또한 YUC6의 NADP 결합부위 내의 보존된 Gly 잔기는 노화자연과 아라비돕시스의 YUC6 과발현 형질체의 고 옥신 표현형을 위해 반드시 필요한 것으로 나타내어진다. 아라비돕시스 내의 3개의 NADPH-의존 티오레독신 환원효소(NTRA/B/C)는 보존된 CXXC 모티프를 포함한다(도 11). 이는 다수의 산화환원 활성 단백질의 활성 부위 모티브이다. YUC6는 NTR의 특징 활성부위 CXXC 모티프를 지니지 않고 있다.(도 11A). 그러나 CXXC 모티프는 아미노산 잔기 213 및 217 사이에서 발견되며 이는 아마도 NTR의 캐노니컬 CXXC 모티프를 대체할 수 있는 것으로 여겨진

다(도 11A). YUC6는 13개의 Cys 잔기를 지니고 있으나 본 발명자들은 오직 Cys-85만이 11개의 아라비도시스 YUC 단백질 간에 보존되어 있음을 발견하였다(도 3A).

[0037]

YUC6의 TR 및 FMO활성 내에서 보존된 모티브의 역할을 조사하기 위해 본 발명자들은 YUC6 ORF 내의 자리지정 변이를 수행하였다(도 3A) YUC6^{mFAD} 변이체의 FAD 결합부위는 G41V 치환에 의해 생성되었으며 YUC6^{mNADP} 변이체의 NADP결합부위는 G204A 및 G206V 치환에 의해 생성되었다. Cys-85, Cys-213 및 Cys-217은 YUC6^{C85S}와 YUC6^{C213/217S} 변이체를 생성하기 위해 Ser로 치환되었다. 변이 YUC6 단백질을 MBP-태그 단백질로써 박테리아 내에서 발현시키고 균질하기 위해 정제시킨 후 TR 및 YUC 활성을 측정하였다.(도 3D, 도 3E 및 도 11B). 재조합 YUC6^{mFAD} 또는 YUC6^{mNADP} 단백질은 오직 재조합 야생형 YUC 단백질의 약 50%정도의 TR 및 YUC활성을 보유하였으며 이는 FAD 및 NADP 결합부위가 예측한 바와 같이 TR 및 YUC활성 모두에 필요한 것임을 나타내는 것이다. YUC6^{C85S}는 야생형 YUC 단백질에 비해 거의 동등한 YUC 활성을 지니나 흥미롭게도 오직 20-30% 정도의 TR 활성을 지닌다. YUC6^{C213/217S} 단백질은 야생형 YUC 단백질에 비해 증가된 홀다제 사페론 활성 및 TR 활성을 나타내지만 반면 YUC6^{C85S}는 야생형 YUC 단백질에 비해 더 적은 홀다제 사페론 활성을 지니는 것이다(도 11B 및 11C). Cys-85의 확인은 오직 YUC6의 TR-유사 및 사페론-유사 활성에 반드시 필요한 것이다. 그러나 YUC 기능의 불필요성은 본 발명자들에게 YUC6의 신규한 생화학적 활성의 생리학적 관련성을 조사하도록 요구하였다.

[0038]

(4) Cys-85는 가뭄 저항성에 필수적이거나 YUC6 과발현 식물체의 고 옥신 표현형에는 필수적이지 않다.

[0039]

합성 DR5 프로모터는 옥신-응답 TGTCTC 엘레먼트의 반복적 구조를 지니고 있으며 옥신 농도 또는 세포 레벨에서 옥신 민감성의 레포터로써 널리 사용되고 있다. 본 발명자들은 야생형 Col-0 백그라운드 내에 YUC6 YUC6^{mFAD} YUC6^{mNADP} YUC6^{C85S} NTRA(아라비도시스 GenBank 데이터베이스 접근번호 : At2g17420) 및 사이토크롬 P450 패밀리 79 서브패밀리 B 폴립еп타이드 2(CYP79B2)(아라비도시스 GenBank 데이터베이스 접근번호 : At4g39950)를 발현하는 컨스트럭트로 pEarleyGate101 내에서 CaMV35S 프로모터의 조절 하에서 DR5:GUS 라인으로 형질전환하였다. NTRA를 고 TR 활성 및 CYP79B2를 위한 대조군으로 사용하였으며 상기 CYP79B2는 트립토판을 IAA 전구체 IAO로 전환시키는 사이토크롬 P450을 코드화한 것이다. 또한 NTRA는 고 옥신 생합성 활성을 위한 대조군으로 사용하였다. 과발현 형질전환체를 Western 블로트 분석으로 스크리닝하고 형질전환체의 과발현 라인을 추가 분석을 위해 선별하였다(도 4A).

[0040]

상기 과발현 라인(-OX) 중에 YUC6-OX는 연장된 하부 꺾임을 나타내었으며 이는 yuc6-1D 및 다른 IAA 과생성 식물체와 유사하였다. 또한 형질전환되지 않은 대조군에 비해 잎에서 강한 GUS 염색을 지니며 이는 고 옥신 함량을 나타내는 것이다(도 4B). YUC6-OX^{C85S} 및 CYP79B2-OX도 역시 연장된 하부 꺾임과 IAA 과생성을 나타내는 잎 내에서 강한 GUS 염색이 예측한 바와 같이 나타났다. 이는 YUC85S가 야생형 YUC6와 같이 동일한 레벨의 YUC 활성을 지니기 때문이다(도 3E 및 도 4B). YUC6-OX^{mFAD} 및 YUC6-OX^{mNADP} 식물체는 촉매활성을 지니지 않은 FMO를 과발현하는 것으로 예측되었으며 이는 정상 옥신 레벨을 지니는 것이다. 따라서 YUC6-OX^{mFAD} 및 YUC6-OX^{mNADP} 내의 잎의 형태학적특성과 잎 GUS 염색강도는 형질전환되지 않은 식물체 및 NTRA-OX 식물체와 매우 유사하였다. GUS 염색 결과에 동일하여 IAA-응답 유전자 IAA-1의 전사수준은 야생형 식물체 YUC6-OX^{mFAD}, YUC6-OX^{mNADP} 및 NTRA-OX 형질전환 식물체와 유사하였으며 한편 YUC6-OX, YUC6-OX^{C85S} 및 CYP79B2-OX 형질전환 식물체에서는 yuc6-1D와 같이 전사수준이 증가하였다(도 4C). 이러한 결과는 YUC6의 FAD 결합 및 NADP 결합부위는 옥신 생성에 필수적인 것을 나타내는 것이다. 또한 이러한 결과는 YUC6의 TR/사페론 활성은 옥신 생성에 필요하지 않은 것임을 나타내는 것이다. 이러한 결과에 일치하여 Cys-85 변이는 YUC 활성에 영향을 주지 않고 재조합 YUC6의 TR 및 홀다제 사페론 활성을 감소시키는 것으로 나타났다(도 3D, 도 3E 및 도 11).

[0041]

또한 본 발명자들은 YUC6 과발현 식물체 내에서 ROS 제거를 위해 Cys-85의 FAD 및 NADP 결합부위의 중요성을 조사하였다. 비형질전환체, YUC6-OX, YUC6-OX^{mFAD}, YUC6-OX^{mNADP}, YUC6-OX^{C85S}, CYP79B2-OX 및 NTRA-OX 형질전환식물체를 MV로 처리한 후 ROS 축적을 H₂DCF-DA 염색에 의해 뿌리에서 모니터링 하였다(도 12). 형광 시그널 ROS 감지가 비형질전환체, YUC6-OX^{mFAD}, YUC6-OX^{mNADP}, YUC6-OX^{C85S} 및 CYP79B2-OX 형질전환식물체의 뿌리에서 관찰되었다. 그러나 YUC6-OX 와 NTRA-OX 형질전환식물체에서는 아주 조금 감지되었다. 이는 옥신 생성이 YUC6 과발현체의 증가된 ROS 제거 활성을 요하지 않는 것으로 규명된 것이다. 한편 세포 TR 활성의 상승은 ROS 축적을 보호한다. 인텍트 FAD 및 NADP 결합부위 및 Cys-85는 재조합 YUC6의 TR 활성에 기여하는 것으로 나타났다(도 3D). 이는 또한 ROS 제거 활성에 중요한 것이다. 또한 Cys-85는 ROS 제거에 중여한 것으로 밝혀졌으나 생체 내에서 옥신을 과생성 시키지는 않았다.

[0042]

다음으로 본 발명자들은 가뭄 처리된 식물체에 다시 수분 공급한 후에 생존률을 측정함으로써 이들 식물체의 가뭄 저항성 표현형을 조사하였다. 또한 공기중에서 자연 건조에 의해 떨어진 잎 내에서 수분 손상의 비율을 측정하였다(도 5A 및 도 5B). 3주령의 충분히 수분 공급된 식물체를 9일간 수분공급을 중단하여 가뭄상태에 놓이게 하였다. 수분 공급을 다시 시작하였으며 생존 퍼센트를 2일 후에 스코어로 나타내었다. YUC6-OX 와 NTRA-OX 형질전환체는 비형질전환체인 대조군 식물체에 비해 더 우수한 생존률을 나타내었다(2개의 YUC6-OX 독립 형질전환체의 각각 40% 및 60%, NTRA-OX 형질전환체의 77.5%는 비형질전환체 20%에 비해 높은 것이었다). YUC6-OX^{C85S} 형질전환체의 생존률은 12.5% 이었으며 YUC6-OX^{mNADP} 형질전환체의 생존률은 15%로써 비형질전환 식물체보다 낮은 것이었다(도 5A). 따라서 떨어진 잎 내에 수분함량의 감소 속도는 YUC6-OX 형질전환체가 가장 느렸으며 비형질전환체는 이보다 약간 빨랐고 YUC6-OX^{C85S} 와 YUC6-OX^{mNADP}에서는 더욱 빨랐다(도 5B). 조직화학적 염색에서 조직 ROS 함량은 비형질전환체, YUC6-OX^{mNADP} 및 YUC6-OX^{C85S} 형질전환체에서 높게 나타났으나 YUC6-OX 와 NTRA-OX 형질전환체에서는 더욱 적게 나타났(도 5C). 이는 Cys-85가 가뭄 저항성에 필수적이며 YUC6-OX 형질전환체의 낮은 ROS 함량에 필수적이라는 것이다.

[0043]

(5) TR 활성은 YUC6 과발현에 동반하는 페록시다제 활성 증가를 요구한다.

표 1

[0044]

AGI ID	유전자 명칭	평균로그	폴드
At5g38000	NADP-의존적 옥시도리덕타제	1.181	2.27
At5g37940	NADP-의존적 옥시도리덕타제	1.138	2.20
At5g17000	NADP-의존적 옥시도리덕타제	0.568	1.48
At4g36090	옥시도리덕타제	0.295	1.23
At5g59540	옥시도리덕타제	0.757	1.69
At3g60290	옥시도리덕타제	-1.246	0.42
At3g46500	옥시도리덕타제	0.844	1.80
At3g46490	옥시도리덕타제	0.890	1.85
At3g28480	옥시도리덕타제	0.269	1.20
At2g18150	페록시다제	0.423	1.34
At4g32580	티오레독신 패밀리 단백질	0.259	1.20
At2g41680	티오레독신 리덕타제, 추정/ NADP-의존적 티오레독신 리덕타제	-0.286	0.82

[0045]

수퍼옥사이드 디스뮤타제, 카탈라제 및 페록시다제와 같은 ROS 제거효소는 ROS의 해독을 통해 스트레스 유도 ROS 축적을 보호하는 것으로 알려져 있다. 마이크로 어레이 분석은 야생형 식물체에 비해 yuc6-1D 형질전환체의 풍부한 옥시도리덕타제 및 페록시다제 전사물을 확인하였다(표 1). 표 1은 yuc6-1D 내에 증가된 ROS 항상성 유전자 발현을 나타내는 것이다. 마이크로어레이 하이브리다이제이션을 수행하였으며 yuc6-1D 내의 ROS 항상성 유전자의 폴드 유도를 야생형과 비교하여 다음 표 1에 나타내었다.

[0046] 이러한 관찰에 일치하여 페록시다제 활성은 스트레스 부재시 야생형에 비해 yuc6-1D 형질전환체에서 증가되는 반면 카탈라제 활성은 모든 식물 라인에서 유사하게 나타났다(도 6A). 스트레스 부재시 비형질전환체 및 YUC6-OX^{C85S} 형질전환식물체의 내생 페록시다제 활성은 YUC6-OX 형질전환체의 내생 페록시다제 활성에 비해 낮게 나타났다(도 6B). 이러한 결과는 YUC6의 TR 활성이 YUC6의 과발현에 동반하는 페록시다제 활성의 증가에 매개하는 것을 나타내며 아마도 페록시다제의 업스트림 작용에 의한 것으로 여겨진다. RD29A 및 DREB1A 와 같은 가뭄응답 신호 경로의 마커 유전자의 발현수준이 유도되었으나 야생형, YUC6-OX, YUC6-OX^{C85S}, 및 YUC6-OX^{mNADP} 형질전환체 간에 가뭄 스트레스 하에서 큰 차이는 없었다(도 13). 또한 이러한 결과는 YUC6 과발현에 관련된 가뭄 저항성 표현형은 YUC6의 TR 활성에 관련된 향상된 ROS 제거에 의해 우세하게 매개되는 것을 나타내는 것이다.

[0047] 본 발명자들은 실험 결과를 통합하여 도 7에 나타난 바와 같은 모델을 수립하여 YUC6의 과발현에 기인한 가뭄저항성 증가를 설명한다. TR 활성에 기인하여 YUC6 과발현은 페록시다제의 활성 및/또는 안정성을 증가하여 세포의 ROS 함량을 감소시킨다. YUC6의 FAD 및 NADP 결합부위는 옥신 생합성을 야기하기 위해 FMO 활성을 요구한다. TR 활성을 통해 ROS 제거가 향상되고 가뭄 저항성이 증진된다. 그러나 Cys-85는 YUC6의 TR 기능만을 오직 요구하는 것이다.

[0048] 식물 호르몬은 염분, 온도, 수분부족 및 병원체 감염과 같은 환경적 스트레스의 적응에 매우 중요한 역할을 하며 이에 따라 증식 발달 및 자원 경작이 가능하다. 가뭄 스트레스 저항성을 증진시키기 위한 옥신의 역할에 관한 증거는 아직 부족하다. 가뭄에 기인한 수분손실을 방지하기 위해 잎 절제에 매개하는 에틸렌은 과산화수소에 의해 매개된다. 옥신은 과산화수소 축적을 저해하고 절제를 예방하는 에틸렌 작용에 길항한다. 외생 옥신 처리는 ROS 트랜지언트를 생성하며 옥수수 뿌리 세포 내에서 카탈라제의 전사수준을 증진시킨다. 이러한 데이터에 근거하여 옥신을 과생성하는 식물체는 ROS를 과축적할 것이며 따라서 산화 스트레스에 민감하게 된다. 이는 옥신을 과생성하는 yuc6-1D 또는 35S:YUC6 형질전환식물체가 산화스트레스 존재 또는 부재시 더 적은 ROS를 축적시키며 가뭄 또는 산화스트레스에 더욱 저항성을 지닌다는 본 발명자들의 관찰결과에 반하는 것이다(도 1, 2, 4, 5 및 도 8, 9, 12). 본 발명의 데이터는 YUC6 과발현으로부터 야기되는 가뭄 저항성은 옥신 과생성과 관련되어 있지 않다는 것을 명백히 나타낸다. 또한 이는 세포 ROS 레벨 상에 YUC6의 과발현 TR활성의 영향과 관련되어 있다. YUC7 또는 YUC6의 과발현은 가뭄저항성을 증가시키고 Cys-85는 모든 YUC 단백질 내에서 보존되어 있기 때문에 모든 YUC 단백질은 TR 활성을 지니고 과발현 된다면 가뭄 저항성을 지닐 것이다.

[0049] ROS는 식물체 내에서 광합성, 호흡 및 환경 스트레스와 호르몬인지에 응답하여 생성된다. 가뭄 스트레스는 단독 또는 다른 스트레스와 결합하여 ROS 축적을 야기한다. ROS는 정상식물의 성장 및 발달에 필요한 신호의 중간 매체이고 또한 스트레스에 방어적 응답을 야기 시키기 위해 필요한 것이다. 예를 들면 식물세포 내에 ROS 신호하는 스트레스 조건에 의하여 기공 폐쇄 및 발달 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다. 고농도의 ROS는 독성을 지니며 세포 사멸을 유도한다. ROS 축적은 ROS 생성과 제거 사이의 균형을 나타내는 것이다. 가뭄 저항성 및 가뭄 민감성의 비교와 형질전환 식물체의 연구를 통하여 엽록체 미토콘드리아, 퍼옥시좀 및 아포플라스트 내의 ROS 생성과 제거는 가뭄 저항성을 지지하는데 매우 중요한 요인이라는 것이 밝혀졌다.

[0050] 다수의 효소와 화합물이 ROS 제거에 중복적 기능을 지닌다. 슈퍼옥사이드 디스무테아제, 카탈라제, 아스코르베이트 페록시다제, 글루타치온 페록시다제 및 페록시레독신 등의 효소가 ROS 해독하에 매우 중요한 역할을 한다. 물론 페록시레독신(티오레독신 페록시다제) 및 티오레독신은 가뭄 스트레스에 대해 보호하는 중요한 역할을 함이 알려져 있다. 엽록체 국소화된 NTRC는 H₂O₂를 제거하는 페록시레독신을 포함하는 2-Cys를 감소시키고 엽록소의 생합성과 산화적 손실에 대응하는 엽록체의 보호 및 가뭄 스트레스에 저항하는 식물체의 보호에 필수적인 과정을 구성한다. 미토콘드리아 및 시토플라스마의 페록시레독신은 NTRC/A/B에 의해 감소된다. NTRC/B는 감소된 티오레독신의 세포레벨을 유지하기 위한 중요한 요소이며 이 경로를 통해 세포 페록시다제 활성에 활성화를 위해 필요한 것으로 여겨진다. 따라서 YUC6의 TR 활성은 ROS 제거를 위해 티오레독신 시스템을 활성화하는데 필요한 작용을 한다. 페록시레독신은 YUC6 과발현이 H₂O₂제거에 관련되어 있는 직접 또는 간접적 수단으로 여겨진다. 몇 종

의 티오레독신과 티오레독신 유사 단백질은 산화환원 항상성 유지 작용과 스트레스 조건 하에서 기질 단백질의 언폴드(unfold)를 방지하기 위해 관여되는 것으로 여겨진다. 이와 유사하게 YUC6 역시 TR 활성화에 의존적으로 샤페론 활성을 나타낸다(도 10 및 11).

- [0051] 결론적으로 YUC6는 산화환원 민감 단백질 타겟에 대해 샤페론 유사 활성화에 의해 ROS항상성 유지를 조절하는 것이다. 아스코르브산, GSH 및 알파-토코페롤과 같은 비효소적 ROS 제거 물질의 세포내 레벨 증가는 가뭄 저항성을 증진시키는 것으로 여겨진다. 따라서 YUC6의 과발현은 가뭄 저항성에 기여하는 이러한 티올의 환원형의 세포내 풀의 증가를 통해 중요한 역할을 하는 것이다.
- [0052] 이하 본 발명의 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다.
- [0053] (실시예 1) 식물 재료 및 성장 조건
- [0054] 아라비도시스 탈리아나 yuc6-1D라인은 Col-히 백그라운드 내에 존재하는 것이며 다른 모든 라인도 Col-0 백그라운드 내에 존재한다(도 1 및 도 8 및 9). 이소제닉 야생형 라인을 모든 실험에 사용하였다.
- [0055] 형질전환 YUC6-OX, YUC6-OX^{C85S}, YUC6-OX^{mFAD}, YUC6-OX^{mNADP}, CYP79B2-OX 및 NTRA-OX 라인을 구축하기 위해 아라비도시스 YUC6 및 YUC6 변이체의 오픈리딩프레임과 사이토크롬 P450 패밀리의 79 서브패밀리 B 폴리펩타이드 2(CYP79B2) 또는 NADPH-의존 티오레독신 리덕타제 A(NTRA)를 도너 벡터(pDONR-221)내로 클로닝하고 이어서 Gateway 클로닝 시스템(Invitrogen)을 사용하여 사용자 지침에 따라 재조합하고 pEarleyGate101 벡터로 이동시켰다. 컨스트럭트를 아그로박테리움 튜메파시엔스(GV3101)에 도입하고 플로랄-딤 형질전환 방법을 통해 형질전환 DR5:GUS라인(Col-0 백그라운드)을 제조한다. 형질전환체를 BASTA를 통해 선별하고 동형접합라인을 알파-HA 항체 및 알파-GFP 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석법에 의해 확인하였다.
- [0056] 씨앗을 30% 표백제에 5분간 표면-살균처리하고 멸균 증류수로 5번 세척시킨 후 과종전에 4℃에서 2일간 인큐베이션 시켰다. 식물체를 23℃의 성장챔버 내에서 16시간/8시간 명-암 사이클에서 흙 또는 펄트리 디쉬에 20g/L의 설탕과 0.6%(w/v) 한천을 포함하는 Murashige and Skoog(MS) 배지에서 성장시켰다.
- [0057] (실시예 2) 메틸 바이올로겐과 가뭄 스트레스 처리
- [0058] 메틸 바이올로겐(MV) 처리를 위해 5-일령 묘목(H₂DCF-DA 염색용) 또는 2주령 식물체의 떨어진 잎(DAB 염색용)을 물에 띄워 10 μM MV로 처리하였다. 성장 후에 대한 MV의 효과를 연구하기 위해 식물체를 발아시키고 MV 함유 배지에서 유지시킨다. 가뭄 스트레스 처리를 위해 잘 수분 공급된 토양성장 3주령 식물체를 사용하였다. 물 공급을 9일간 중단시키고 다시 시작하였다. 생존률을 녹색 건강한 식물체의 수로 판단하여 계산하였다. 수분손실을 측정하기 위해 토양성장 3주령 식물체의 공기접촉부위를 떨어뜨리고 실온 및 습도 하에서 건조를 허용한다. 각각의 식물체의 생중량을 지정된 시간에 측정하였다.
- [0059] (실시예 3) 아미노산 서열 분석
- [0060] 아라비도시스 YUC 패밀리의 단백질과 NTR(NTRA, NTRB 및 NTRC)의 아미노산 서열 추론을 위해 GenBank 데이터베이스로 조회하였으며 ClustalX 및 GeneDoc 방법에 따라 다중 정렬을 사용하여 정렬하였다. TR 및 FMO 도메인은

NCBI-BLAST 내의 보존된 도메인검색을 사용하여 확인하였다.

[0061] (실시예 4) 자리지정 돌연변이를 사용한 변이 YUCCA6 컨스트럭트의 생성

[0062] 각각의 변이를 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 표 2의 목록에 기재하였다. YUC6 ORF의 자리지정 돌연변이를 수행하여 YUC6^{C85S} 및 YUC6C^{213/217S}를 생성하였으며 이때 Pfu Turbo DNA 폴리머라제를 이용하여 Stratagene 사의 자리지정 돌연변이 키트를 사용자 지침에 의해 사용하였다. pMAL-c2-YUC6⁵를 주형으로 사용하였다. YUC6의 NADP 결합부위의 변이는 이미 기술하였으며 또한 보충 표 2에 나타난 프라이머를 사용하여 FAD 결합부위의 변이를 동일한 방법으로 수행한다. PCR 생성물을 대장균에서 형질전환시켜 DNA 서열에 의해 복원된 플라스미드를 확인하였다.

표 2

[0063]

명칭	프라이머 서열(5'에서 3')	용도
YUC6	F:AAAAAGCAGGCTTCATGGATTCTGTGGAAGAG(서열번호: 2) R:AGAAAGCTGGGTCGATTTTTTTTACTTGCTCGTC(서열번호: 3)	게이트웨이 클로닝
YUC6 ^{C85S}	F:CTTCCTAAACAATTCTCTGAACCTCCGATTATA(서열번호: 4) R:TATAATCGGAAGTTCAGAGAATTGTTTAGGAAG(서열번호: 5)	변이
YUC6 ^{C213/217S}	F:TCCGGTATGGAGGTTTCTTTGGATCTCTCCAACCTCGGTGCTCAG(서열번호: 6) R:CTGAGCACCAGTGGAGAGATCCAAAGAACTCCATACCGGA(서열번호: 7)	변이
YUC6 ^{mFAD}	F:CCGGTGATCGTAGGCGCCGACCGTCGGTACTAG(서열번호: 8) R:CATGCTGCCGTGGCTAGTACCGACGGTCCG(서열번호: 9)	변이
NTRA	F:GCGGATCCATGAGCCAGTCAAGATTC(서열번호: 10) R:GCCTCGAGTCAATCACTCTTACCTC(서열번호: 11)	클로닝
IAA1	F:ATGGAAGTCACCAATGGGGCTTAACCT(서열번호: 12) R:TCATAAGGCAGTAGGAGCTTCGGATC(서열번호: 13)	qRT-PCR
RD29A	F:ATCACTTGGCTCCACTGTTGTTC(서열번호: 14) R:ACAAAACACACATAAACATCCAAAGT(서열번호: 15)	qRT-PCR
DREB1A	F:TGCGTTGGCGTTTCAGGATG(서열번호: 16) R:CAAACTCGGCATCTCAAACATCG(서열번호: 17)	qRT-PCR
TUB	F:AGCAAATGTGGGACTCCAAG(서열번호: 18) R:CACCTTCTTCATCCGCAGTT(서열번호: 19)	qRT-PCR
CYP79B2	F:AAAAAGCAGGCTTCATGAACACTTTTACCTCAAA(서열번호: 20) R:AGAAAGCTGGGTCTCACTTACCCTCGGGTAGAG(서열번호: 21)	게이트웨이 클로닝

[0064] (실시예 5) 재조합 YUC6 단백질의 발현 및 정제

[0065] pMAL-c2-YUC6 컨스트럭트를 말토오즈-결합 단백질(MBP)-융합 단백질로써 야생형 및 YUC6 변이체의 발현을 위해 대장균 BL21 세포에 형질전환 시켰다. 단백질 발현이 30℃에서 0.5mM 이소프로필-1-티오-베타-D-gal-액토피라노사이드(IPTG)를 첨가하여 유도되었다. 4시간 IPTG 처리 후에 세포를 수집하였다. 세포는 1% Triton X-100 으로 하쇄되었으며 12,000rpm에서 10분간 원심분리시켜 세포 대브리스를 제거하였다. MBP-융합 단백질을 아밀로오즈 수지를 사용한 친화 클로마토그래피(New England Biolabs)로 정제하였다.

[0066] (실시예 6) DTNB 리덕타제 에세이

- [0067] 티오레독신 환원효소(TR) 활성을 23℃에서 2황화기질로써 5,5'-디티오비스-(2-니트로벤조산)(DTNB)를 사용하여 측정하였다. 150mM의 인산칼륨, 3mM EDTA, 5mM DTNB, 200mM NADPH 및 아라비도시스 티오레독신 h3(1-10mM)을 포함하는 반응 혼합물을 사용한다. 반응은 정제된 야생형과 YUC6 변이 단백질(MBP-융합 단백질로써)의 첨가로 시작되었으며 412nm 흡광도 하에서 UV-가시광선 스펙트로포토메타(Beckman coulter)를 사용하여 측정하였다. 야생형 YUC6의 TR 활성의 하나의 유닛은 412nm에서 지속시간(2분)으로 정의하였으며 변이 YUC6 단백질의 상대활성을 야생형 YUC6 단백질의 활성과 비교하여 계산하였다.
- [0068] (실시예 7) 인슐린 디설파이드 리덕타제 에세이
- [0069] 인슐린 디설파이드 리덕타제 활성을 10 μ M 인슐린과 1mM 디티오쓰레이톨(DTT)을 이용하여 50mM 인산칼륨 및 2mM EDTA를 포함하는 반응혼합물 내에서 환원제로써 측정하였다. 반응은 재조합 YUC6 단백질(MBP-융합단백질로써)의 함량을 변화시켜 첨가함으로써 시작되었으며 활성은 650nm에서 UV-가시광선 스펙트로포토메타(Beckman coulter)를 사용하여 30분간 모니터링하였다.
- [0070] (실시예 8) 홀다제 사페론 에세이
- [0071] 정제된 아라비도시스 말레이트 데하이드로게나제(MDH, EC 1.1.1.37)과 정제된 재조합 야생형 및 변이 YUC6 단백질을 일정 몰비율로 45℃로 40mM HEPES 완충액으로 인큐베이션 시켰다. MDH 응집을 나타내는 340nm의 흡광을 Beckman DU-800 스펙트로포토메타(Beckman coulter)와 등은 셀 홀더 조립장치를 사용하여 30분간 모니터링 하였다.
- [0072] (실시예 9) H₂O₂, 페록시다제 및 카탈라제 활성측정
- [0073] 2주령 식물 조직을 수확한 후 4시간 동안 MV(10 μ M) 처리 또는 처리 없이 냉동시켰다. 냉동된 조직을 액체질소에서 그라운드 시킨다. 그라운드 조직(50mg)을 얼음 하에서 20mM 인산칼륨 완충액(pH 6.5)에서 침지시킨다. 추출물을 4℃에서 15분간 12,000rpm으로 원심분리시켜 분리시킨다. H₂O₂ 농도와 페록시다제 활성을 Amplex Red 과산화수소/페록시다제 에세이 키트를 사용자 지침에 따라 사용하여 상등액 내에서 측정한다(분자 프로브). 형광물질을 스펙트로 플루오로미터에 의해 감지한다(분자 디바이스). 카탈라제 활성을 Amplex Red 카탈라제 에세이 키트를 사용자 지침에 따라 사용하여 동일한 식물 추출물로 측정한다(분자 프로브).
- [0074] (실시예 10) H₂O₂ 및 ROS를 위한 조직화학적 염색
- [0075] H₂O₂ 축적을 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)를 사용하여 시각화하였다. 떨어진 잎을 DAB 용액(1mg/mL, pH 3.8)에 4시간동안 부유시키고 사진촬영하였다. ROS 축적은 2,7-디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트 (H₂DCF-DA)로 시각화하였다. DAB염색처리시킨 MV를 처리하거나 처리하지 않은 묘목(5일령)을 4℃에서 10mM H₂DCF-DA로 30분간 인큐베이션 시켰다. 묘목을 10mM MES, 0.1mM KCl 및 0.1mM CaCl₂ (pH 6.0)으로 세척하고 22℃에서 1시간 인큐베이션 시켰다. 형광물질(여기 488nm, 발광 522nm)을 confocal 마이크로스코피(Olympus)로 감지하였다.
- [0076] (실시예 11) GUS 염색

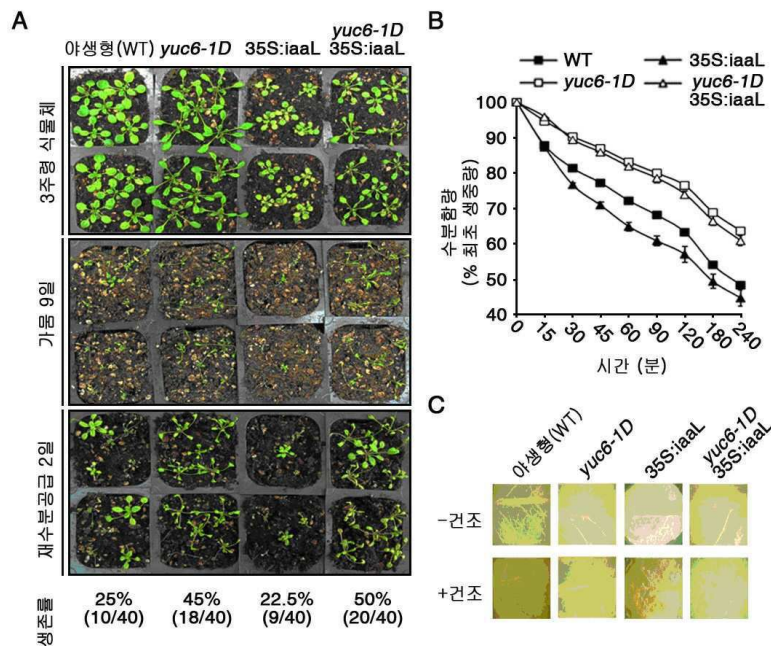
[0077] 2주령 토양성장 묘목을 염색 완충액 [50mM Tris-Cl pH 7.5, 0.2% triton X-100, 1mM 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 베타-D-글루쿠론산(X-gluc)]으로 하룻밤 인큐베이션 시킨다. 그 후 묘목을 실온에서 100% EtOH로 인큐베이션 시켜 엽록소를 제거한다.

[0078] (실시예 12) RT-PCR 및 정량 RT-PCR

[0079] 정량 PCR을 위해 2 또는 3주령 식물체를 수확하고 액체질소에 그라운드 시켰다. 총 RNA를 TRIzol 시약(Qiagen)을 사용하여 추출하였다. cDNA를 42℃에서 올리고 dT 프라이머와 역전사효소(Solgent)을 사용하여 60분간 합성하였다. 동일한 양의 cDNA를 주형으로 사용하여 PCR 증폭하였다. 특정 트랜스크립트를 유전자 특이 정방 및 역방 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 이때 Quantifast SYBR Green PCR kit(Qiagen)을 사용하여 반복 증폭시켰다. 정량 PCR 측정은 3개의 생물학적 반복으로 수행하였다. 증폭곡선과 유전자 발현은 내부 스탠다드로 사용한 TUBULIN 하우스키핑 유전자를 통해 객관화했다.

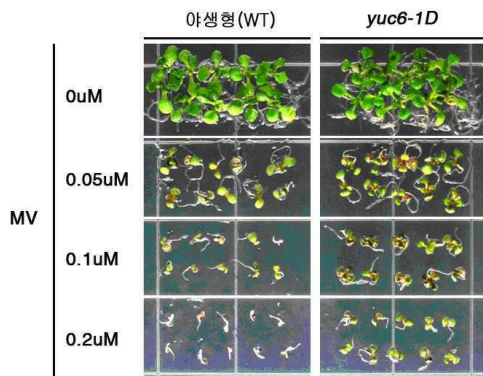
도면

도면1

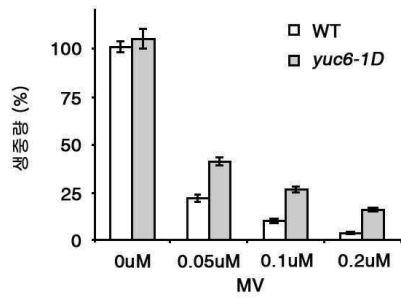


도면2

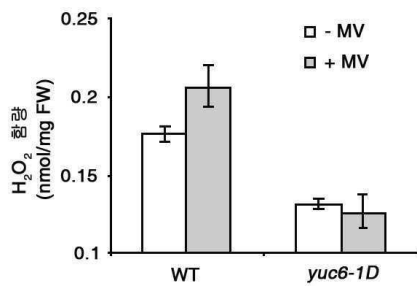
A



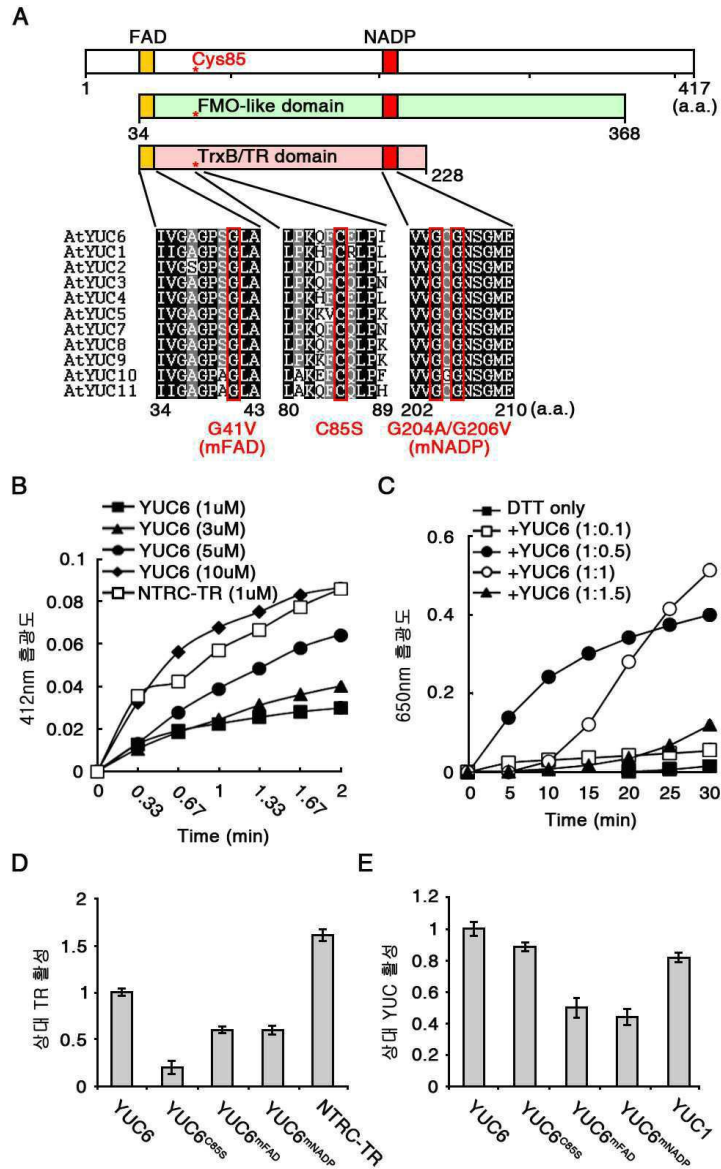
B



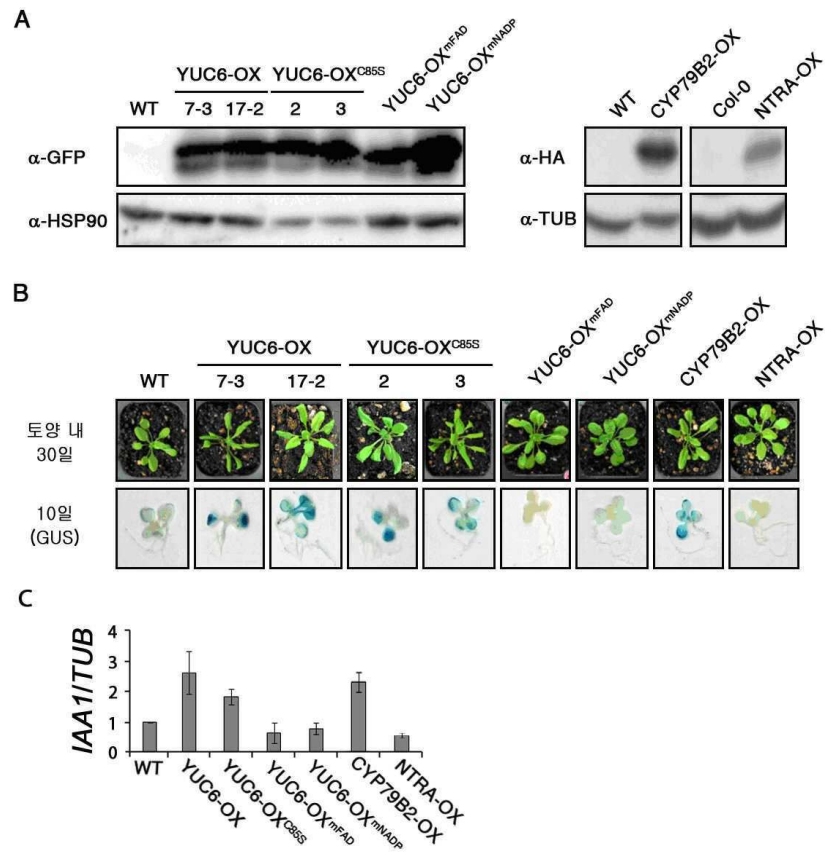
C



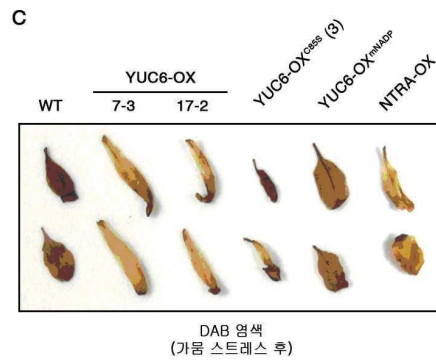
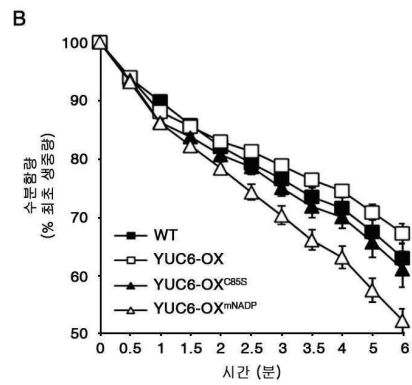
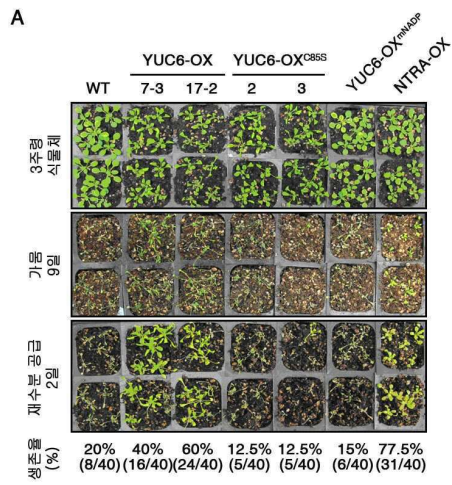
도면3



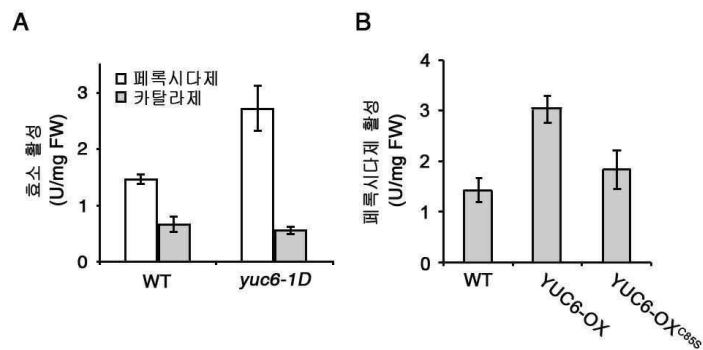
도면4



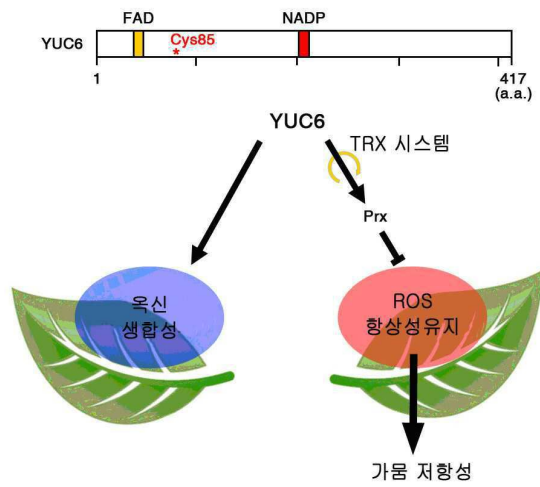
도면5



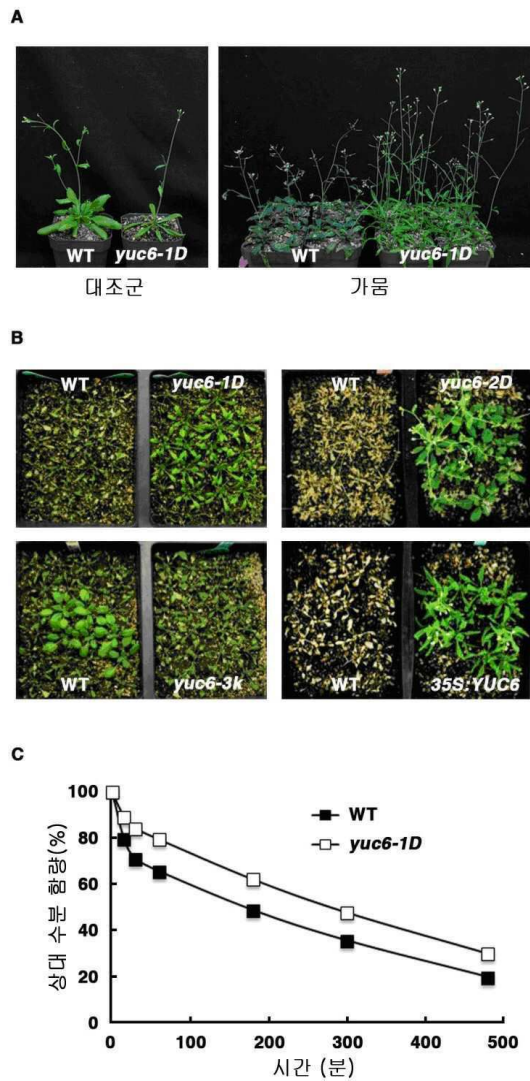
도면6



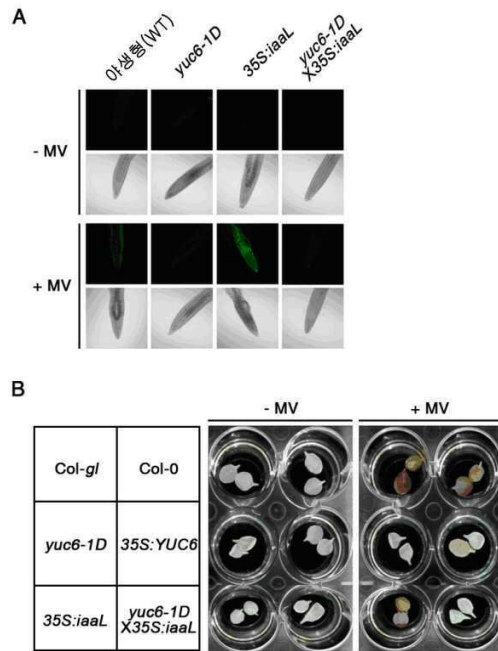
도면7



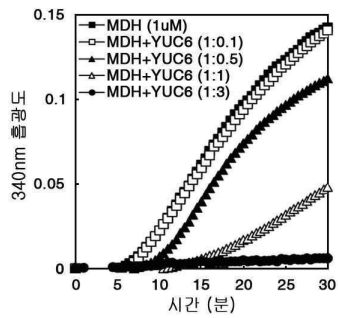
도면8



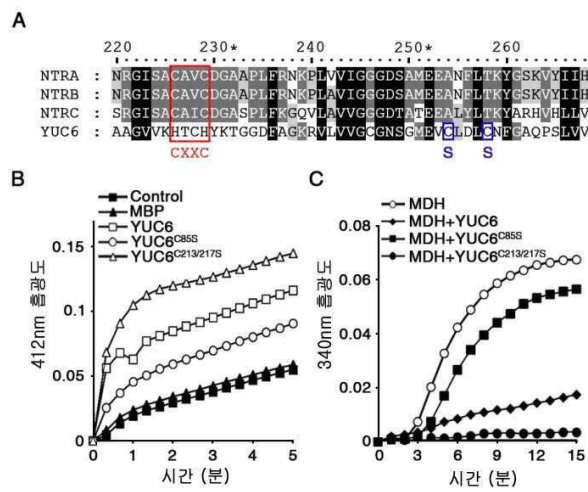
도면9



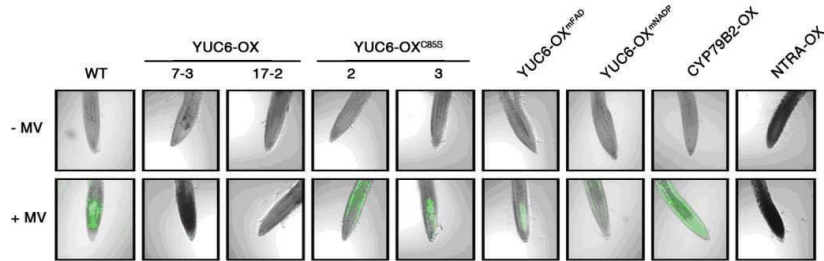
도면10



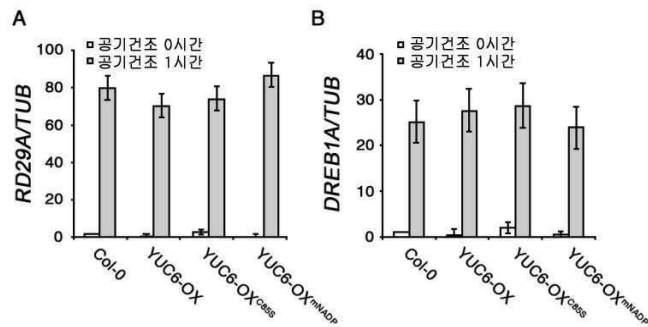
도면11



도면12



도면13



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> YUCCA6 over-expressing transgenic plant having enhanced drought resistance due to the thioredoxin reductase activity
- <130> KP-947
- <160> 21
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 417
- <212> PRT
- <213> Arabidopsis
- <400> 1

Met Asp Phe Cys Trp Lys Arg Glu Met Glu Gly Lys Leu Ala His Asp

1 5 10 15

His Arg Gly Met Thr Ser Pro Arg Arg Ile Cys Val Val Thr Gly Pro

20 25 30

Val Ile Val Gly Ala Gly Pro Ser Gly Leu Ala Thr Ala Ala Cys Leu

35 40 45

Lys Glu Arg Gly Ile Thr Ser Val Leu Leu Glu Arg Ser Asn Cys Ile

50	55	60	
Ala Ser Leu Trp Gln Leu Lys Thr Tyr Asp Arg Leu His Leu His Leu			
65	70	75	80
Pro Lys Gln Phe Cys Glu Leu Pro Ile Ile Pro Phe Pro Gly Asp Phe			
	85	90	95
Pro Thr Tyr Pro Thr Lys Gln Gln Phe Ile Glu Tyr Leu Glu Asp Tyr			
	100	105	110
Ala Arg Arg Phe Asp Ile Lys Pro Glu Phe Asn Gln Thr Val Glu Ser			
	115	120	125
Ala Ala Phe Asp Glu Asn Leu Gly Met Trp Arg Val Thr Ser Val Gly			
	130	135	140
Glu Glu Gly Thr Thr Glu Tyr Val Cys Arg Trp Leu Val Ala Ala Thr			
145	150	155	160
Gly Glu Asn Ala Glu Pro Val Val Pro Arg Phe Glu Gly Met Asp Lys			
	165	170	175
Phe Ala Ala Ala Gly Val Val Lys His Thr Cys His Tyr Lys Thr Gly			
	180	185	190
Gly Asp Phe Ala Gly Lys Arg Val Leu Val Val Gly Cys Gly Asn Ser			
	195	200	205
Gly Met Glu Val Cys Leu Asp Leu Cys Asn Phe Gly Ala Gln Pro Ser			
	210	215	220
Leu Val Val Arg Asp Ala Val His Val Leu Pro Arg Glu Met Leu Gly			
225	230	235	240
Thr Ser Thr Phe Gly Leu Ser Met Phe Leu Leu Lys Trp Leu Pro Ile			
	245	250	255
Arg Leu Val Asp Arg Phe Leu Leu Val Val Ser Arg Phe Ile Leu Gly			
	260	265	270
Asp Thr Thr Leu Leu Gly Leu Asn Arg Pro Arg Leu Gly Pro Leu Glu			
	275	280	285
Leu Lys Asn Ile Ser Gly Lys Thr Pro Val Leu Asp Val Gly Thr Leu			
	290	295	300

Ala Lys Ile Lys Thr Gly Asp Ile Lys Val Cys Ser Gly Ile Arg Arg

305 310 315 320

Leu Lys Arg His Glu Val Glu Phe Asp Asn Gly Lys Thr Glu Arg Phe

325 330 335

Asp Ala Ile Ile Leu Ala Thr Gly Tyr Lys Ser Asn Val Pro Ser Trp

340 345 350

Leu Lys Glu Asn Lys Met Phe Ser Lys Lys Asp Gly Phe Pro Ile Gln

355 360 365

Glu Phe Pro Glu Gly Trp Arg Gly Glu Cys Gly Leu Tyr Ala Val Gly

370 375 380

Phe Thr Lys Arg Gly Ile Ser Gly Ala Ser Met Asp Ala Lys Arg Ile

385 390 395 400

Ala Glu Asp Ile His Lys Cys Trp Lys Gln Asp Glu Gln Val Lys Lys

405 410 415

Ile

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

aaaaagcagg cttcatggat ttctgttgga agag

34

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

agaaagctgg gtcgattttt ttacttgct cgtc

34

<210> 4

<211> 33

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 cttcctaaac aattctctga acttccgatt ata 33
 <210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 tataaatcgga agttcagaga attgtttagg aag 33
 <210> 6
 <211> 45

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 tccggtatgg aggtttcttt ggatctctcc aacttcggtg ctcag 45
 <210> 7
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 ctgagcacccg aagttggaga gatccaaaga aacctccata ccgga 45
 <210> 8
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ccggtgatcg taggcgccgg accgtcggta ctag 34

<210>	9	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	9	
catgctgccg	tggttagtac	cgacggtcg
		30
<210>	10	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	10	
gcggatccat	gagccagtca	agattc
		26
<210>	11	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
gcctcgagtc	aatcactctt	accctc
		26
<210>	12	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
atggaagtca	ccaatggggc	ttaacct
		27
<210>	13	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	

tcataaggca gtaggagctt cggatc	26
<210> 14	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 14	
atcacttggc tccactgttg ttc	23
<210> 15	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 15	
acaaaacaca cataaacatc caaagt	26
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 16	
tgcgttggcg tttcaggatg	20
<210> 17	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 17	
caaactcggc atctcaaaca tcg	23
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	primer	
<400>	18	
agcaaattgtg	ggactccaag	20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	19	
cacattcttc	atccgcagtt	20
<210>	20	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	20	
aaaaagcagg	cttcatgaac acttttacct caaa	34
<210>	21	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	21	
agaaagctgg	gtctcacttc accgtcgggt agag	34