



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월08일  
(11) 등록번호 10-1328112  
(24) 등록일자 2013년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)  
C12N 15/82 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-0050802  
(22) 출원일자 2011년05월27일  
심사청구일자 2011년05월27일  
(65) 공개번호 10-2012-0132151  
(43) 공개일자 2012년12월05일  
(56) 선행기술조사문헌  
The Arabidopsis Information Resource (TAIR),  
AGI number At5g01520(2003.05.27.)  
J Exp Bot, 59권, 11호, 2991-3007  
쪽(2008.06.13.)

(73) 특허권자  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신  
촌동)  
(72) 발명자  
김우택  
경기도 고양시 일산구 주엽동 32 문촌마을 우성아  
파트 304-601  
유문영  
서울특별시 마포구 연남로3길 22-5, 301호 (연남  
동)  
조석근  
서울특별시 마포구 연남로3길 22-5, 301호 (연남  
동)  
(74) 대리인  
양부현

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 비생물학적 스트레스 내성 관련 유전자 및 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 식물체의 비생물학적 스트레스 내성 증진용 조성물 및 발아 촉진용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성에 관여를 하며, 이를 과발현시킨 형질전환 식물체는 가뭄 스트레스를 비롯한 각종 비생물학적 스트레스에 대한 내성이 탁월하다. 또한, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 식물체의 ABA 호르몬에 대한 민감성에 관여를 하며, 이를 발현억제시킨 식물체는 발아능이 크게 개선된다.

따라서, 본 발명의 조성물은 재배지역의 기후에 구애받지 않는 신기능 작물 또는 저장기간이 증가된 장기보관용 종자로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4d



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0000319

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견연구자지원사업(도약연구사업)

연구과제명 고등식물에서 U-box/RING E3 ubiquitin ligase 기능 분석을 통한 건조 스트레스 내성 반응

네트워크 규명 및 친환경 유용 형질전환체 개발 연구

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2011.03.01 ~ 2012.02.28

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

삭제

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

삭제

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

삭제

### 청구항 8

삭제

### 청구항 9

삭제

### 청구항 10

삭제

### 청구항 11

삭제

### 청구항 12

삭제

### 청구항 13

(a) 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제하는 핵산분자; (b) 상기 핵산분자에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 애기장대의 발아 촉진용 조성물.

## 명세서

## 기술분야

[0001] 본 발명은 비생물학적 스트레스 내성, 특히 건조 스트레스 내성에 관련된 유전자 및 이를 형질전환한 비생물학적 스트레스 내성이 증가된 식물체에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 고등식물은 이동이 불가능하기 때문에 그들의 일생동안 다양한 환경 요인들인 가뭄, 고염(high salt), 중금속, 냉해, 열충격 및 오존과 같은 스트레스에 직면하게 된다. 이러한 비생물학적 스트레스는 작물의 생장과 발달의 제한 요인이 되며 이들 스트레스 중에서 수분 부족은 작물생산 감소의 주요 원인으로 여겨지는 가장 심각한 환경 요인이다. 세계적으로 물의 소비는 계속적으로 증가되어 왔으며, 깨끗한 물의 이용가능성은 인간에게 뿐만 아니라 고등식물에게 또한 중요한 문제가 될 수 있다. 식물은 단기적 또는 장기적인 물 부족에 대해 내성을 증가시키기 위해 신호 네트워크 경로를 조절하거나 스트레스-반응성 유전자들을 유도하는 등의 다양한 방어 전략을 작동시킨다. 이러한 수분 스트레스에 대한 세포적 또는 유전적 방어 메카니즘은 널리 알려져 있다 (Shinozaki and Yamaguchi-shinozaki, 2007). 그러나 아직까지 고등식물에 있어서 스트레스에 대한 내성이나 민감성에 관여하는 스트레스-관련 유전자들의 생물학적 기능들에 대한 지식은 여전히 부족한 상태다. 그러므로 작물의 생산성을 증가시키기 위해 스트레스 반응 유전자들에 대한 기능 연구가 중요하다.

[0003] 유비퀴틴은 모든 진핵생물에서 발견되는 76개의 아미노산으로 구성된 단백질로써, E1-E2-E3(유비퀴틴 활성화, 유비퀴틴 결합, 유비퀴틴 연결효소) 연쇄 효소반응에 의해서 다양한 기질 단백질에 공유결합이 되는 특성을 가진다. 유비퀴틴이 붙게 되는 기질 단백질은 매우 다양하여 세포 내의 거의 모든 생리활동에 영향을 주며, 많은 질병이 이러한 기작과 연결되어져 있다는 연구결과들이 잘 밝혀져 있다. 유비퀴틴의 처음 알려진 기능은 다른 단백질에 결합함으로써 단백질의 분해를 촉진하는 것이었으나 최근 들어 유비퀴틴의 다른 기능들이 속속 밝혀지고 있다.

[0004] 유비퀴틴은 세 종류의 단백질, 즉 E1, E2 및 E3의 순차적인 작용에 의해 기질에 결합하게 된다. 유비퀴틴의 C 쪽 말단 도메인에 있는 글리신이 기질 단백질의 라이신의 R기에 있는 NH<sub>3</sub>에 결합함으로써 기질과 공유 결합을 형성하게 된다. 일반적으로 유비퀴틴이 붙은 단백질은 프로테아좀에 의해 분해가 된다. 이 때, 프로테아좀에 의해 분해가 되기 위해서는 유비퀴틴이 여러 개가 붙은 폴리유비퀴틴이 기질에 붙어야 한다. 현재까지는 적어도 4개의 유비퀴틴이 결합한 폴리유비퀴틴이 기질에 붙을때만 기질의 프로테아좀 의존적인 분해가 일어난다고 알려져 있으나 이것은 *in vitro* 실험결과이기 때문에 논란의 여지는 있다. 프로테아좀 의존적인 분해를 일으키는 폴리유비퀴틴결합은, 유비퀴틴의 48번째 라이신에 다른 유비퀴틴이 결합하는 형태이다.

[0005] E1 효소는 개체 내에 두 종류만이 존재한다. E2는 여러 종류가 존재하고, 일반적으로 유비퀴틴을 E1에서 E3 또는 기질로 전달해주는 역할을 한다. E3는 E3 리가아제(ligase) 효소라고도 하며, 유비퀴틴을 기질에 붙게 하는 마지막 단계의 효소이다. E3가 유비퀴티네이션이 될 기질의 특이성을 결정하게 된다. 즉, 주어진 E3 효소와 상호작용할 수 있는 기질은 특이적으로 결정되어 있다. E3 효소는 크게 2가지 형태로 나눌 수 있는데, RING 도메인을 갖는 것과 HECT 도메인을 갖는 것이 그것이다. RING 도메인을 갖는 E3 효소들은 E2와 기질이 서로 가깝게 위치하도록 도와주는 역할을 한다. 즉, E2와 기질 두 물질이 E3와 결합을 하면, E2에 있는 유비퀴틴과 기질 사이에 충분히 가까운 거리가 형성되고 이 때 화학적으로 E2에 있던 유비퀴틴이 기질로 이동을 하게 된다. 반면 HECT 도메인을 갖고 있는 E3 효소에 속하는 것들은, E2에서 유비퀴틴을 전달받은 후, 이것을 기질로 이동을 시키게 된다.

[0006] *At5g01520* 유전자는 E3 유비퀴틴 리가아제 효소 활성을 가지는 단백질을 코딩하고 있다. 유비퀴티네이션은 식물 뿐 아니라 모든 고등 생명체가 가지는 하나의 메카니즘으로써, 다양한 기능을 담당하고 있는 것으로 알려져 있으나, 비생물학적 스트레스에 관여하는 유전자는 거의 알려진 바가 없다. 본 발명자들은 애기장대의 비생물학적 스트레스 및 ABA 호르몬에 의해 발현이 유도되는 *At5g01520* 유전자를 분리획득 한 후, 이들 유전자의 과다발현 형질전환체 및 발현 억제 돌연변이체를 제작하여 이들의 생리적인 표현형을 분석하였다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문

헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 식물체의 비생물학적 스트레스 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 상술한 식물체의 형질에 관여를 하고 이들 유전자의 발현을 억제할 경우 상술한 개선된 형질을 갖는 형질전환 식물체를 수득할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 식물체의 비생물학적 스트레스 내성 증진용 조성물 및 상기 조성물로 형질전환된 비생물학적 스트레스 내성이 증진된 식물세포 또는 식물체를 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 식물체의 발아 촉진용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

### 과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물체의 비생물학적 스트레스 내성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명자들은 식물체의 비생물학적 스트레스 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 상술한 식물체의 형질에 관여를 하고 이들 유전자의 발현을 억제할 경우 상술한 개선된 형질을 갖는 형질전환 식물체를 수득할 수 있음을 확인하였다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다. 본 발명에 따르면, 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열은 애기장대의 *At5g01520* 유전자의 뉴클레오타이드 서열이며, 이 유전자의 이름은 AtAIRP2 (Arabidopsis thaliana ABA Insensitive Ring Protein 2)로 명명되었다. 상기 유전자는 E3 유비퀴틴 라이게이즈 효소 활성을 가지는 RING 단백질을 코딩하고 있으며, 본 발명자들은 상기 유전자는 다양한 비생물학적 스트레스 및 ABA호르몬에 의해서 그 유전자의 발현이 증가함을 발견하였다.
- [0015] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.
- [0016] 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈 (예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.
- [0017] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., *J.*

*Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast\\_help.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html)에서 확인할 수 있다.

- [0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 비생물학적 스트레스는 건조 스트레스, 저온 스트레스 및 염 스트레스로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0019] 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 식물체에 건조, 저온 또는 염 스트레스를 가할 경우 *At5g01520* 유전자의 발현이 증가하며, 상기 유전자의 발현을 증가시킬 경우 이러한 스트레스들에 대한 내성이 증가함을 확인하였다.
- [0020] 보다 바람직하게는, 본 발명의 비생물학적 스트레스는 건조 스트레스이다.
- [0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명에서 개사하는 뉴클레오타이드 서열; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 비생물학적 스트레스 내성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합”은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.
- [0023] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있다.
- [0024] 본 발명에 적합한 프로모터는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, SP6 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, PM 프로모터, 옥수수 유비퀴틴 프로모터, 콜리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 신타아제 (nos) 프로모터, 피그워트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤벨리나 엘로우 모틀 바이러스 프로모터, 리볼로오스-1,5-비스-포스페이트 카복실라아제 스몰 서브유닛 (ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토졸 트리오포스페이트 이소머라아제 (TPI) 프로모터, 아라비도시스 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제 (APRT) 프로모터 및 옥토판인 신타아제 프로모터를 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명에 프로모터는 CaMV 35S 프로모터이다.
- [0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열은 아그로박테리움 투메파시엔스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것 (NOS 3' end) (Bevan et al. *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385(1983)), 아그로박테리움 투메페이션스의 옥토판인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분, CaMV 35S 터미네이터 및 OCS 터미네이터(octopine synthase terminator)서열을 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명에 적합한 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-말단 폴리 A 시그널 서열은 OCS 터미네이터 서열이다.
- [0026] 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자(예: 루시퍼라아제 및  $\beta$ -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반할 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제 (예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자 (예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*npt II*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*hpt*), 등)를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물발현용 재조합벡터는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 바이너리 벡터이다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 “바이너리 벡터”는 Ti(tumor inducible) 플라스미드에서 이동에 필요한 부분인 LB(left border)와 RB(right border)를 가지는 플라스미드와 타겟 뉴클레오타이드를 옮기는데 필요한 유전자를 가진 플라스미드를 두 개로 나누어 놓은 벡터를 말한다. 본 발명의 형질전환용 아그로박테리움은 본 발명의 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적합한 것이라면 어느 것이라도 좋고, 특히 본 발명에서 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) *GV3101*이 바람직하다.

- [0029] 본 발명의 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 방법은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있으며, 예를 들면 입자 충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation), 형질감염법(transfection), 리튬아세테이트법(lithium acetate method) 및 열충격법(heat shock) 등이 있다. 바람직하게는 전기천공법을 사용한다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 조성물로 형질전환된 비생물학적 스트레스 내성이 증진된 식물세포를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 조성물로 형질전환된 비생물학적 스트레스 내성이 증진된 식물체를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 형질전환 식물세포 및 형질전환 식물체를 제조하기 위하여 당업계에 일반적으로 공지된 방법(*Methods of Enzymology*, Vol. 153, (1987))에 따라 실시될 수 있다. 외래성 폴리뉴클레오티드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물을 형질전환시킬 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며(Chilton et al. *Cell* 11:263:271(1977)), 직접 외래성 폴리뉴클레오티드를 식물 세포내로 도입시켜 식물을 형질전환시킬 수 있다(Lorz et al. *Mol. Genet.* 199:178-182;(1985)). 예를 들어, T-DNA 부위를 포함하지 않는 벡터를 이용하는 경우에는 전기천공법(electroporation), 입자충격법(microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake)을 이용할 수 있다.
- [0033] 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이 외래성 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 아그로박테리움 투메페이스언스(*Agrobacterium tumefaciens*)로 식물 세포나 종자 등을 감염시키는 방법이다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호). 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물 세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서, 용어 “식물(체)”는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.
- [0035] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는 식물체의 발아 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다.
- [0038] 본 발명에 따르면, 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열은 *At5g01520* 유전자의 뉴클레오타이드 서열이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제할 경우, 미숙발아를 억제하는 ABA 호르몬에 대한 민감성이 감소되면서 발아율이 증가된 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 핵산분자는 우수한 발아율에 기반한 장기간의 종자 저장이 가능하도록 한다.
- [0039] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 핵산 분자는 T-DNA, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 핵산 분자는 T-DNA이다.
- [0040] 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할

수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.

[0041] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음)등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 타겟 유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 짝을 이루는 데 지장이 없는 길이이면 특별히 한정되지 않는다.

[0042] 본 명세서에서 용어 “shRNA”는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드를 의미하며, *in vivo*상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루고 있다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.

[0043] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 유전자 발현을 조절하며, 전장 20-50개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 20-45개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 20-40개 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 20-30개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 21-23개의 뉴클레오타이드로 구성된 단일 가닥 RNA분자를 의미한다. miRNA는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드이며, 짧은 스템-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는 2이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며, 상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.

[0044] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 되어 있다.

[0045] 본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol. 254: pp1497-1500]). PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다. PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.

[0046] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”이란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

[0047] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄

헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-테아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.

[0048] 본 명세서에서 용어 “T-DNA”는 *Agrobacterium* 종의 Ti(tumor-inducing) 플라스미드의 전달(transfer) DNA로서 숙주 식물세포의 핵으로 전달되는 DNA 절편을 말한다. T-DNA의 양 끝 가장자리에는 25 bp의 반복서열이 존재하며, 전달은 왼쪽 경계(border)에서 전달이 시작되어 오른쪽 경계에서 종료된다. 박테리아 T-DNA는 약 20,000 bp 길이로서 이들의 삽입에 의하여 타겟 유전자를 붕괴시킴으로서 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis)를 일으키는 데에 사용되며, 삽입된 T-DNA 서열은 돌연변이를 일으킬 뿐 아니라 타겟 유전자를 표지하기도 한다. 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 Ti 플라스미드의 형질도입을 통하여 *At5g01520* 유전자가 발현 억제된 애기장대의 종자를 이용하였다.

[0049] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명에서 개시하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제하는 핵산분자; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 발아 촉진용 조성물을 제공한다.

[0050] 본 발명에서 이용되는 핵산분자, 식물발현용 재조합 벡터 및 이를 식물체에 도입하는 방법은 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

### 발명의 효과

[0051] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0052] (a) 본 발명은 식물체의 비생물학적 스트레스 내성 증진용 조성물 및 발아 촉진용 조성물을 제공한다.

[0053] (b) 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성에 관여를 하며, 이를 과발현시킨 형질전환 식물체는 가뭄 스트레스를 비롯한 각종 비생물학적 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 재배지역의 기후에 구애받지 않는 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0054] (C) 또한, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 식물체의 ABA 호르몬에 대한 민감성에 관여를 하며, 이를 발현억제시킨 식물체는 발아능이 크게 개선되어 저장기간이 증가된 신기능 식물체 및 바이오매스로 유용하게 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0055] 도 1은 다양한 비생물학적 스트레스 및 ABA 호르몬 처리 후 *AtAIRP2* 유전자의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 그림이다. ABA 호르몬(도 1a), 건조 스트레스(도 1b), 염분 스트레스(도 1c), 및 냉해 스트레스(도 1d)를 각각 처리한 후 각각의 RNA를 분리하여 그 유전자의 발현 패턴을 확인하였다. 건조, 염분 및 Cold 처리의 대표적인 컨트롤 유전자로 RD29A를 사용하였고, ABA 처리구에서는RAB18 유전자를 사용하였다.

도 2는 조직 염색화학 GUS 분석으로 *AtAIRP2* 유전자의 프로모터 활성을 분석한 결과를 나타낸 그림이다. 100  $\mu$ M ABA를 3시간 처리하거나 건조 스트레스를 2시간 동안 주었을 경우 GUS 신호가 강하게 나오며 이는 *AtAIRP2* 프로모터의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있다.

도 3은 *AtAIRP2* 단백질의 효소 활성을 분석한 결과를 나타낸 그림이다. *AtAIRP2* 단백질들에 MBP(maltose binding protein)를 붙인 다음 오토-유비퀴티네이션을 수행한 것으로, HIS-UBA1, HIS-UBC8, 유비퀴틴 및 MBP-*AtAIRP2*를 1시간 동안 30℃에서 배양 후 단백질 변화를 확인하기 위해서 MBP 및 유비퀴틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 실시하였다. *AtAIRP2* 단백질의 분자량이 증가됨을 MBP 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 통해 알 수 있었고, 이들의 증가가 유비퀴틴에 의한 것인지를 확인하기 위해 유비퀴틴 항체를 사용하였다. 이 결과, *AtAIRP2* 단백질은 유비퀴틴 단백질을 붙여주는 E3 유비퀴틴 라이게이즈의 효소활성 능력을 가짐을 알 수 있었다.

도 4는 *AtAIRP2* 유전자 돌연변이체 및 이의 건조스트레스 저항성을 측정한 결과를 나타낸 그림이다. 도 4a는 *AtAIRP2* 유전자의 genomic DNA에 T-DNA가 삽입된 지도를 나타낸 그림이며, T-DNA가 유전자의 엑손(*atairp2-1*) 및 인트론(*atairp2-2*)에 삽입된 위치를 보여준다. 도 4b는 이들 돌연변이체의 지놈 DNA를 추출하여 이 유전자와 T-DNA 부근의 프라이머를 이용하여 PCR의 방법으로 T-DNA가 삽입되었음을 보여준다. 도 4c는 돌연변이체의 RNA를 추출하여 RT-PCR의 방법으로 유전자의 발현을 조사한 결과를 나타낸 그림이다. 이들 결과를 토대로 *atairp2* 돌연변이체는 해당 유전자의 발현이 억제됨을 알 수 있었다. 도 4d는 *AtAIRP2* 유전자의 돌연변이체와 야생형 애기장대의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 비교한 그림이다. 2주 동안 키운 각각의 식물체에 13일 동안 물을 주지 않고 가뭄 스트레스를 가한 후, 물을 충분히 주고 살아난 개체 수를 비교하였다. 그 결과 돌연변이체가 야생형에 비해서 가뭄 스트레스에 대해 낮은 저항성을 보였다.

도 5는 *AtAIRP2* 유전자의 과다발현 형질전환체에 관한 그림이다. *35S:AtAIRP2-GFP* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대를 제작하여 GFP 항체를 이용하여 과다발현 여부를 확인하였다(도 5a). 웨스턴 블롯팅 결과 *AtAIRP2-sGFP* 단백질이 잘 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 도 5b는 *AtAIRP2* 유전자의 과다발현 형질전환체와 야생형 애기장대의 건조 스트레스에 대한 저항성을 비교한 그림이다. 2주 동안 키운 각각의 식물체에 14일 동안 물을 주지 않고 건조 스트레스를 처리한 후, 다시 물을 충분히 주고 살아난 개체 수를 비교하였다. 그 결과 과다발현 형질전환체가 야생형에 비해 건조 스트레스에 대해 저항성이 높은 것을 알 수 있었다.

도 6은 *AtAIRP2* 유전자의 돌연변이체 및 과다발현 형질전환체의 ABA호르몬에 관한 종자의 발아 분석결과를 나타낸 그림이다. 도 6a는 ABA 호르몬을 각각 0.1, 0.5  $\mu$ M의 농도로 처리된 배지에 야생형, *atairp2-1* 및 *atairp2-2* 돌연변이체를 심은 후 7일 후에 찍은 사진이다. 돌연변이 식물체의 경우 야생형에 비해 ABA가 포함된 배지에서 발아가 잘 되는 것을 알 수 있었다. 도 6b는 ABA 호르몬을 각각 0.2, 0.4  $\mu$ M의 농도로 처리된 배지에 야생형, *atairp2-2* 및 *AtAIRP2-sGFP* 과다발현 형질전환 식물체를 심고 7일 후에 사진을 찍은 것이다. *AtAIRP2* 유전자의 과다발현 형질전환 식물체의 경우 ABA호르몬이 들어간 배지에서 발아가 현저히 저해되는 것을 알 수 있었고, 또한 *atairp2-2* 돌연변이체는 같은 조건에서 저항성을 보임을 알 수 있었다. 따라서 ABA호르몬에 의해 과다발현 형질전환체는 발아율이 떨어지며, 돌연변이체는 발아율이 증가된 것을 알 수 있었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0057] 실시예

[0058] 실험방법

[0059] 유전자의 분리 획득

[0060] 본 발명자들은 ABA 호르몬 및 비생물학적 스트레스에 의해서 유도되는 *AtAIRP2* 유전자를 애기장대의 cDNA로부터 분리 획득하였다. 10일된 야생형 애기장대의 유향을 액체 질소를 사용하여 막자 사발에서 갈아 분말로 만든 다음 1 g 당 2 ml 의 추출 완충액(4 M 구아니딘-HCl 20 mM, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA(USB), 0.5% 사르코실(SIGMA, pH 9)과  $\beta$ -머캅토에탄올(SIGMA-ALDRICH)을 이용하여 추출한 후 코니칼 튜브로 옮긴 다음 이를 동량의 PCI(페놀 : 클로로포름 : 이소아밀알콜 = 25 : 24 : 1)와 혼합하여 5분간 흔들어 준 다음 3,500 rpm에서 25분간 원심분리(한일 원심분리기, HA-1000-3)하였다. 원심분리 후 상층의 유기 용매층을 제거하고, 동량의 PCI를 혼합하여 흔든 다음 원심분리하는 과정을 2회 반복하여 수행하고, 이때 형성된 아래의 수용액 층을 2회 에탄올 침전 및 1회 LiCl 침전 방법을 사용하여 RNA를 분리하였다. 정량을 통해 2  $\mu$ g 의 RNA를 올리고 dT 프라이머와 MMLV 역전사효소(Fermentas)를 이용하여 단일가닥 cDNA를 합성하였다. PCR 수행을 위해 주형으로 20 ng의 cDNA를 사용하였으며 두 종류의 프라이머를 각각 10 pmole 씩, 10 x Taq 폴리머라제 완충용액(Takara) 5  $\mu$ l, dNTP 혼합액(각 1.25 mM) 8  $\mu$ l 및 1 유닛의 Taq DNA 폴리머라제(Takara)를 넣어 총 부피를 50  $\mu$ l 로 만들었다. Perkin Elmer DNA 썬더 사이클러로 PCR을 수행하였다. 사용한 프라이머는 5'-ATGCGAAATCGTTCAGGA-3'(AtAIRP2 ORF FW: 서열목록 제3서열) 및 5'-TCACCGAGGAAGAGGAGCATAA-3'(AtAIRP2 ORF RV: 서열목록 제4서열)이다. 먼저 94℃에서 2분간 변성시킨 후, 94℃에서 30초, 52℃에서 30초, 72℃에서 1분을 반복하는 것을 30회 수행하였고, 30회 반복이 끝난 후 72℃에서 5분간 추가로 중합반응을 수행한 다음 전기영동 방법을 이용하여

AtAIRP2 유전자의 증폭을 확인하였으며, 상기 DNA를 시퀀싱하여 다시 한번 확인하였다.

[0061] 식물 성장조건 및 시료 채취

[0062] AtAIRP2 유전자의 과다발현 형질전환체 제작을 위하여 Invitrogen gateway 시스템을 이용하여 컨스트럭션을 하였다. 먼저 pENTR SD Topo 벡터(Invitrogen, USA)에 AtAIRP1-sGFP를 넣어준 후, LR clonase 효소(Invitrogen)를 이용하여 식물체의 pEarlygate 100 벡터(Arabidopsis research center, USA)에 치환시켰다. AtAIRP2 발현억제 돌연변이 식물체는 AtAIRP2의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 애기장대의 종자(종자번호: SAIL\_686\_G08(atairp2-1), Salk\_005082(atairp2-2))를 SIGNAL Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/>)에서 구입하였다.

[0063] 이러한 AtAIRP2 유전자의 과다발현 형질전환체, AtAIRP2 유전자가 파괴된 돌연변이체 및 야생형 애기장대 종자를 30% 락스(유한-크로락스)와 0.025%의 트리톤 X-100에 10분간 살균 처리한 후 물로 10번 이상 세척하였다. 처리된 종자는 3% 수크로스, B5 비타민 (12 mg/L), 0.8% 아가로 구성되어있는 MS 배지(Duchedfa Biochemie)에 수직으로 심은 후 약 2주간 생장 챔버(16시간 광 조건/ 8시간 암 조건)에서 키운 식물을 재료로 하여 수행하였다. 빛 조건의 전체 식물체(Green whole plant)를 재료로 사용한 경우는 종자를 Sunshine MIX #5 (Sun GroHorticulture) 흙을 넣어 준 화분에 심어서 약 3주간 생장 챔버(16시간 광 조건/8시간 암 조건)에서 성장시킨 식물을 재료로 하여 수행하였다.

[0064] 스트레스(염, 저온, 건조, ABA 호르몬) 처리

[0065] 스트레스에 대한 AtAIRP2 유전자의 발현을 확인하기 위해, 건조 스트레스는 배지에서 2주간 키운 야생형 애기장대 유묘를 공기 중에 노출한 후 1시간 및 2시간 후에 샘플링하였다. 염 스트레스는 2주간 키운 애기장대에 300 mM의 염화나트륨을 처리한 후 1.5시간, 3시간이 경과한 후 샘플링하였다. 저온 스트레스는 배지에서 2주간 키운 애기장대 유묘를 4℃가 유지되는 인큐베이터에서 12시간 및 24시간 동안 배양하고 조직을 샘플링하였다. ABA 호르몬 처리는 2주간 키운 애기장대 유묘를 100 μM의 ABA(SIGMA)를 처리한 후 1.5시간 및 3시간이 경과한 후 샘플링 하였다. 샘플링 된 조직을 액체 질소를 사용하여 막자 사발에서 갈아 가루로 만든 다음 1 g 당 2 ml의 추출 완충액(4 M 구아니딘-HCl 20 mM, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA(USB), 0.5% 사르코실(SIGMA), pH 9)과 β-머캅토에탄올(SIGMA-ALDRICH)을 이용하여 추출한 후 코니칼 튜브로 옮긴 다음 이를 동량의 PCI(페놀 : 클로로포름 : 이소아밀알콜 = 25 : 24 : 1)와 혼합하여 5분간 흔들어 준 다음 3,500 rpm에서 25분간 원심분리(한일 원심분리기, HA-1000-3)하였다. 원심분리 후 상층의 유기 용매층을 제거하고, 동량의 PCI를 혼합하여 흔든 다음 원심분리하는 과정을 2회 반복하여 수행하고, 이때 형성된 아래의 수용액 층을 2회 에탄올 침전 및 1회 LiCl 침전 방법을 사용하여 RNA를 분리하였다.

[0066] 정량적 역전사효소(RT)-PCR

[0067] 발현억제 돌연변이 식물체 및 과발현 형질전환 식물체와 야생종의 잎으로부터 전체 RNA를 추출하여 올리고 dT 프라이머와 MMLV 역전사효소(Fermentas)를 이용하여 단일가닥 cDNA를 합성하였다. PCR 수행을 위해 주형으로 20 ng의 cDNA를 사용하였으며 두 종류의 프라이머를 각각 10 pmole 씩, 10 x Taq 폴리머라제 완충용액(Intron) 5 μl, dNTP 혼합액(각 1.25 mM) 8 μl 및 1 유닛의 Taq DNA 폴리머라제(intron)를 넣어 총 부피를 50 μl 로 만들었다. Perkin Elmer DNA 썬더 사이클러로 PCR을 수행하였다. 먼저 94℃에서 2분간 변성시킨 후, 94℃에서 30초, 52℃에서 30초, 72℃에서 1분을 반복하는 것을 25회 수행하였고, 25회 반복이 끝난 후 72℃에서 5분간 추가로 중합반응을 수행한 다음 -20℃에 냉동 보관하였다. 사용된 유전자의 프라이머는 아래의 표 1과 같다.

표 1

[0068] RT-PCR에 사용된 유전자의 프라이머

| 프라이머                     | 서열                           |
|--------------------------|------------------------------|
| AtAIRP2 RT FW(서열목록 제5서열) | 5'-GATGGTGGCTACGTTCAGA-3'    |
| AtAIRP2 RT RV(서열목록 제6서열) | 5'-AAATGTCAATAACCAATGGTTG-3' |

|                      |                            |
|----------------------|----------------------------|
| Rab18 FW(서열목록 제7서열)  | 5'-GCGTCTTACCAGAACCGTCC-3' |
| Rab18 RV(서열목록 제8서열)  | 5'-CCCTTCTTCTCGTGGTGC-3'   |
| RD29a FW(서열목록 제9서열)  | 5'-CAGGTGAATCAGGAGTTGTT-3' |
| RD29a RV(서열목록 제10서열) | 5'-CCGGAATTTATCCTCTTCT-3'  |
| UBC10 FW(서열목록 제11서열) | 5'-TGGATATGGCGTCGAAGC-3'   |
| UBC10 RV(서열목록 제12서열) | 5'-GTGGGATTTCCATTAGCC-3'   |

[0069] T-DNA가 삽입된 돌연변이체의 지놈 DNA 추출 및 동형접합 돌연변이체 획득

[0070] 야생형 및 발현억제 돌연변이 애기장대의 종자를 흡에 심어 2주 동안 키운 뒤 각각의 잎을 샘플링한 후 액체질소를 이용하여 간 후 CTAB 완충액(2 % CTAB, 100 mM Tris pH 8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2 % PVP) 700 ml를 넣고 혼합하고 65℃에서 10분 동안 가열하였다. 클로로포름 200 ml를 넣고 혼합한 후 원심분리를 통해 상층액을 얻어내고 이소프로판올을 섞어 DNA를 침전시켰다. 원심분리 후 얻어진 침전물을 70% 에탄올로 세척한 뒤 말려서 얻어진 지놈 DNA를 물로 녹여서 사용하였다. 이후 T-DNA 보더 프라이머(boder primer)(LB\_6313R)와 T-DNA가 삽입된 부위의 앞, 뒤 부분의 프라이머를 이용하여 지노타이핑 PCR을 진행하였다.

## 표 2

[0071] 지노타이핑 PCR 및 RT-PCR에 사용된 프라이머

| 프라이머                     | 서열                              |
|--------------------------|---------------------------------|
| LB_6313R (서열목록 제13서열)    | 5'-GAGCTGCTATACACTGATCTGAG -3'  |
| AtAIRP2 FW1 (서열목록 제14서열) | 5'-CGTGTGCTCTACGCGAATC-3'       |
| AtAIRP2 RV1 (서열목록 제15서열) | 5'-CCCTTAATCAGCAAATATGATATCG-3' |

[0072] AtAIRP2 유전자의 발현억제 돌연변이체에 있어서 T-DNA가 두 번째 엑손 및 첫번째 인트론에 삽입된 것을 알 수 있었고, T-DNA가 삽입된 지역의 앞, 뒤 부분 및 T-DNA의 보더 프라이머를 이용하여 PCR의 방법으로 T-DNA가 삽입됨을 보여준다(도 4b). 또한 발현억제 돌연변이체의 RNA를 추출하여 RT-PCR의 방법으로 AtAIRP2 FW1 및 AtAIRP2 RV1 프라이머를 이용하여 유전자의 발현이 억제된 것을 알 수 있었다(도 4c).

[0073] AtAIRP2 유전자의 벡터 구축물의 제조

[0074] 말토오스에 결합하는 단백질과 AtAIRP2를 융합시켜 발현시킬 플라스미드를 재조합하기 위해 AtAIRP2의 코딩 부분의 5' 및 3'쪽에 각각 XbaI과 PstI제한효소에 해당하는 서열을 연결한 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 결과물과 pMAL-X 벡터(New England Biolabs, Beverly,MA)를 XbaI 및 PstI 제한효소로 자른 다음 T4 DNA 라이가제(New England Bio Lab) 효소를 이용하여 라이게이션(ligation) 하였다. 재조합된 MBP-AtAIRP2을 대장균 BL21-CodonPlus(DE3) RIL(스트라테이진)에 발현시킨 후, 아밀로즈 컬럼 크로마토그래피를 이용해 정제하였다. 단백질은 표준 단백질로 BSA를 이용해 정량하였다. 또한, 본 발명에서는 형질전환체 제작을 위하여 Invitrogen gateway 시스템을 이용하여 컨스트럭션을 하였다. 먼저 pENTR SD topo 벡터(Invitrogen, USA)에 AtAIRP2-sGFP를 넣어준 후, LR clonase 효소(Invitrogen)를 이용하여 식물체의 pEarlygate 100 벡터(Arabidopsis research center, USA)에 치환시켰다.

[0075] 아그로박테리움으로 AtAIR2 형질전환 및 형질전환 애기장대 식물체의 제조

[0076] 제작된 구축물은 아그로박테리움(GV3101)에 전기천공법을 이용하여 형질전환 하였으며 유전자의 존재 유무는 PCR을 이용하여 확인하였다. 약 4 주된 애기장대(columbia [Col-0])의 지상 부위를 0.05 % 실웨트가 포함된 MS 배지(Duchefa Biochemie)에 1분 30초간 담구는 방법으로 형질전환 시켰다(clough and Bent, 1998, Plant J 16; 735-743). 약 3주간 23℃의 생장 챔버에서 배양하고, 종자를 받은 후(T1), 25 µg/ml의 바스타(Glufosinate ammonium)와 250 µg/ml의 카르베니실린이 포함된 배지에서 살아남는 개체들을 골라 형질전환 유전자의 존재 여부를 RT-PCR 및 웨스턴 블롯을 통해 검증하였다. 과다발현은 항-GFP (clontech) 항체를 이용해 관찰하였다.

- [0077] *AtAIRP2* 단백질의 효소활성 분석
- [0078] 본 발명에서는 *AtAIRP2* 단백질의 효소활성 분석을 위해, pMAL-X 벡터에 *AtAIRP2* 유전자의 ORF를 MBP(maltose binding protein) 프레임에 맞게 서브클로닝을 수행하였다. 40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM ATP, 2mM 디티오프레이톨(DTT), 300 ng/ $\mu$ l 유비퀴틴(Sigma), 25  $\mu$ M MG132(A.G. Scientific Inc.), 500 ng UBA1(ABRC, <http://www.arabidopsis.org>), 500 ng UBC8(ABRC, <http://www.arabidopsis.org>), MBP-*AtAIRP2* 500 ng을 각각의 튜브에 넣어준 후 30℃ 배양기에서 배양하였다. 샘플 완충용액을 넣어준 다음 100℃에서 5분간 끓이고 항-MBP(New England Bio Labs), 항-유비퀴틴(Santa Cruz) 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.
- [0079] 식물체 생장 비교
- [0080] ABA 호르몬에 대한 표현형을 비교하기 위해서 야생형, *AtAIRP2* 발현억제 돌연변이 식물체, *AtAIRP2* 과다발현 식물체에서 얻어진 종자를 ABA 호르몬이 0, 0.1, 0.2, 0.4 및 0.5  $\mu$ M 로 첨가된 배지에서 7일 동안 키운 후 발아된 정도를 비교하였다. 염분에 대한 표현형을 비교하기 위해서 야생형, *AtAIRP2* 발현억제 돌연변이 식물체, *AtAIRP2* 과다발현 식물체에서 얻어진 종자를 염화나트륨이 0, 75, 100 및 125 mM 로 첨가된 배지에서 7일 동안 키운 후 발아된 정도를 비교하였다.
- [0081] 성체 식물의 건조 스트레스에 대한 민감도 측정
- [0082] 야생형 및 *AtAIRP2* 발현억제 돌연변이 식물체, 과다발현 식물체의 종자를 흙에서 2주 동안 키운 뒤, 각각 13일 또는 14일 동안 물을 주지 않다가 다시 물을 준 후 건조 스트레스에 내성을 갖는 정도를 측정하였다.
- [0083] 조직 염색화학 GUS 분석 (Histochemical GUS assay)
- [0084] 10일 동안 배지에서 키운 야생형 애기장대를 100mM ABA 및 가뭄 스트레스를 각각 3시간 또는 2시간 동안 처리한 뒤 90% 아세톤으로 5분간 고정시켰다. 아세톤을 제거한 후, 50mM NaPO<sub>4</sub>, 1mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 1mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>가 첨가된 Rincing solution으로 3회 워싱하였다. 워싱이 끝나면 행굼액(Rincing solution)에 2mM X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide, sigma)이 포함된 용액으로 교환해주고 1분간 버큘을 처리하였다. 37℃에서 암상태로 색이 변할 때까지 염색한 후, 90% 에탄올로 클로로필을 제거해주었다.
- [0085] 실험결과
- [0086] 스트레스(염, 저온, 건조) 처리시 *AtAIRP2*의 발현양상
- [0087] 다양한 비생물학적 스트레스에서 *AtAIRP2* 유전자의 발현을 RT-PCR로 확인하였다. 저온(12시간, 24시간) 및 건조 스트레스(1시간, 2시간), 300 mM 농도의 소금물을 1.5 시간 및 3시간 처리한 후, 100  $\mu$ M ABA 호르몬을 1.5 시간 및 3시간 처리한 후 각각의 RNA를 뽑아서 그 유전자의 발현 패턴을 확인한 결과 각각의 스트레스 및 호르몬을 처리하지 않았을 때보다 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였으며, 이에 *AtAIRP2* 유전자는 저온, 건조, 염분 스트레스 및 ABA 호르몬에 의해서 발현이 유도됨을 확인하였다(도 1). 또한 조직염색 화학 GUS 분석을 수행하여 ABA 호르몬 및 건조 스트레스를 각각 3시간 2시간 처리한 후 염색이 된 정도를 확인한 결과 스트레스를 처리하기 전 보다 잎과 뿌리 조직에서 염색 정도가 진해진 것을 알 수 있었다(도 2).
- [0088] *AtAIRP2* 단백질의 효소활성 분석
- [0089] *AtAIRP2* 단백질들에 MBP(maltose binding protein)를 붙인 다음 셀프-유비퀴티네이션을 수행하기 위하여 UBA1, UBC8, 유비퀴틴, *AtAIRP2*를 1시간 동안 30℃에서 배양 후 단백질 변화를 확인하기 위해서 MBP 및 유비퀴틴의 특이적인 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 실시하였다. MBP 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 통해 *AtAIRP2* 단백질의 분자량이 증가한다는 사실을 확인하였고, 유비퀴틴 항체를 이용하여 이들의 증가가 유비퀴틴에 의한 것임을 확인하였다(도 3). 이 결과를 토대로 *AtAIRP2* 단백질은 유비퀴틴 단백질을 붙여주는 리가아제

의 효소활성 능력을 가짐을 알 수 있었다.

[0090] *atairp2* 돌연변이체 확보

[0091] 도 4a에서 보는 바와 같이, 돌연변이체의 제작을 위하여 T-DNA가 두 번째 엑손 및 첫 번째 인트론에 삽입된 구조의 유전자를 이용하였다. 삽입 여부 및 위치를 확인하기 위하여 T-DNA의 보더 프라이머와 T-DNA가 삽입된 부분의 좌우의 프라이머를 이용하여 지노타이핑 PCR을 수행한 결과 T-DNA가 유전자 진행방향과 동일한 방향으로 삽입된 것을 확인하였다(도 4b). 또한 돌연변이체에서 전체 길이의 AtAIRP2 유전자의 mRNA의 발현 유무를 알아보기 위해서 지노타이핑 PCR에서 사용한 동일한 유전자 프라이머를 이용하였고, 그 결과 AtAIRP2 유전자가 발현되지 않는다는 사실을 확인하였다(도 4c).

[0092] 성체 식물의 건조 스트레스에 대한 민감도 측정

[0093] AtAIRP2 유전자의 발현억제 돌연변이체와 야생형 애기장대의 건조 스트레스에 대한 저항성을 측정하기 위하여 2주 동안 키운 각각의 식물체에 13일 동안 물을 주지 않고 건조 스트레스를 가한 후, 물을 충분히 주고 살아난 개체 수를 비교하였다. 그 결과 야생형 식물체의 경우 85%가 생존해 있는 반면 발현억제 돌연변이체는 각각 25%, 35% 만이 생존해 있어 돌연변이 식물체가 야생형에 비해 건조스트레스에 대한 저항성이 낮은 것을 알 수 있었다(도 4d). AtAIRP2 유전자의 과다발현 형질전환체의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 알아보기 위해 바스타 선별(Basta selection)을 통해 얻어진 각각의 형질전환체의 동형접합(homozygous) 식물체를 확보하였다. 여기서 얻어진 종자를 배지에 심어 GFP 항체를 이용하여 #10 및 #19형질전환체에서 단백질이 잘 만들어짐을 웨스턴 블롯으로 확인하였다(도 5a). AtAIRP2 유전자의 과다발현 형질전환체와 야생형 애기장대 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 비교하기 위하여 2주 동안 키운 각각의 식물체에 41일 동안 물을 주지 않고 가뭄 스트레스를 가한 후, 물을 충분히 주고 살아난 개체 수를 비교하였다. 야생형의 경우 10%, AtAIRP2 과다발현 식물체인 #10은 87.5%, #19은 84.2% 살아난 것을 알 수 있었다. 따라서 과다발현 형질전환체가 야생형 식물체들에 비해서 가뭄 스트레스에 대해 저항성이 높다는 것을 알 수 있었다(도 5b).

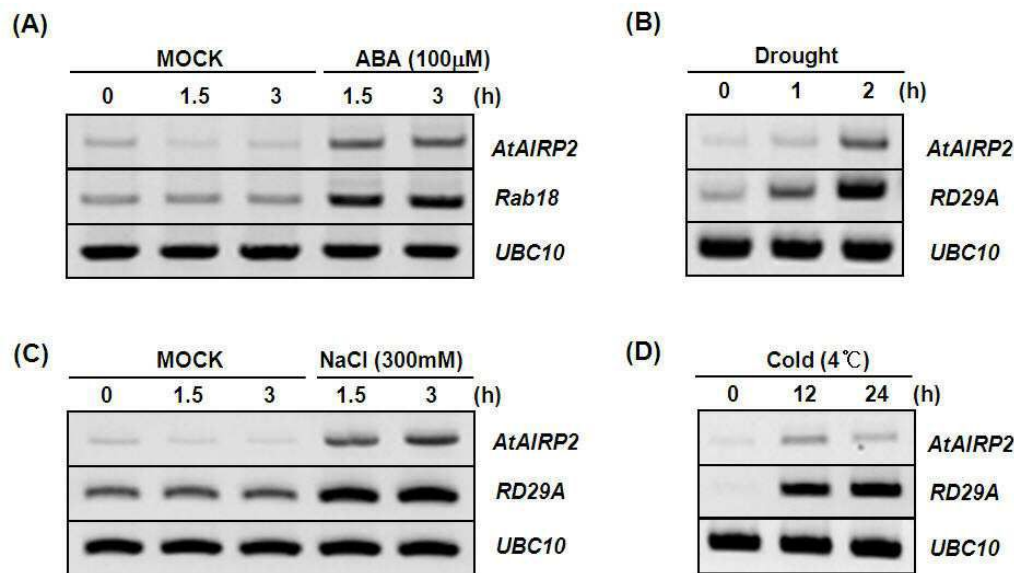
[0094] 식물체 발아율 비교

[0095] ABA 호르몬을 각각 0, 0.1, 0.5  $\mu\text{M}$  의 농도로 처리된 배지에 야생형, *atairp2* 돌연변이체를 심은 후 7일 동안 키운 후 발아된 정도를 비교해 본 결과, 해당 유전자의 돌연변이체는 같은 조건에서 저항성을 보임을 알 수 있었다(도 6a). 야생형 애기장대와 AtAIRP2 유전자의 발현억제 돌연변이 및 과다발현 형질전환 식물체를 ABA 호르몬이 각각 0, 0.2, 0.4  $\mu\text{M}$  의 농도로 처리된 배지에서 발아 테스트를 한 결과, ABA호르몬에 의해 AtAIRP2-sGFP 과다발현 형질전환 식물체는 발아율이 떨어지며, 발현억제 돌연변이체는 발아율이 증가된 것을 알 수 있었다(도 6b).

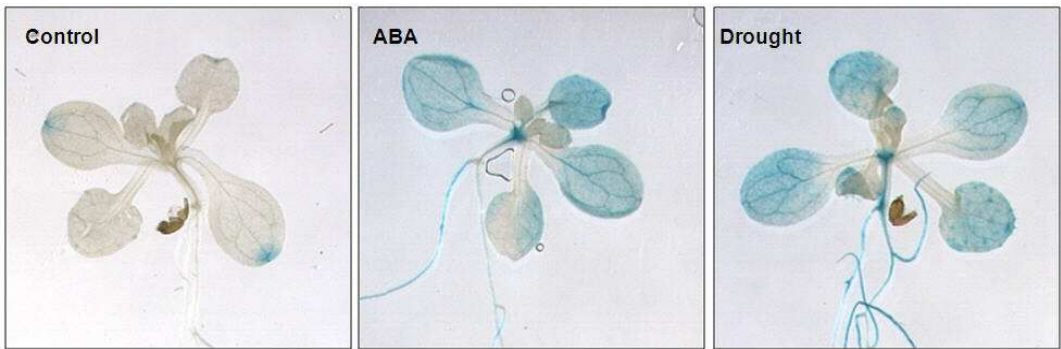
[0096] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

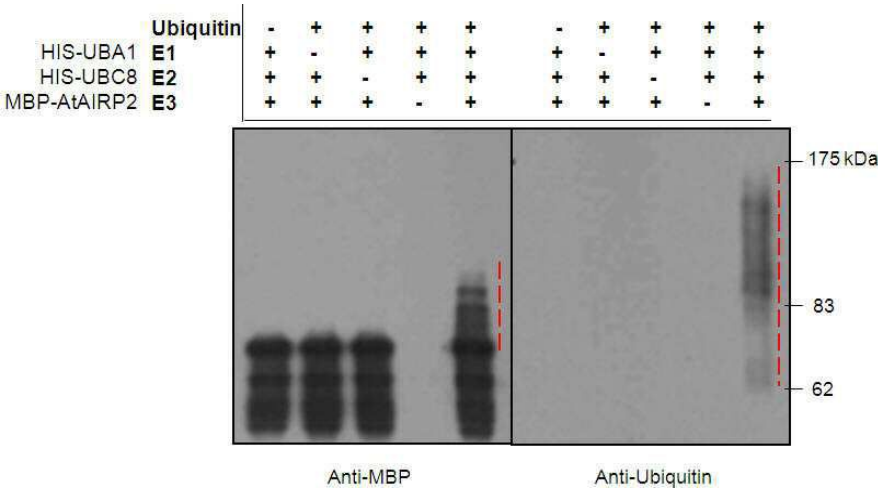
도면1



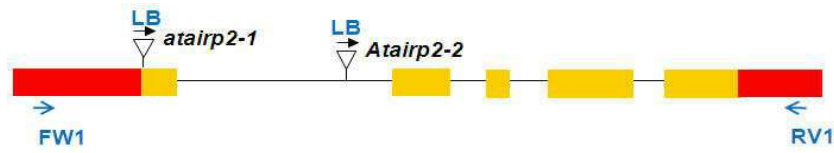
도면2



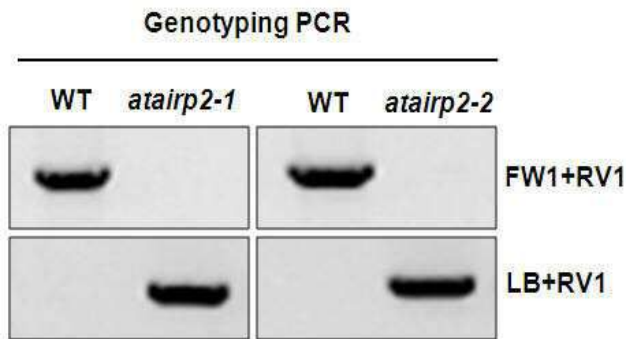
도면3



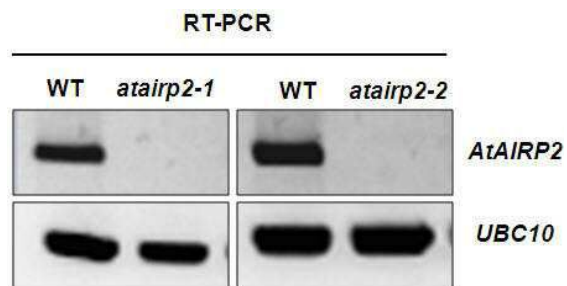
도면4a



도면4b



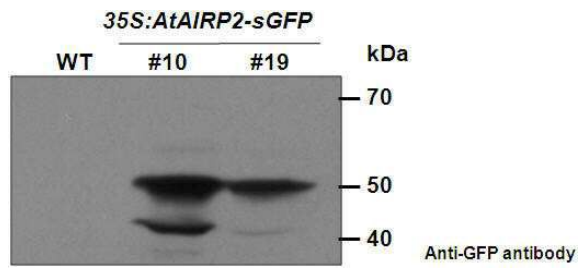
도면4c



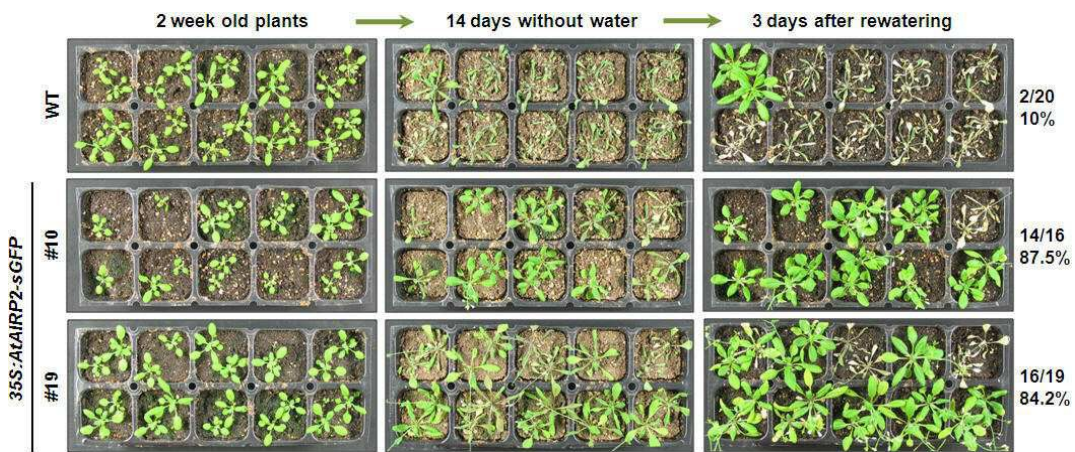
도면4d



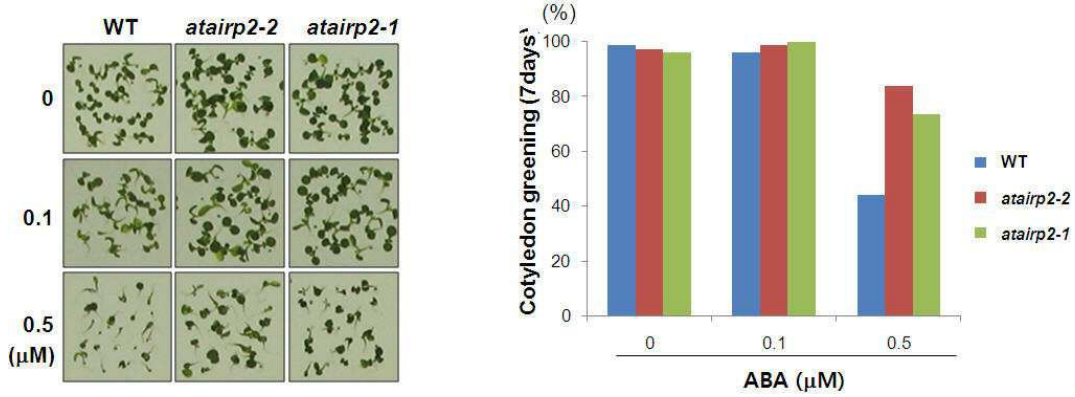
도면5a



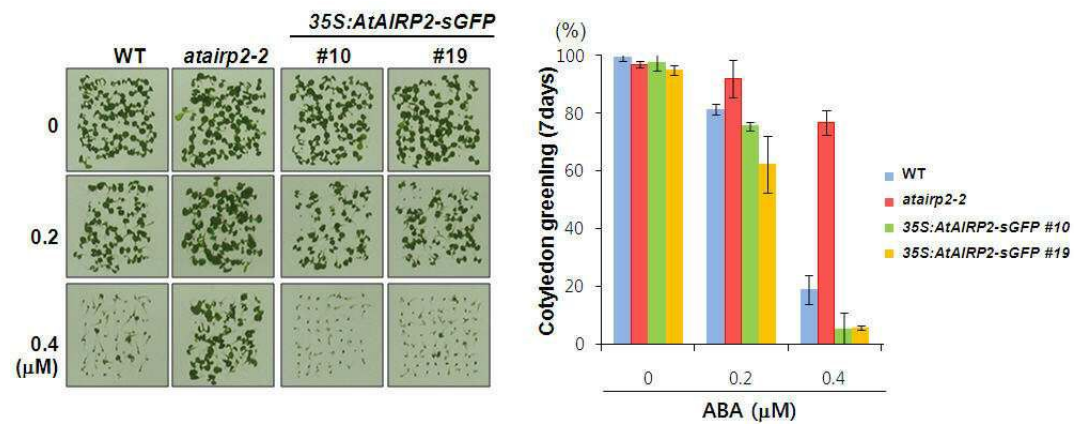
도면5b



도면6a



## 도면6b



## 서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)