(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0041347
(43) 공개일자 2022년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 1/06 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01H 1/06 (2021.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0124428
(22) 출원일자 2020년09월25일
심사청구일자 2020년09월25일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이상열
경상남도 진주시 진주역로96번길 15, 102동 3003호(포레나신진주아파트, 가좌동)
이은선
경상남도 진주시 내동로348번길 10, 가좌그린빌 102동 704호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

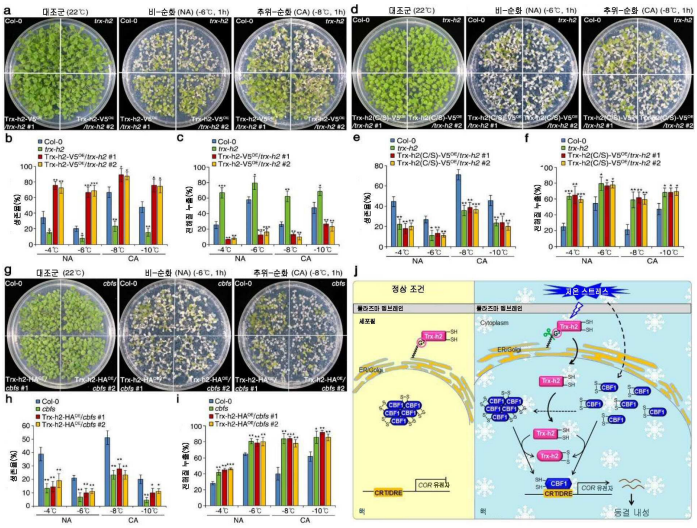
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체**

(57) 요 약

본 발명은 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 저온 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 추위 응답 전사인자인 C-반복 결합인자 1(CBF 1)과 상호 활성 파트너인 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12N 15/8205 (2013.01)
C12N 15/8273 (2013.01)
(72) 발명자
박정훈
경상남도 진주시 내동로348번길 10, 가좌그린빌 102동 704호
위성동
경상남도 진주시 가좌길40번길 8, 행복빌 501호
강창호
경상남도 사천시 곤명면 만지2길 20-12
채호병
경상남도 진주시 순환로 503, 라온프라이빗시티럭스 416호
팽슬기
경상남도 진주시 진주대로500번길 8, 204호
배수빈
경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 들말대경아파트 104동 1305호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345312270
과제번호 2019R1I1A1A01040920
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 기후변화대응을 위한 AtR356의 분자샤페론 기능 활용 기술개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345312132
과제번호 2018R1A6A3A11048274
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 식물체 산화-환원 조절 단백질의 냉해 스트레스 저항성 기전 규명
기 여 율 1/3
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395063006
과제번호 PJ013173012020
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명 시스템생물학 기반 유용신소재 생산을 위한 소포체스트레스 방어기전 연구
기 여 율 1/3
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체에 있어서, 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지니는 C-반복 결합인자 1(CBF 1)과 상호 작용하여 CBF 1을 0~10 ℃의 저온에서 고분자량의 올리고머로부터 저분자량의 모노머로 해리 전환시켜 형질전환 식물체에게 저온 저항성을 부여함을 특징으로 하는 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 2번째 아미노산 잔기인 글리신에 의해 세포질에 미리스토일화 되어 있으나 0~10 ℃의 저온에서 세포질로부터 탈미리스토일화 되어 Trx-h2 단백질이 핵으로 트랜스로케이션 되어 CBF 1과 상호 작용하여 CBF 1의 구조적 전환을 야기시켜 식물체에 저온 저항성을 부여함을 특징으로 하는 추위 저항성 형질전환 식물체.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 31번째 잔기로부터 133번 잔기 까지 122개의 아미노산을 지닌 잘 보존된 Trx 모티프를 지니며 Trx 모티프 내의 59번째 및 62번째 잔기인 시스테인이 CBF 1과 상호 작용함을 특징으로 하는 추위 저항성 형질전환 식물체.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 C-반복 결합인자 1(CBF 1) 내의 23번, 30번, 100번, 117번 및 137번째 보존된 잔기인 시스테인이 티오레독신 Trx-h2 단백질과 상호 작용함을 특징으로 하는 추위 저항성 형질전환 식물체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 추위 응답 전사인자인 C-반복 결합인자 1(CBF 1)과 상호 활성 파트너인 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 저온 스트레스는 식물 재배 및 성장에 치명적인 영향을 미치며 농업 작물의 생산성을 제한한다. 저온에 대처하고 동결 내성을 수득하기 위해 식물은 '저온 순응(cold acclimation)'이라는 메커니즘을 작동시켜 동결되지 않은 온도에 노출되었을 때 세포 대사의 대규모 재프로그래밍 및 조직 구조의 재구성을 경험 하게 된다. Apetala2/에틸렌 반응 인자 패밀리에 속하는 전사인자인 C-반복 결합 인자(CBF)를 암호화시킨 유전자는 저온 순응에서 가장 중요한 역할을 하게 된다.

[0005] 그러나 CBF 유전자 발현은 저온 신호전달 인자 뿐만 아니라 다양한 식물 호르몬에 의해서도 조절된다. 따라서

CBF는 저온- 및 호르몬- 신호전달 경로 사이의 엇갈린 중심 교차점을 나타낸다. 이는 CBF가 식물 성장 조절 및 저온 스트레스로부터 식물체를 보호하는 다양한 기능을 지니고 있음을 시사한다.

[0007] 비정상적인 CBF의 과발현은 식물체의 동결 내성을 강하게 하지만 식물 성장에 해롭다. 더욱이 *cbf1-3* 삼중 넉아웃 변이 식물체(이하 cbfs로 지칭됨)는 동결에 매우 민감한 것으로 나타나지만 주위 온도 하에서 종자 발아, 초기 발달 및 스트레스에 대해서는 낮은 민감도를 나타낸다. 이러한 데이터는 따뜻한 조건하에서 CBF 발현의 결정적인 임계값이 필요함을 시사한다.

[0009] 결과적으로 상이한 온도 하에서 CBF 활성의 정확한 제어는 식물이 정상적인 생장 및 내한성을 유지하는 데 중요하다. 저온 조건에서 CBFs 발현의 전사 제어에 대한 광범위한 연구에도 불구하고 그들의 활동 조절의 많은 측면은 애매하게 남아 있다.

[0011] CBF 활성이 어떻게 조절되는지 이해하기 위해, 저온 처리 유무에 관계없이 야생형(에코 타입, Col-0) 아라비돕시스에서 CBF(CBF1-3)의 발현 수준과 단백질 구조를 조사하였다(도 1a). Col-0 식물로부터 추출된 총 단백질을 환원 및 비환원 SDS-PAGE 겔 상에서 분리하고 실험실에서 제조된 항-CBF 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 처리하였다. 따뜻한 조건(22 ℃) 하의 식물에서는 약간의 CBF가 있었으며, 저온(4 ℃) 노출 기간에 따라 증가된 단백질 양이 환원되는 것이 겔에 의해 측정되었다(도 1a; 하부 패널).

[0013] 그러나 비-환원성 겔상의 단백질은 CBF가 22 ℃에서 모노머가 거의 없는 고 분자량(HMW) 밴드(올리고머를 나타냄)를 생성함을 나타내었다(도 1a; 상부 패널, 레인 1). 대조적으로 저분자량 올리고머 및 모노머 CBF의 수준은 4 ℃에서 크게 증가한 반면에 CBF 높은 올리고머의 수준은 감소하였다(레인 2-4). 이는 CBF 모노머가 저온-유도 신생합성 뿐만 아니라 고분자량 CBF 올리고머의 저온-의존성 분해 모두로부터 유도됨을 시사한다.

[0015] 이러한 CBF의 고분자량 올리고머에서 저급 올리고머 및 모노머로의 저온 의존적 구조 전환은 저온 스냅에 대한 식물의 초기 반응 및 저온 적응을 유도하는 식물의 능력을 나타내는 것으로 여겨진다.

[0017] CBF의 구조적 전환이 그들의 상호 작용 파트너에 의해 제어될 수 있다고 가정하고, 6 시간 동안 4 ℃에 노출시킨 CBF1-MycOE 아라비돕시스에서 추출된 총 단백질을 사용하여 면역침전(IP)/질량 분석법에 의해 상호 작용 성분을 식별하고자 하였다(도 5a, b).

[0019] 따라서 본 발명자들은 아라비돕시스 *trx-h2* 넉아웃 변이체와는 달리, Trx-h2 과발현 식물체는 높은 저온 저항성을 지님을 확인하고 저온-매개 산환 환원 변화가 CBF의 구조적 변화인 고분자량 올리고머에서 저급 올리고머 및 모노머로의 저온 의존적 구조 전환과 더불어 기능 활성화를 유도하여 식물체에 저온 저항성을 부여하는 메커니즘을 규명하고 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 아라비돕시스 *trx-h2* 넉아웃 변이체와는 달리, Trx-h2 과발현 식물체는 높은 저온 저항성을 지님을 확인코자 한 것이다. 저온-매개 산환 환원 변화가 CBF의 구조적 변화인 고분자량 올리고머에서 저급 올리고머 및 모노머로의 저온 의존적 구조 전환과 더불어 기능 활성화를 유도하여 식물체에 저온 저항성을 부여하는 메커니즘을 규명코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체에 있어서, 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지니는 C-반복 결합인자 1(CBF 1)과 상호 작용하여 CBF 1을 0~10 ℃의 저온에서 고분자량의 올리고머로부터 저분자량의 모노머로 해리 전환시켜 형질전환 식물체에게 저온 저항성을 부여함을 특징으로 하는 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[0025] 이때 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 2번째 아미노산 잔기인 글리신에 의해 세포질에 미리스토일화 되어 있으나 0~10 ℃의 저온에서 세포질로부터 탈미리스토일화 되어 Trx-h2 단백질이 핵으로 트랜스로케이션 되어 CBF 1과 상호 작용하여 CBF 1의 구조적 전환을 야기시켜 식물체에 저온 저항성을 부여함을 특징으로 한다.

[0027] 한편 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 31번째 잔기로부터 133번 잔기 까지 122개의 아미노산을 지닌 잘 보존된 Trx 모티프를 지니며 Trx 모티프 내의 59번째 및 62번째 잔기인 시스테인이 CBF 1과 상호 작용함을 특징으로 한다.

[0029] 또한 상기 C-반복 결합인자 1(CBF 1) 내의 23번, 30번, 100번, 117번 및 137번째 보존된 잔기인 시스테인이 티오레독신 Trx-h2 단백질과 상호 작용함을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 효과는 아라비돕시스 *trx-h2* 넉아웃 변이체와는 달리, 높은 저온 저항성을 지닌 Trx-h2 과발현 식물체를 제공하는 것이다. 저온-매개 산화 환원 변화가 CBF의 구조적 변화인 고분자량 올리고머에서 저급 올리고머 및 모노머로의 저온 의존적 구조 전환과 더불어 기능 활성화를 유도하여 저온 저항성을 지닌 Trx-h2 과발현 식물체를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 세포질 Trx-h2의 저온-매개 탈-미리스토일화는 그의 핵 트랜스로케이션이 CBF 올리고머와 상호 작용하고 이를 모노머로 해리할 수 있게 함을 나타낸 도면이다.

도 1a는 CBF의 저온-의존적 발현 및 4℃ 에서 Col-0 식물체에서 올리고머로부터 모노머로의 구조적 전환을 나타낸 것이다. 지시된 시점 동안 4℃ 에서 배양된 식물로부터 총 단백질을 추출한 후, CBF 수준 및 구조적 변화를 각각 웨스턴 블롯팅에 의한 환원 (하단) 및 비-환원 (상단) SDS-PAGE 겔에서 분석하였다. 겔 오른쪽의'O'와'M'은 CBF 올리고머와 모노머를 나타낸다. 도 1b는 SDS-PAGE 겔에 의해 분석된 His-CBF에 의한 Trx-h2의 시험관내 풀다운 분석 및 대조군으로서 His-MBP에 의한 웨스턴 블롯팅을 나타낸 것이다. 도 1c는 22℃ 또는 4℃에서 6 시간 동안 배양된 CBF-Myc^{OE}식물의 전체 추출물로부터의 CBFs-Myc의 Co-IP를 나타낸 것이다. 도 1d는 4 ℃ 또는 22 ℃에서 6 시간 동안 배양된 N. 벤타미아나 잎에서 공동 발현된 *Trx-h2-YN* 및 *YC-CBF*로 수행된 BiFC 분석을 나타낸 것이다. 도 1e는 22 ℃ 또는 4 ℃에서 6 시간 동안 배양된 담배 잎에서 *Trx-h2-YFP*의 세포 내 위치를 나타낸 것이다. 도 1f는 22 ℃에서 *Trx-h2-YFP* 또는 *Trx-h2 (G/A)-YFP*를 나타내는 담배 잎에서 Trx-h2 위치에 대한 Gly의 효과를 나타낸 것이다. (d ~ f)에서 공초점 현미경으로 분석된 YFP 형광을 핵 마커 NLS-RFP (Merge)의 그것과 합체 시켰다. 명 시야 이미지 (Bright)와 스케일 바 (20㎛)가 표시된다. 도 1g는 22℃ 또는 4 에서 인큐베이션 시킨 Col-0 식물로부터 핵 및 비-핵 분획을 분리하여, 웨스턴 블롯팅에 의한 Trx-h2의 검출을 나타낸 것이다. 항 히스톤-H3 및 항-PEPC 항체를 핵 및 비-핵 마커로 사용하였다. 도 1h 및 1i는 Trx-h2의 미리스테이트는 22℃ 및 4℃에서 6 시간 동안 배양된 Trx-h2-V5^{OE}/*trx-h2* 식물(h) 또는 22℃에서 Trx-h2(G/A)-V5^{OE}/*trx-h2* 의 식물(i) 에서 도 9에 나타난 프로토콜에 의한 측정을 나타낸 것이다. Trx-h2의 미리스토일화 SDS-PAGE 겔에서 검출 가능한 이동성 변화를 유발하지 않았다.

도 2는 저온 스트레스 하에서 시험관 내 및 생체 내에서 CBF1의 Trx-h2-매개 환원 및 모노머화를 나타낸 것이다.

도 2a 및 2b는 1mM DTT, 1mM H_2O_2(a)및 0.5mM NADPH, 1μM Trx 환원 효소 및 5μM Trx-h2 또는 Trx-h2(C/S)를 포함하는 Trx 시스템과 함께 25 ℃에서 30 분 동안 정제된 His-CBF1의 배양을 나타낸 것이다. (b) 구조적 변화는 비환원/환원 SDS-PAGE 겔 및 웨스턴 블롯팅 에서 분석되었다. 도 2c 및 2d는 웨스턴 블롯팅 에 의해 분석된 4℃에서 인큐베이션 된 CBF1-Myc^{OE}/Col-0 (c) 및 CBF1-Myc^{OE}/*trx-h2* (d) 식물체 내의 CBF1의 Trx-h2-매개 구조적 해리를 나타낸 것이다. 도 2e 및 2f는 P_{CBF1}:CBF1-Myc/ Col-0 식물에서 산화된 CBF1 모노머로 CBF1 올리고머의 저온-유도된 해리(e)를 나타낸 것이다. 이는 환원 모노머로 전환되지만 P_{CBF1}:CBF1-Myc/*trx-h2* 의 Trx-h2 결핍 변이체내에서는 아니다 (f). 총 단백질을 추출한 후, mPEG-MAL로 처리하고 비-환원 겔에서 환원- 및 산화 -CBF1을 분리하고 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 2 개의 모노머 밴드는 환원된 (◁) 및 산화된 (◀) CBF1 모노머를 나타낸다. 도 2g 및 2h는 CBF1(C/S)은 시험관 내 (g) 및 4 ℃ (h)에서 배양된 담배 잎에서 *CBF1(C/S) -Myc*를 발현하는 식물에서 산화 환원 변화에 민감하지 않다는 것을 나타낸 것이다. 도 2i 및 2j는 총 글루타티온 수준 (GSH + GSSG) (i) 및 GSH/GSSG 비율 (j)에 의해 추정된 아라비돕시스에서의 저온-유도된 세포 산화 환원 변화를 나타낸 것이다. 도 2k 및 2l은 세포가 없는 시스템에서 1 시간 동안 GSH/GSSG 비율이 다른 CBF1-Myc^{OE}/Col-0(k) 및 CBF1-Myc^{OE}/*trx-h2* (l) 식물에서 추출된 총 단백질을 인큐베이션 시킨 후 웨스턴 블롯팅으로 CBF1의 구조적 전환을 나타낸 것이다. 오른쪽에 있는 'O' 및 'M'은 각각 CBF1 올리고머와 모노머를 나타낸다.

도 3은 저온 스트레스 하에서의 *COR15a* 프로모터 및 *COR* 유전자 발현에 대한 CBF1의 Trx-h2 의존적 결합을 나타낸 것이다.

도 3a 내지 도 3d는 6 % 폴리아크릴아미드 겔 상에서 EMSA에 의해 분석된 COR15a 프로모터에 대한 CBF1의 산화 환원-의존적 결합을 나타낸 것이다. 비오틴-표지된 올리고 프로브를 1 mM DTT (a), 1 mM H_2O_2 (b) 및 5 μM Trx-h2 (c) 또는 Trx-h2 (C/S를 포함하는 Trx 시스템의 존재하에 His-CBF1과 함께 배양하였다 (d). His-MBP를 컨트롤로 사용한다. 도 3e는 COR15a 프로모터의 개략도를 나타낸 것이다. P1 및 P2는 qRT-PCR에 대한 프라이머 결합 부위를 나타낸다. 도 3f 및 3g는 22℃ (f) 또는 4℃ (g)에서 6 시간 동안 배양된 다양한 아라비돕시스 유전자형 내에서 P1 및 P2 영역과 CBF1의 결합에 대한 ChIP-qPCR 분석을 나타낸 것이다. 도 3h는 qRT-PCR에 의해 분석된 4 ℃에서의 대조군으로서 사용된 Col-0, *trx-h2* 식물 및 *trx-h3*에서의 대표적인 COR 유전자의 발현 수준을 나타낸 것이다.

도 4는 Trx-h2는 주로 CBF 신호 전달을 통해 아라비돕시스의 동결 내성을 향상시킴을 나타낸 것이다.

도 4a 내지 4f는 2 주령의 비-순응(NA) 및 저온-순응(CA) Col-0, *trx-h2*, Trx-h2-V5^{OE}/*trx-h2*(라인 #1 및 #2)(a-c), 및 Trx-h2(C/S)-V5^{OE}/*trx-h2*(#1 및 #2) (d-f) 아라비돕시스에 대한 동결 내성 비교를 나타낸 것이다. 도 4g 내지 4i는 cbfs 및 Trx-h2-HA^{OE}/cbfs(#1및 #2)에 의해 분석된 저온 신호 전달에서 Trx-h2 및 CBF 사이의 유전적 관계를 나타낸 것이다. (a-i)에서 냉동 스트레스 후, 식물을 어두운 곳에서 12 시간 동안 4℃로 유지한 후 5 일 동안 22℃로 옮긴 후 사진(a, d, g)을 찍어 회복을 비교하였다. 식물의 동결 내성은 생존율(b, e, h) 및 전해질 누출(%)(c, f, i)에 의해 측정되었다. 도 4j는 본 발명자들의 결과 모델을 나타낸 것이다. 미확인된 데아실라제(가위로 표시됨)에 의한 세포질 Trx-h2의 저온 매개 탈미리스토일화 및 이의 핵 전위는 따뜻한 온도 및 저온 유도된 신생합성 CBF 모노머에 존재하는 CBF 올리고머를 포함하는 모든 산화된 (비활성) CBF를 감소시킨다. 환원된 (활성) CBF 모노머는 COR 유전자를 발현하고 식물에서 동결 내성을 향상시킨다.

도 5는 *trx-h2* 및 cbfs 배경에서 다양한 형태의 CBF1, Trx-h2 및 이들의 변이체를 발현하는 형질 전환 아라비돕시스의 생성을 나타낸 것이다.

도 5a는 NOS 터미네이터를 지닌 Col-0 및 *trx-h2* 배경에서 CaMV 35S 프로모터 (P_{35S}x3)및 그의 고유 프로모터 (P_{CBF1})의 제어 하에 발현된 형질 전환 CBF1-Myc^{OE}및 P_{CBF1}:CBF1-Myc아라비돕시스의 제조를 위한 DNA 컨스트럭트를 나타낸 것이다. 도 5b 및 5c는 아라비돕시스 과발현체(CBF1-Myc^{OE}/Col-0또는 CBF1-Myc^{OE}/*trx-h2*) (b) 및 RT-PCR에 의해 검증된 P_{CBF1}:CBF1-Myc/Col-0및 P_{CBF1}:CBF1-Myc/*trx-h2* (c) 식물체내에서 *CBF1* 과 *Trx-h2* mRNA의 발현 분석을 나타낸 것이다. 도 5d는 T-DNA 삽입 녹아웃 변이체 아라비돕시스, *trx-h2*의 게놈 구조 (SALK_079507)를

나타낸 것이다. T-DNA 삽입 부위 및 정방(For) / 역방(Rev) 프라이머 결합 부위가 표시되어 있다. ATG 및 TAA는 시작 및 정지 코돈을 나타낸다. 도 5e 유전자형 분석 PCR에 의한 *trx-h2* 식물에서 *Trx-h2* 녹아웃의 확인을 나타낸 것이다. 도 5f는 CaMV 35S 프로모터 및 옥토핀 신타제 (OCS)터미네이터의 조절 하에 V5-태그와 융합된 Trx-h2, Trx-h2 (G/A) 및 Trx-h2 (C/S)의 과발현을 위한 DNA 컨스트럭트의 개략도를 나타낸 것이다. 각각의 컨스트럭트를 운반하는 A. 투메파시엔스 균주 GV3101을 *trx-h2* 변이체로 형질 전환시켜 Trx-h2-V5^{OE}/*trx-h2*, Trx-h2(G/A)-V5^{OE}/*trx-h2*, 및 Trx-h2(C/S)-V5^{OE}/*trx-h2* 과발현 라인을 생성시켰다. 도 5g 및 5h는 RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅에 의해 다양한 형질 전환 아라비돕시스에서의 *Trx-h2* mRNA (g) 및 Trx-h2 단백질 (h)의 발현 수준 분석을 나타낸 것이다. 다양한 유전자형에서 *Trx-h2* mRNA 및 이의 단백질의 발현 수준을 정량적으로 비교하기 위해, ChemiDoc MP 시스템에서 짧은 (중간 패널) 및 긴 (상단 패널) 시간을 노출시키는 2 개의 상이한 블롯이 나타났다. 도 5i 내지 5l은 CRISPR-cas9 시스템 (i) 및 Trx-h2-HA^{OE}/*cbfs* (j) 아라비돕시스에 의한 *cbfs*-null 변이체의 제조를 위한 DNA 컨스트럭트. Trx-h2-HA^{OE}/*cbfs* (라인 # 1 및 # 2) 식물에서 *Trx-h2* mRNA (k) 및 이의 단백질 (l)의 발현 수준을 각각 RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅에 의해 분석한 것이다. (g-l)에서 튜불린 및 RbcL이 로딩 대조군으로 사용되었다.

도 6은 Trx-h2의 아미노산 서열 특성 및 저온에서 CBF1과의 특이적 상호 작용을 나타낸 것이다.

도 6a는 아라비돕시스에서 11 개의 세포질 Trx-hs의 N-말단 아미노산 서열 (~ 80 잔기) 및 TermiNator 프로그램에 의해 예측된 추정 아실화 위치의 비교를 나타낸 것이다. 지방산의 변형 패턴에 따라 왼쪽의 노란색 상자는 각각 Trx-hs의 하위 그룹 I (Sub-I), Sub-II의 자홍색 상자, Sub-III의 녹색 상자, Sub-IV의 시안 상자를 나타낸다. 미리스토일화에 필요한 중요 아미노산은 적색 박스(Sub-II의 Gly2), 청색 박스(N-A의 SubaI)로서의 N-α-아세틸화 및 녹색 박스(Sub-IIV의 Cys5)로서 팔미토일화로 강조된다. 활성 부위 Cys 잔기(CXXC 주제)는 적갈색 상자로 강조 표시된다. 도 6b는 Trx-h2 및 그의 포인트 변이체, Trx-h2 (G/A) 및 Trx-h2 (C/S)의 개략도를 나타낸 것이다. 도 6c는 Trx-h2의 서열 특징을 나타낸것이다. Trx-h2의 활성 부위 Cys 잔기 (59 및 62에 위치)는 굵은 체로 표시되고, 미리스토일화 (G)에 필요한 Gly은 녹색으로 표시된다. 보존된 Trx 모티프 (122개 아미노산)는 빨간색 문자로 표시됩니다. NLS-매퍼 프로그램 (17)으로부터 식별된 이분자 핵 위치 신호 (NLS) 시퀀스는 밑줄로 표시된다. 마지막 위치의 별은 정지 코돈을 나타낸다. 도 6d는 4 ℃에서 BiFC에 의해 분석된 대조군으로서 사용된 Trx-h3에는 나타내지 않는 Trx-h2와 CBF1의 상호 작용을 나타낸 것이다.

도 7는 저온 조건하에 Col-0 식물에서 항-Trx-h2의 항체 특이성 및 *Trx-h2* mRNA 및 단백질의 발현 분석을 나타낸 것이다.

도 7a는 실험실에서 제조된 항-Trx-h2 항체의 항체 특이성을 나타낸 것이다. 아라비돕시스의 Col-0, *trx-h2* 및 Trx-h2-V5^{OE}/*trx-h2* 과발현 라인으로부터 총 단백질을 추출한 후, 이들을 12 % SDS-PAGE에서 분리하고 Trx-h2 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅 하였다. Ponceau S로 염색된 Rbc L을 로딩 대조군으로 사용하였다. 도 7b 및 7c는 4 ℃에서의 저온 처리 동안 qRT-PCR (b)에 의해 *Trx-h2* mRNA의 발현 수준 및 Col-0 식물에서의 웨스턴 블롯 (c)에 의한 단백질 수준을 나타낸 것이다.

도 8은 아라비돕시스에서 미리스토일화 Trx-h2의 탐지에 사용되는 프로토콜을 나타낸 것이다. 아지도미리스테이트를 2 주령의 Trx-h2-V5^{OE}/*trx-h2* 또는 Trx-h2(G/A)-V5^{OE}/*trx-h2* 아라비돕시스로 진공-침투하여 22℃에서 24 시간 동안 인큐베이션 시켰다. 식물로부터 총 단백질을 추출한 후, 포스핀-PEG_3-비오틴과 함께 배양 하였다. 비오티닐-미리스토일화된 Trx-h2-V5를 항-V5 항체에 의해 면역 침전시키고 환원성 SDS-PAGE 겔에서 분리 하였다. 이어서, 비티닐-미리스토일화 된 Trx-h2-V5를 항-비오틴 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 검출하였다. 프로토콜은 배양 세포에서 미리스토일화 단백질의 검출에 사용된 방법의 변형으로 수립하였다.

도 9는 따뜻한 온도에서 아라비돕시스 원형질체 세포에 의해 분석된 Trx-h2의 세포 내 국소화를 나타낸 것이다.

도 9a는 CaMV-35S 프로모터의 조절하에 발현된 Trx-h2-YFP DNA 컨스트럭트의 개략도를 나타낸 것이다. 도 9b는 따뜻한 온도(22℃)에서 아라비돕시스 원형질체 세포에서 분석된 Trx-h2의 세포 내 위치를 나타낸 것이다. Trx-h2-YFP의 일시적 발현은 공 초점 현미경 (YFP) 하에서 YFP 형광에 의해 가시화되었다. 소포체(ER), 골지 복합체 (Golgi complex) 및 2 차 레인(RFP)에서의 핵의 세포 내 마커에 대해 본 발명자들은 각각 mCherry-HDEL, 대두 a-1,2-만노시다제 1-RFP 및 NLS-RFP를 사용하였다. YFP 및 RFP 신호의 겹친 이미지가'병합'패널에 표시되었다. 명 시야 이미지가 제공되었다 (Bright). 스케일 바는 20 μm를 나타낸다.

도 10은 5 개의 보존된 Cys 잔기를 함유하는 CBF의 아미노산 서열 특성 및 따뜻한 온도에서 단백질 구조에 대한 Trx-h2의 영향을 나타낸 것이다.

도 10a는 적색 박스로 표시된 5 개의 보존된 Cys 잔기(23, 30, 100, 117 및 137에 위치)를 함유하는 아라비돕시스에서의 3 개의 CBF1 ~ 3 아미노산 서열의 비교를 나타낸 것이다. 오른쪽의 숫자는 아미노산 수를 나타낸다. 도 10b 및 10c는 5 개의 보존된 Cys 잔기가 Ser로 대체된 CBF1 (b) 및 CBF1 (C/S) (c)의 도메인 구조를 나타낸 것이다. N- 말단 적색 박스는 핵 위치 신호 (NLS), AP2 도메인의 녹색 박스 및 활성화 도메인의 청색 박스를 나타낸다. 하단의 숫자는 아미노산 위치를 나타낸다. 도 10d는 따뜻한 온도 (22℃) 에서 배양된 다양한 아라비돕시스 유전자형에서 비-환원(상부 패널) 및 환원(하부 패널)-SDS-PAGE 겔에 웨스턴 블롯에 의해 분석된 CBF 단백질 구조에 대한 Trx-h2 효과를 나타낸 것이다. 겔 오른쪽의'O'와'M'은 각각 CBF 올리고머와 모노머를 나타낸다.

도 11은 4℃에서의 *COR15a* 프로모터 및 *CBF* 발현에 대한 CBF1 결합상의 trx-h2의 효과를 나타낸 것이다.

도 11a는 시작 코돈 (+1)으로부터 -267 내지 -262(녹색 박스로 표시됨) 및 -439 내지 -444(파란색 박스) 상류에 위치한 CRT/DRE 엘레멘트의 코어 서열을 함유하는 *COR15a* 프로모터의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 것이다. 도 11b는 청색 및 녹색 박스로 표시된 2 개의 CRT/DRE 시스-엘레멘트를 함유하는*COR15a* 프로모터의 개략도를 나타낸 것이다. 도 11c는 비오틴-표지된 EMSA 프로브의 올리고 뉴클레오티드 서열(시작 코돈의 상류에서 -275 내지 -253 bps)을 나타낸 것이다. 도 11d는 루시퍼라제(LUC) 분석에 사용된 이펙터, 내부 대조군 및 리포터의 DNA 컨스트럭트를 나타낸 것이다. 도 11e는 22 ℃에서 산화(X/XO) 또는 환원(GSH) 조건 하에서 P_{35S}*:CBF1*을 발현하는 N. 벤타미아나 잎에서 측정된 LUC 활성의 비교를 나타낸 것이다. 도 11f는 LUC 활성을 22 ℃ 또는 4 ℃에서 배양된 P_{35S}*:Trx-h2* 또는 P_{35S}*:Trx-h2(C/S)*를 발현하는 담배 잎에서 비교한 것이다. 도 11g는 qRT-PCR에 의해 분석된 4 ℃에서 인큐베이션 Col-0 및 *trx-h2* 식물에서 *CBF1 ~ 3* mRNA의 발현 수준을 나타낸 것이다. 실험에서, *trx-h3* 식물도 대조군으로 포함되었다. 데이터는 3 개의 독립적인 실험의 평균±SE로 표현된다.

도 12는 Trx-h2는 CBF 신호 전달을 통해 토양에서 성장하는 아라비돕시스의 동결 내성을 향상시킴을 나타낸 것이다.

도 12a 내지 12c는 다양한 아라비돕시스 유전자형에 대한 동결 내성 비교를 나타낸 것이다. 비-순화(NA) 및 저온 순화(CA) 식물의 제조를 위해 22 ℃에서 토양에서 자란 18일 된 식물을 0 ℃에서 원하는 온도로 2℃/30 분의 속도로 냉각 시켜 냉동실에 두었다. 구배 냉각 시스템을 사용하여 2℃/30 분. 식물을 최종 온도에서 1 시간 동안 저장 한 후, 12 시간 동안 4 ℃에서 인큐베이션 시켰다. 식물의 동결 내성 수준은 회수(a), 생존율(b) 및 전해질 누출(%)(c)을 관찰하여 평가하였다. CA 식물의 경우, 동결 시험 전에 4 ℃에서 5일 동안 사전 배양되었다. 저온 신호 전달에서 Trx-h2와 CBF 사이의 유전적 관계는 *cbfs* 및 Trx-h2-HA^{OE}/*cbfs* (#1 및 #2) 아라비돕시스를 사용하여 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명에 있어서, 저온-반응 전사 인자인 C-반복 결합 인자(CBF)의 활성은 이들이 저온 내성을 조절하지만 온화한 조건 하에서 정상적인 식물 성장을 조절하기 때문에 엄격하게 제어된다. CBF1의 상호 작용 파트너로 확인된 세포질 산화 환원 단백질인 티오레독신(Trx-h2)은 글리신 잔기에서 미리스토일화를 통해 세포질 내막에 고정된다.

[0036] 식물체가 저온에 노출시 미리스테이트가 절단되고 Trx-h2가 핵으로 이동하여 산화된 (비활성) CBF 올리고머 및 모노머로 환원된다. 환원된 (활성) 모노머는 저온 조절된 유전자 발현을 활성화시킨다.

[0038] 따라서 본 발명의 Trx-h2 과발현 식물체는 아라비돕시스 *trx-h2* 넉아웃 변이체와는 달리 저온 저항성을 지닌다. 저온-매개 산환 환원 변화에 따른 CBF의 구조적 변화 및 기능 활성화는 형질전환 식물체에 저온 저항성을 부여하는 것이다.

[0040] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0042] 확인된 상호 작용자 중에서 본 발명자들은 서브 그룹 II에 속하는 세포질 산화 환원 단백질인 티오레독신(Trx-h2)의 h2- 타입을 선택하였다(도 5a-c). 여기에는 NLS-mapper 프로그램에 의해 예측되는 C- 말단에 2 개의 활성 부위 시스테인(Cys)과 추정 이분자 핵 위치 신호 (NLS)가 들어 있다. Trx-h2는 세포 수준의 활성산소종(ROS)을 감지하고 신호를 다운스트림 표적 단백질에 전달하는 것으로 알려져 있다.

[0044] Trx-h2의 저온-응답 기능을 이해하기 위해 본 발명자들은 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR) 및 Trx-h2 특이적 항체를 이용한 웨스턴 블롯에 의해 Col-0 식물에서의 저온 처리 동안 mRNA 및 단백질 수준을 조사하였다(도 7). 본 발명자들은 따뜻한 조건과 차가운 조건 사이의 Trx-h2 수준의 차이를 발견하지 못했으며 이는 Trx-h2가 후번역 수준에서 CBF 활성과 단백질 구조를 조절할 수 있음을 나타낸다.

[0046] 정제된 재조합 Trx-h2 및 히스티딘(His)-태그된 CBF1-3을 지닌 시험관 내 풀다운 분석에 의해 세포질성 Trx-h2와 핵 CBF 사이의 상호 작용을 확인하였다(도 1b). 22 ℃ 또는 4 ℃에서 6 시간 동안 배양된 CBFs-MycOE 아라비돕시스를 사용하여 생체 내 IP 분석에 의해 동일한 결과가 얻어졌으며(도 1c), Trx-h2가 YFP의 N-말단 부분(*Trx-h2-YN*) 및 CBF는 니코티나 벤타미아나 잎에서 C-말단 YFP(*YC-CBF*)에 융합되었다(도 1d).

[0048] 그러나 대조군으로서 사용된 Trx-h3는 BiFC에 의해 분석된 CBF 와 상호 작용하지 않았다(도 6d). 이는 Trx-h2가 4 ℃에서 CBF와 특이하게 상호 작용하나 22℃에서 작용하지 않음을 의미한다.

[0050] 세포질 Trx-h2가 핵에서 핵 CBF와 상호 작용하려면 단백질이 저온에 의해 핵으로 이동해야 하는데 이는 담배 잎에서 Trx-h2-YFP의 일시적인 발현으로 나타난다(도 1e). Trx-h2-YFP 신호는 4 ℃에서 분석된 NLS-RFP 형광과 크게 겹쳐지지만, YFP- 형광은 22 ℃에서 세포질 영역에서만 검출되어 세포질 Trx-h2가 핵으로의 트랜스로케이션을 유발했음을 나타낸다.

[0052] 이는 웨스턴 블롯팅으로 Col-0 식물로부터 추출된 단백질의 세포 내 분획화에 의해 확인되었다(도 1g). Trx-h2와 CBF의 상호 작용 친화성과 본 발명에서 조사된 Trx-h2에 의해 조절된 3 개의 아라비돕시스 CBF의 분자 특성을 구별할 수 없기 때문에 본 발명자들은 추가 분석을 위해 대표적인 CBF로 CBF1을 선택하였다.

[0054] Trx-h2의 저온 매개 핵 전위의 분자 메커니즘을 정밀하게 조사하기 위해 본 발명자들은 Myristoylator 프로그램(myristoylator)으로 그 서열을 분석하고 Trx-h2에 보존된 Gly 잔기, 표준적인 미리스토일화 부위가 포함되어 있음을 확인하였다(도 6a,b). 미리스토일화가Trx-h2의 막 고정 효능 및 세포 국소화에 영향을 미치기 때문에, 본 발명자들은 YFPin 담배 잎과 융합된 Ala에 대한 Gly를 대체하는 *Trx-h2* 및 *Trx-h2(G/A)*의 DNA 컨스트럭트를 발현하여 Gly-영향 서브셀 위치를 조사하였다(도 1f). Trx-h2-YFP 형광은 22 ℃에서 주로 세포질에 나타났지만 Trx-h2 (G/A)-YFP 형광의 일부는 핵에서 검출되었다.

[0056] 또한 Trx-h2-V5^{OE}/*trx-h2* 식물에서 Trx-h2의 온도-의존적 미리스토일화를 분석하기 위해, 12-아지도도데카노산을 식물에 진공-침투 시키고 상이한 온도에서 배양하였다. 항-V5 항체에 접합된 단백질-G 아가로스 비드를 사용하여 비오티닐화 된 아지도미리스토릴화 된 Trx-h2-V5를 면역 침전시키고 ECL 검출 키트 및 항-바이오틴 항체에 의해 검출하였다(도 8). 비오티닐화된 미리 스테이트는 22 ℃에서 배양된 Trx-h2-V5^{OE}/trx-h2 식물에서만 검출되었고(도 1h), Trx-h2 (G/A)-V5^{OE}/*trx-h2* 식물에서는 검출되지 않았다(도 1i).

[0058] 결과는 Trx-h2의 Gly2에 부착된 미리스테이트가 아라비돕시스 원형질체 세포를 사용하여 확인된 세포질 내배엽에 단백질을 고정 시킨다는 것을 암시한다(도 9). 그러나 지방산은 4 ℃에서 특정의 저온-감지 가능한 데 아실라제에 의해 분해되어 탈-미리스토일화 된 Trx-h2가 핵으로 트랜스로케이션 될 수 있게 한다.

[0060] 모든 아라비돕시스 CBF는 5 개의 보존된 Cys 잔기를 포함하고(도 10) 다양한 산화 환원 조절 단백질이 산화 환원-의존적 구조적 변화를 나타내고 있기 때문에, 재조합 His-CBF1의 단백질 구조를 22℃ 시험관 내에서 분석하였다. CBF1는 비환원성겔 상에서 몇 개의 불연속적인 크기의 올리고머로 나타난 반면(도 2a; 레인 1) DTT는 올리고머가 모노머 (레인 2)로 분해되었으며 이는 CBF1 올리고머가 이황화 결합에 의해 형성됨을 시사한다. 반대로 H_2O_2는 CBF1 모노머 및 작은 올리고머(레인 4)로부터 고분자량 올리고머의 형성을 유도하였다.

[0062] 마찬가지로 생체 내에서 전자공여체로서 NADPH, Trx 환원효소 및 Trx-h2를 포함하는 Trx 시스템은 CBF1 올리고머를 모노머로 환원 및 분해시키지만(도 2b; 좌측 패널), 산화 환원-비민감성 Trx-h2(C/S)[Cys을 Ser으로 교체]에 의한 것은 아니다(오른쪽 패널). Trx-h2 의존적 구조 전환은 Col-0 및 trx-h2 배경에서 CBF1-Myc^{OE}식물을 적용함으로써 식물에서 확인되었다. 22 ℃에서 성장한 CBF1-Myc^{OE}/Col-0 식물에서 추출한 CBF1은 비환원 겔에서 주로 고분자량 올리고머를 나타내었지만(도2c; 레인 1), 저온은 소형 올리고머와 모노머로 점진적으로 분해 시켰다(레인 2 ~ 4). 대조적으로 4℃에서 CBF1-Myc^{OE}/*trx-h2* 식물에서는 구조적 변화가 검출되지 않았다(도 2d).

[0064] 다음 단계로 본 발명자들은 P_{CBF1}:CBF1-Myc 식물체 내에서 저온 유도 새로 합성된 CBF1의 산화 환원 변화를 조사하였다(도 5a, c). 식물을 냉기에 노출시킨 후, 총 단백질을 추출하고 티올-알킬화제 (MM(PEG) 24-메틸-PEG-말레이미드(mPEG-MAL))로 처리하여 단백질의 티올 그룹에 결합시켜 분자량을 1,200 Da/mPEG로 증가시킨다.

[0066] P_{CBF1}:CBF1-Myc/Col-0 식물체에서는 저온 처리를 통해 고분자량 형태의 CBF1가 감소한 반면 환원 및 산화된 CBF1 모노머에 해당하는 2 개의 상한/하한 모노머체 밴드의 양은 증가하였다(도 2e). 그러나 Trx-h2(도 2f)의 부재하에서 저온은 올리고머 단백질에서 구조적 전환 없이 산화된(그러나 환원되지 않은) CBF1 모노머 형태만을 유도하였다.

[0068] 또한 Ser에 대한 5 개의 보존된 Cys를 Ser 으로 대체시킨 재조합 CBF1(C/S) 단백질(도 10c) 및 CBF1 (C/S)-Myc를 발현하는 담배 잎으로부터 추출된 단백질 모두는 비환원성 겔 내에서 단일 밴드의 산화된 모노머를 생성하였다(도 2g, h).

[0070] 결과는 Trx-h2가 식물체에서 기존의 CBF1 올리고머 및 저온-매개된 데 노보-합성된 CBF1 모노머를 포함하여 모든 산화된 CBF1 단백질을 감소시켜 저온에서 환원된 CBF1 모노머를 생성함을 시사한다. 대조적으로 22 ℃에서도 Trx-h2 (G/A)^{OE}/*trx-h2* 식물체는 임계 수준의 CBF 모노머를 생성하며(도 10d), Trx-h2 CBF 모노머 형성에 영향을 미치는 일차 제어는 온도 의존적 로케이션의 영향일 것이다.

[0072] CBF1의 환원 및 구조적 전환을 가능하게 하기 위해 Trx-h2는 저온 조건에서 환원된 단백질로서 존재해야 한다. 따라서 본 발명자들은 식물체 내에서 Trx-h2의 세포 산화 환원 상태의 전형적인 지표로서 저온 유발 산화 환원 변화를 세포 내 글루타치온 풀(GSH + GSSG) 및 [GSH]/[GSSG] 비율의 농도를 측정하였다(도 2i, j). 저온은 1.5 시간 이내에 글루타치온과 GSH/GSSG 비율의 총량을 급격히 감소시켰다.

[0074] 그러나 저온 처리 후 3-4 시간 내에 정상 수준으로 즉시 회복되었다. 이는 식물이 대량의 항산화 효소를 빠르게

생산하여 Trx-h2가 감소된 상태를 유지할 수 있게 하기 때문일 것이다. 세포 산화 환원 변화는 CBF1-Myc^{OE}/Col-0에서 CBF1의 감소 및 구조적 해리를 야기하였으나 저온 상태의 식물인CBF1-Myc^{OE}/*trx-h2*에서는 야기 되지 않았다(도2k, l). 이 데이터는 Trx-h2를 통해 ROS가 항산화 네트워크와의 밀접한 연관성을 통해 저온 신호 분자로 작용한다는 것을 시사한다.

[0076] 저온 조건 하에서 Trx-h2 매게 CBF1 감소 및 모노머화 생리학적 중요성을 조사하기 위해 본 발명자들은 *COR15a* 프로모터의 비오틴-표지 올리고 프로브(대표적인 목적 유전자)와 재조합 His-CBF1 또는 His-MBP(대조군)의 전기 이동 모빌리티 시프트 분석(EMSA)을 수행하였다(도 11). H_2O_2및 Trx-h2(C/S)가 아닌 DTT 및 Trx-h2와 같은 환원제 처리는 His-CBF1과 상호 작용하는 프로브의 뚜렷한 이동성 이동을 유도하였다(도 3a-d).

[0078] *COR15a* 프로모터의 P1 및 P2 모티프에 대한 CBF1의 결합 특이성(도 3e)을 다양한 아라비돕시스 유전자형으로부터 추출된 핵 단백질을 사용하여 항-CBF 항체로 염색체 면역 침전법 (ChIP)으로 분석하였다(도 5d-h). 공동-침전된 DNA 단편은 P1 및 P2 프라이머를 사용하여 qRT-PCR에 의해 증폭되었고, 풍부한 DNA 수준은 대조군으로 사용된 TA3 프로모터의 수준에 상대적으로 정량화되었다. 22 ℃에서 배양된 식물체에서 풍부하게 발견되지 않았지만(도 3f), 2 개의 CRT/ DRE 모티프를 포함하는 P2 영역은 4℃에서 Col-0 및 Trx-h2-V5^{OE}/*trx-h2* 식물체 내의 P1 영역에 비해 크게 증폭되었으나 Trx-h2(C/S)-V5^{OE}/*trx-h2*식물체 내에서는 증폭 되지 않았다(도 3g).

[0080] 다음 단계로 CBF1이 다양한 이펙터의 존재하에 *COR15a* 프로모터의 조절하에 *루시퍼라제*(LUC) 리포터 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있는지를 조사하였다 (도 11d). 내부 대조군으로서 사용된 β-글루쿠로니다제(GUS) 활성으로 정규화된 LUC 활성은 GSH-처리된 환원에서 일시적으로 CBF1을 발현하는 담배 잎에서 크게 증가하였지만, 크산틴/크산틴옥시다제(X/XO)-처리된 산화 조건에서는 증가하지 않았다.

[0082] 22 ℃ 및 4 ℃에서 *Trx-h2* 또는 *Trx-h2(C/S)*를 발현하는 담배 잎에서 추출한 단백질의 LUC 활성을 비교한 결과, LUC 활성은 4 ℃에서 Trx-h2에 의해 크게 증가하지만 Trx-h2(C/S)에 의해서는 크게 증가하지 않음을 발견하였다(도 11e, f). 마지막으로 본 발명자들은 COR 프로모터에 모든 CBF 결합이 대조군으로 사용된 4℃에서 Col-0 및 *trx-h3* 식물체 내에서는 모든 대표적인 COR 유전자의 발현을 강력하게 상향 조절하였으나(도 3h)식물체 내에서 모든 CBF가 유사하게 발현 조절 되었음에도 불구하고*trx-h2* 식물체에서는 상향 조절하지 않았다(도 11g).이러한 결과는 Trx-h2가 저온에서 CBF를 특이적으로 감소시키고 모노머화 하여 다운스트림 COR 유전자의 발현에 필수적임을 나타낸다.

[0084] 식물에서 동결 내성에 대한 Trx-h2 효과를 조사하기 위해 본 발명자들은 다양한 아라비돕시스 유전자형을 사용하였다. 한천 배지에서 성장한 비-순화(NA) 및 저온 순화(CA) 식물을 1시간 동안 동결 온도에 노출시킬 때 Trx-h2-V5^{OE}/*trx-h2* (#1 및 #2)의 2개의 독립적인 과발현 식물체는 강한 저온 저항성, 높은 생존율 및 낮은 전해질 누출을 나타내었으나(도 4a-c), 반면 *trx-h2* 및 h2(C/S)-V5^{OE}/*trx-h2* 식물체는 동결에 민감한 표현형을 나타내었다(도 4d-f).

[0085]

[0086] 마찬가지로 토양에서 성장한 *trx-h2* 및 Trx-h2(C/S)-V5^{OE}/*trx-h2* 식물이 아닌 Trx-h2-V5^{OE}/*trx-h2* 식물체의 NA- 및 CA- 둘 다 동결을 저항성을 나타내었다(도 12). Trx-h2와 CBF 사이의 유전자 연결을 확인하기 위해 *cbfs* 배경에서 Trx-h2-HA를 과발현하는 Trx-h2-HA^{OE}/*cbfs* 아라비돕시스를 생성하고 그들의 mRNA 및 단백질 발현을 확인하였다(도 5i-1). 그런 다음 동결 내성, 생존율(%) 및 이온 누출(%) 에세이 결과는 Trx-h2-HA^{OE}/cbfs가 저온 조건하에서 감소된 동결 내성을 지닌 *cbfs* 넉아웃 변이체 표현형과 유사하게 나타내었다(도 4g-i 및 도 12). 이는 Trx-h2의 주요 기능이 식물 저온 신호 전달에서 CBF와 유전적으로 연결되어 있음을 나타낸다.

[0088] 빠른 온도 하강에서 생존하기 위한 식물체의 가장 중요한 전략은 온도 변화를 감지하고 저온 적응을 위한 방어 신호를 활성화할 수 있는 속도이다. 본 발명자들의 결과는 명시적으로 저온 유발 탈-미리스토일화 및 세포질 내막에서 Trx h2의 분비는 이의 핵 트랜스로케이션을 허용하는 분자 메커니즘을 제공한다. 핵 국소화 Trx-h2는 모든 비활성 형태의 산화된 CBF를 감소시키고 모노머화하여 *COR* 유전자 발현을 활성화시키고 식물에서 동결 내성을 증가시킨다(도 4j).

[0090] 따라서 따뜻한 식물에서 상당히 산화된 (비활성) CBF 올리고머의 존재는 저온에 반응하여 신속하게 활성화되고 *CBF* 유전자의 저온 유도 및 그의 번역 전에 *COR* 유전자의 발현을 개시하는 저장소로서 작용할 수 있다. 또한 *cbfs* 변이 식물체가 따뜻한 온도에서 발아 저하, 난쟁이 및 스트레스 민감도를 나타냈다는 보고를 고려할 때, 본 발명의 결과는 산화된 CBF 올리고머가 정상적인 조건에서 상호 작용 파트너 교환을 통해 식물 생장 및 발달 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.

[0092] 세포 필수 단백질의 산화환원-매개 활성 제어 및 구조적 전환은 매우 민감하고 신속한 과정이며 식물 및 동물 모두에서 보존되는 것으로 보인다. 예를 들어 식물에서 PR1(NPR1) 올리고머의 시토졸 비-익스프레서는 병원성 공격시 Trx-h5에 의해 감소되고 핵 트랜스로케이션을 강제하고 체계적 획득 내성에 관여하는 유전자를 활성화하기 위해 구조를 변경한다.

[0094] 마찬가지로 다수의 대사 과정에 관여하는 포유동물 핵 활성화 단백질(AP) 1 및 핵 인자(NF)-κB 의 DNA-결합 및 트랜스 활성화 용량은 산화 환원-촉발된 핵 트랜스로케이션화 Trx에 의해 조절된다.

[0096] 요약하면 본 발명의 결과는 저온 스냅에 대한 식물의 초기 반응을 나타내는 CBF의 산화 환원 의존적 구조적/기능적 조절의 섬세한 프레임 워크를 보여준다. 저온 순화를 유도하는 식물의 능력을 조작하면 냉동 내성이 향상되고 작물 수확량이 향상되는 품종의 개발이 촉진될 수 있을 것이다.

[0098] 이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다.

[0100] (실시예 1) 식물 재료 및 성장 조건

[0102] 아라비돕시스 탈리아나 표현형 Col-0을 야생형(WT)으로 하여 Trx-*h2, Trx-h2(C/S)* 및 *Trx-h2(G/A)*를 과발현하는 형질전환 라인을 생성하기 위해 사용하였다. ABRC(미국 오하이오주 오하이오 주립대)에서 얻은 T-DNA 삽입 넉아웃 변이체 *trx-h2*(SALK_079507)도 Col-0 배경이었다. 모든 유전자형의 식물을 22 시간 동안 광 16시간/암 8시간 광주기 하에서 3 % 수크로스 및 0.25 % 피타-겔(pH 5.8)을 함유하는 MS 배지에서 성장시켰다. 담배(Nicotiana benthamiana) 식물을 100 mE · $m^{-2}s^{-1}$ 이하의 광감도로 26 ℃에서 성장시켰다.

[0104] (실시예 2)Trx-h2 및 CBF 재조합 단백질의 발현 및 정제

[0106] 야생형 WT 또는 변이체 Trx-h2 및 CBF1-3 유전자의 전장 cDNA를 pET28a 발현 벡터에 삽입하고, 대장균 BL21(DE3) pLysS 세포로 형질 전환시키고, 37 ℃에서 LB 배양하였다. 배양이 600 nm에서 광학 강도 0.5-0.6에 도달한 후, 이소프로필 -β-D-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 최종 농도 1mM가 되게 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 이어서 배양을 30 ℃에서 5 시간 동안 성장시켰다.

[0108] 세포를 원심분리에 의해 수확하고 1.8 mM KH_2PO_4(pH8.0), 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl 및 10 mM Na_2HPO_4를 함유하는 완충액에 재현탁 시켰다. 초음파 처리에 의해 세포를 파괴한 후, 단백질을 Ni-NTA 아가로스 겔(인스코팜, 대전)을 사용하여 정제 하였다. His-태그된 CBF(His-CBF)를 100 mM 이미다졸로 용출시키고 그의 융합된 Trx-h2를 트롬빈 절단에 의해 용출시켰다. 재조합 단백질을 20 mM HEPES-NaOH(pH 8.0) 완충액에 대해 투석하고 생화학적 분석에 사용하였다.

[0110] (실시예 3) 동형 접합 trx-h2 넉아웃 변이체 라인의 확인 및 Trx-h2, Trx-h2 (C/S) 및 Trx-h2 (G/A)를 과발현하는 마라비돕시스 형질 전환주의 생성

[0112] *trx-h2* 변이체의 동형접합체는 유전자형 분석에 의해 동정되었다. Trx-h2-$V5^{OE}$/*trx-h2*, Trx-h2 (C/S)-$V5^{OE}$/*trx-h2*, Trx-h2(G/A)-$V5^{OE}$/*trx-h2* 및 Trx-h2-HA^{OE}/*cbfs*의 과발현 라인 준비하기 위하여 *Trx-h2, Trx-h2(C/S)* 및 *Trx-h2(G/A)*의 cDNA를 표 1 에 나타난 프라이머를 이용하여 증폭하고 바이너리 벡터 pCAMBIA 1300에 클로닝 하였다. V5-태그와 융합되고 CaMV 35S 프로모터의 다운스트림에서 pEarlyGate301(pEG301) 벡터에 라이게이션 되었다.

[0114] 생성된 플라스미드를 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주 GV3101에 도입하고 플로랄 딥 방법을 통해 *trx-h2* 및 *cbfs* 변이 식물을 형질 전환시키는데 사용하였다. 적절한 항생제가 보충된 MS-플레이트에서 T1 형질전환 라인을 선택한 후, 형질 전환 유전자의 발현을 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 분석에 의해 분석하였다. 동형 접합 T3 라인을 모든 시험에 사용하였다. CBF1-Myc^{OE}/*trx-h2* 및 P_{CBF1}:CBF1-Myc/*trx-h2* 식물은 각각 동형접합 CBF1-Myc^{OE}및 P_{CBF1}:CBF1-Myc아라비돕시스를 *trxh-2* 식물과 교차시킴으로써 생성되었다.

[0116] (실시예 4) 면역 침전 (IP) / 질량 분석법에 의한 CBF1-상호작용 단백질의 확인

[0118] 아라비돕시스에서 CBF1의 상호 작용 파트너를 확인하기 위해, 총 단백질 (100 mg)을 6시간 동안 4 ℃에 노출된 2 주령 CBF1-MycOE 묘목으로부터 추출하고 항-Myc 아가로스(Sigma-Aldrich, 세인트루이스, 미주리, 미국)를 사용하여 면역 침강 시켰다. CBF1-Myc-상호 작용 단백질을 4 ℃에서 50mM 트리스-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT 및 0.1 % NP40을 함유하는 완충액으로 3 회 세척하였다. 단백질을 SDS-PAGE 로딩 염료와 혼합하고, 90 ℃에서 5 분 동안 가열하고 SDS-PAGE로 분리하였다. 단백질은 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 플라이트 시간(MALDI-TOF)/TOF-mass spectrometry에 의해 확인하였다.

[0120] (실시예 5) Trx-h2에서 미리스틸화 그룹 감지

[0122] 식물에서 Trx-h2에 공유적으로 부착된 미리스틸(C14) 그룹은 도 8에 요약된 절차를 사용하여 검출하였다. 이 프로토콜은 이전에 세포 배양 단백질에 사용된 방식으로부터 변형되었다. Trx-h2-V5로부터 미리스틸 그룹을 검출하기 위해, 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해된 40 μM의 12-아지도도데칸산(미리스틱산, 아지드)(Life Technologies, Camarillo, USA)을 2 주령 Trx-h2-$V5^{OE}$/*trx-h2* 또는 Trx-h2(G/A)-$V5^{OE}$/*trx-h2* 묘목으로 진공-침투시키고 22℃ 에서 1 일간 배양하였다.

[0124] 이들 묘목을 액체 N_2에서 그라운드 하여 총 단백질을 IP 완충제를 사용하여 추출하였다. 용액을 12,000*μg*에서 10 분 동안 원심 분리한 후, 상등액(250*μg* 단백질)을 37 ℃에서 2 시간 동안 250 μM 포스핀-PEG_3-비오틴과 반응시켰다. 항-V5 항체(Thermo Fisher Scientific, IL, USA, USA)에 접합된 단백질-G 아가로스 비드를 사용하여

비오티닐화된 단백질을 4 ℃에서 면역 침전시키고 SDS-PAGE에 의해 분리하고 웨스턴 블롯팅에 의해 검출하였다. 비오틴화된 아지도미리스토일화 Trx-h2-V5는 항-비오틴(Abcam, MA, USA) 및 ChemiDoc™ MP 시스템(BioRad, 독일 뮌헨)을 사용하는 항-V5 항체를 지닌 ECL 검출 키트를 사용하여 검출하였다.

[0126] (실시예 6) CBF1의 산화-환원 의존 구조 전환 분석

[0128] CBF1의 산화 환원-의존적 구조 전환을 25 ℃에서 15 분 동안 산화제 또는 환원제(각각 H_2O_2 또는 DTT)와 함께 배양된 정제된 재조합 His-CBF1 또는 His-CBF1(C/S) 단백질을 사용하여 시험관 내에서 시험하였다. NADPH, Trx 환원 효소 및 Trx-h2 또는 Trx-h2(C/S)를 포함하는 Trx 시스템을 사용하여 His-CBF1에 대한 Trx-h2의 환원력의 영향을 25 ℃에서 30 분 동안 분석하였다. 처리 후, 환원 및 비 환원 SDS-PAGE 겔에서 단백질을 분리하고, 항-His(Abcam, Cambridge, MA, USA) 및 항-Trx-h2 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의해 단백질 구조를 감지하였다. CBF1의 산화 환원-의존적 구조 전환은 또한 2주령 된 CBF1-Myc^{OE}/Col-0식물을 사용하여 생체 내에서 분석되었다.

[0130] CBF1의 구조적 변화 동안 Cys 잔기의 기능적 역할을 Myc-tag를 함유하는 pCAMBIA 벡터에 라이게이션된 변이 CBF1(C/S) 유전자를 사용하여 분석하여 pCAMBIA-Myc-CBF1(C/S) 플라스미드를 생성하였다. 이 플라스미드를 A. 튜메파시엔스 균주 GV3101로 형질전환 시켰으며 이는 4주령의 니코티나 벤타미아나 잎에 침투하는데 사용되었다. 이들 식물을 4 ℃에서 1, 3 또는 6 시간 동안 냉각 처리하였다. 액체-N_2로 침윤된 잎을 동결 및 분쇄한 후, 전체 단백질을 조직 분말로부터 추출하였다. CBF1 및 CBF1(C/S)의 생체 내 구조를 조사하기 위해 SDS-PAGE에 의해 비환원 겔에서 단백질을 분리하고 항-Myc 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의해 검출하였다.

[0132] (실시예 7) 티올-트래핑 분석

[0134] CBF1의 티올-트래핑 분석은 Col-0 또는 *trx-h2* 변이체 배경(PCBF1 : CBF1-Myc/ Col-0 또는 P_{CBF1}:CBF1-Myc/*trx-h2*)에서 고유 프로모터 하에 *CBF1-Myc*를 발현하는 2주령 된 아라비돕시스 식물체를 사용하여 생체 내에서 수행되었다. MS-배지에서 성장한 식물을 4 ℃에서 1, 3 또는 6 시간 동안 저온 처리하였다. 이어서 식물 조직을 액체-N_2에서 동결 및 분쇄하고 2 % SDS, 62.5mM Tris-HCl(pH 6.8), 7.5 % 글리세롤, 0.01 % 브로모페놀 블루 및 프로테아제 저해제 칵테일을 함유하는 SDS 샘플 완충액을 사용하여 식물 조직으로부터 총 단백질을 추출하였다. 추출물을 1 시간 동안 티올-표지 시약, MM(PEG) 24-메틸-PEG-말레이미드(mPEG-MAL)(Thermo Fisher Scientific, IL, USA)로 1 시간 동안 처리하고 12,000μg에서 10 분 동안 원심분리 하였다. 상등액 중의 단백질을 비환원 SDS-PAGE 겔에서 분리하고 항-Myc 항체로 웨스턴 블롯팅하여 검출하였다.

[0136] (실시예 8) 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)에 의한 RNA의 분리 및 정량

[0138] RNA 정제 키트(Macherey-Nagel, Düren, 독일)를 사용하여 총 RNA(2μg)를 분리하고 cDNA 합성 키트(Thermo Fisher Scientific, 미국 일리노이주 록포드)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이후, 10 ng의 cDNA를 다음 조건하에서 qRT-PCR의 주형으로 사용하였다 : 95 ℃에서 5 분 배양 후 95 ℃에서 30 초, 56 ℃에서 30 초, 72 ℃에서 1 분. 유비퀴틴 10(UBQ10) 및 액틴 2(ACT2) 유전자를 내부 대조군으로 사용하였다. 유전자-특이적 프라이머를 사용하여 각각의 샘플에 대해 3 개의 독립적 인 실험을 수행하였다(표 1).

[0140] (실시예 9) 공동 면역 침전 (Co-IP) 분석

[0142] CBF-Myc^{OE} 식물을 액체 N_2에서 냉동시키고 미세 분말로 분쇄하였다. 50mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5 % NP-40, 1mM PMSF 및 프로테아제 억제제 칵테일을 함유하는 IP 완충액을 사용하여 지면 조직으로부터 총 단백질을 추출하였다. 분리된 단백질을 항-Myc 아가로스 비드와 함께 4 ℃에서 밤새 인큐베이션 시킨 후, IP 버퍼로 3번 세척하였다. 침전물로부터 CBF-Myc 결합 단백질을 90 ℃에서 1 분간 가열하여 용출시킨 후 SDS-PAGE에서 분리하였다. CBF 및 Trx-h2 단백질은 각각 항-Myc(Cell Signaling Technology, 미국 미주리주 베벌리) 및 항-Trx-h2 항체를 사용하여 ECL 검출 키트(GE Healthcare Life Science, 미국 뉴저지주 사우스 플레인 필드)에 의해 검출되었다.

[0144] (실시예 10) Bimolecular 형광 보완 (BiFC) 분석

[0146] 특정 조건 하에서 Trx-h2와 CBF 사이의 상호 작용은 BiFC 분석을 사용하여 분석하였다. 실험을 위해 Trx-h2 및 CBF 플라스미드를 게이트웨이 BiFC- 바이너리 벡터 pDONR221에 개별적으로 클로닝하고 pDONR221 : Trx-h2 및 pDONR221 : CBF를 제조하였다. Trx-h2-YN 플라스미드는 TFP-h2를 YFP의 N-말단 단편(YN)과 융합시킴으로써 생성되는 반면, YC-CBF 플라스미드는 3 개의 CBF 각각을 YFP(YC)의 C-말단 단편과 융합시킴으로써 조립된다. 이들 플라스미드를 A. 튜메파시엔스 균주 GV3101에 도입하고 형질 전환된 세포를 사용하여 4 주령의 니코티나 벤타미아나의 잎에 침윤시켰다. 이들 식물을 26 ℃에서 2 일 동안 인큐베이션 한 후 6 시간 동안 4 ℃에 노출시켰다. YFP에 의해 생성된 형광 신호를 FV10-ASW 3.1 소프트웨어를 사용하여 공 초점 현미경으로 분석하였다.

[0148] (실시예 12) 핵 및 비-핵 분획의 세포 내 분획화

[0150] 4℃ 에서 6 시간 저온 처리 및 비-처리 Trx-h2-V5^{OE}/*trx-h2* 핵 및 비-핵 단백질의 분획화를 위해 CelLytic PN 추출 키트(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 제조사의 지시에 따라 사용되었다. 식물 조직을 액체-N_2에서 동결시키고 분쇄하여 분말을 만들고 1x 핵 분리 완충제 (NIB)와 혼합하였다. 샘플을 1,260㎍에서 10 분 동안 원심 분리하여 비-핵분획을 함유하는 상청액을 핵 및 다른 세포 내 세포 소기관을 함유하는 펠렛으로부터 분리하였다. 펠렛을 10 % Triton X-100 (NIBA)을 함유하는 1x NIB 완충액에 재현탁 시켰다. 10 % Triton X-100을 0.3 %의 최종 농도로 첨가하여 소기관 막을 용해시키고, 1x NIBA 완충액 중의 용해물을 1.5M 수크로스 쿠션에 적용하였다. 용액을 12,000 xg에서 10 분 동안 원심분리하여 핵의 반 순수 제제를 수득하였다. 펠렛을 핵 추출 완충액에 재현탁 시키고 핵 분획으로 사용하였다. 핵 및 비-핵 분획의 순도는 핵 표준 마커인 항-히스톤 H3 항체 (Abcam, MA, USA, MA) 및 항-PEPC 항체(Agrisera, Vannas, Sweden)를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의해 확인되었다.

[0152] (실시예 13) 총 글루타치온 풀(GSH + GSSG) 및 GSH/GSSG 비율의 측정

[0154] 저온 스트레스 하에서 Col-0 식물의 산화 환원 변화는 4 ℃에서 일정 시간 배양된 2 주령 아라비돕시스에서 글루타티온(GSH + GSSG) 및 GSH/GSSG의 총 수준을 측정함으로써 추정되었다. 액체-N_2로 식물로부터 추출된 20mg의 조직-분말을 2 % 메타-인산 및 2mM EDTA를 함유하는 200㎕의 용해 완충액에 용해시켰다. 용액을 13,000 xg에서 15 분 동안 원심분리 한 후, 상등액의 pH를 10 % 시트르산 나트륨으로 5.6으로 조정하였다. 이어서 티올 그린 지시제(비형광 염료)를 함유하는 50 μl GSH 분석 혼합물(GAM)과 30 ℃에서 30 분 동안 반응시켜 50 μl 상등액 중의 GSH 수준을 측정하였다. 반응 생성물로부터 방출된 형광은 GEMINI, XPS-분광형 광도계 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에 의해 측정되었고 GSH 함량은 GSH 표준 곡선으로부터 정량화되었다.

[0156] 또한 50 ℃ 상등액 중의 글루타티온(GSH + 2GSSG)의 총량은 30 ℃에서 30 분간 NADPH, GSH-리덕타제 및 티올 그린 지시제를 함유하는 50㎕의 총 글루타치온 분석 혼합물(TGAM)과 반응시켜 측정하였으며, GSSG를 2GSH로 형광

에 의한 글루타치온(GSH)의 총량을 평가한 후, GSG 수준은 TGAM36에 의해 평가된 [GSH + GSSG]의 총 농도에서 GAM에 의해 측정된 GSH 수준을 빼서 계산되었다. GSH 및 GSSG의 농도는 3 회 이상의 독립적인 실험으로부터 측정되고 평균화되었다.

[0158] (실시예 14)전기영동 이동 시프트 분석 (EMSA)

[0160] EMSA를 수행하기 위해, 바이오틴-표지된 올리고 뉴클레오티드 프로브(표 1)를, 라이트 시프트 화학 발광 EMSA 키트(미국 일리노이주 록포드 소재의 Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 처리하였다. 재조합 CBF1(5㎍)을 40 mol의 비오틴 표지 프로브 및 25 ng/㎕ Poly(dI-dC) 결합 완충제를 함유하는 20 ㎕의 반응 혼합물과 25 ℃에서 30 분 동안 배양하여, 반응 생성물을 6 % 폴리아크릴 아미드 겔에 리졸브 시켰다. CBF1에 결합된 프로브를 하전된 Hybond-N 막으로 옮기고 항-비오틴 항체(Abcam, Cambridge, MA, USA)로 웨스턴 블롯팅하여 검출하였다.

[0162] (실시예 15) 니코티나 벤타미아나 잎에서 CBF1의 전사 활성화 분석

[0164] CBF1의 Trx-h2-매개 트랜스 활성화를 식물체 내에서 분석하였다. 이펙터 컨스트럭트(P_{35S}:*CBF1*, P_{35S}:*Trx-h2*, 또는 P_{35S}:*Trx-h2(C/S)*) 또는 내부 대조군(P35S)을 갖는 리포터 컨스트럭트 (P_{35S}:*GUS*) 을 보유하는 A. 튜메파시엔스 균주 GV3101의 세포: GUS)를 4주령 된 니코티나 벤타미아나 잎에 침윤시켰다. 2 일간 배양 후, 식물을 4 ℃에서 24 시간 동안 저온 처리하였다. 이어서 잎 조직을 액체-N_2에서 냉동시키고 분쇄하여 분말을 제조하였다. IP 완충액으로 조직 분말로부터 총 단백질을 추출한 후, 추출물(100 ㎍ 단백질/20 ㎕ IP 완충액)을 80 ㎕의 GUS/LUC 반응 완충액(50 mM Na_2PO_4, pH 7.0, 10 mM EDTA, 10mM β-머캅토에탄올 및 0.1 % 트리톤 X-100)과 혼합하였다.

[0166] 용액에 100 ㎕의 LUC 기질(20 mM 트리신, 2.7 mM $MgSO_4$, 30 mM DTT, 1 mM 루시페린 및 0.5 mM ATP)을 10 분 동안 반응시켰다. LUC 활성은 GloMax® 20/20 Luminometer(Promega, Madison, WI 53711 USA)를 사용한 발광 변화에 의해 측정되었다. 또한 GUS 활성을 분석하기 위해 단백질 추출물을 16.7 % 메탄올, 1.1mM 4-메틸우벨리페릴-β-D-글루쿠로나이드 수화물(MUG)을 함유하는 GUS/LUC 기질 용액과 혼합하고 10 분 동안 반응시켰다(Sigma-Aldrich, 세인트루이스, 미주리, 미국). 130mM Na_2CO_3를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, GUS 활성은 GUSINI를 지닌 MUG 형광을 측정하여 XPS 분광형광계로 각각 364 및 447 nm의 여기 및 방출 파장에서 각각 측정 분석하였다. LUC 활성은 GUS 활성(내부 대조군)에 대해 정규화 되었고 LUC 활성은 3 번 측정 후 평균치로 나타내었다.

[0168] (실시예 16) 크로마틴 면역 침전 (ChIP) 분석

[0170] *COR15a* 프로모터에서 CRT/DRE DNA 모티프에 대한 CBF1의 결합은 4℃ 또는 22℃에서 6 시간 동안 인큐베이션 된 2 주령 아라비돕시스 모종으로부터 추출된 단백질로 ChIP 분석을 사용하여 분석되었다. 수확된 식물 조직(3 g)을 동결시키고 액체-N_2에서 분쇄하였다. CBF1-결합된 염색질 복합체는 60mM HEPES, 1M 슈크로스, 5 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 0.6% Triton X-100, 1 ㎍/ml 펩스타틴 A 및 프로테아제 억제제 칵테일(미니-완전 타블렛)(Roche, Basel, Switzerland)을 함유하는 용해 완충액 (pH 8.0)을 사용하여 조직 분말에서 분리되었다.

[0172] 단백질/크로마틴 복합체가 1 % 포름알데히드에 의해 가교된 후, 항-CBF 항체 또는 토끼 IgG 혈청(음성 대조군으로 사용됨) 및 연어 정자 DNA/단백질-아가로즈(밀로 포어, 벌링턴, MA, 미국)를 사용하였다. 아가로스 비드를 하기 완충액으로 순차적으로 세척하였다. 먼저 저염 완충액(150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA

및 20mM Tris-HCl, pH 8.0) 및 고염 완충액(500mM NaCl, 0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2mM EDTA 및 20mM Tris-HCl, pH 8.0)으로 세척하고. 다음으로 LiCl 세척 완충액(250mM LiCl, 1 % Nonidet P-40, 1 % 데옥시콜레이트, 1mM EDTA 및 10mM Tris-HCl, pH 8.0) 및 최종적으로 TE 완충액(10mM Tris-HCl, pH 8.0) 및 1 mM EDTA)으로 세척한다. 1 % SDS 및 0.1 M $NaHCO_3$를 함유하는 용리 완충액을 사용하여 단백질/DNA 복합체를 용출시켰다. 단백질/DNA 복합체로부터 5M NaCl의 존재하에 65℃에서 밤새 인큐베이션 함으로써 단백질을 제거하였다.

[0174] 잔류 단백질이 프로테이나제 K에 의해 분해된 후, DNA를 페놀/클로로포름/이소아밀알코올 추출에 의해 정제하고 에탄올 침전에 의해 침전시켰다. 정제된 DNA를 TE 완충액(pH 8.0)에 재현탁시킨 후, 표적 DNA 단편의 농축을 정량적 PCR(qPCR)에 의해 결정하였다. 표적 DNA의 상대적 농축은 먼저 UBQ10 유전자(내부 대조군)에 대한 정규화에 의해 입력에서 상응하는 양의 표적 DNA에 대하여 계산함으로써 계산되었다. qPCR에 사용된 프라이머는 표 1에 나열되어 있다.

[0176] (실시예 17) 동결 내성 분석

[0178] 토양에서 자란 18 일된 아라비돕시스와 22 ℃의 MS-한천 배지에서 자란 2 주된 식물을 4 ℃에서 5 일 동안 저온 적응 시키거나 처리하지 않았다. 이들은 냉동실(RuMED4001, 슈투트가르트, 독일)에서 냉동 온도에 노출시켰다. 냉동실의 온도는 원하는 온도에 도달할 때까지 30 분당 2 ℃의 속도로 0 ℃에서 하강시켜 식물을 1 시간 동안 보관하였다.

[0180] 비-순화된(NA) 냉동 스트레스(-6℃)의 처리를 위해 22℃에서 MS-한천 배지에서 성장한 2주령된 아라비돕시스 모종(대조군)을 지시된 온도에서 1 시간 동안 냉동실에 유지하고, 0℃로부터 -2℃/h의 구배 냉각 시스템으로 원하는 온도로 냉각시킨다. 그리고 저온순화(CA) 처리(-8℃)의 경우 동결 스트레스를 처리하기 전에 식물을 4 ℃에서 5 일 동안 사전 배양하였다. 식물을 어두운 조건 하에서 4 ℃에서 12 시간 동안 인큐베이션하고 회복을 위해 22℃에서 5 일 동안 추가로 인큐베이션 하였다.

[0182] 다양한 아라비돕시스 유전자형의 동결 내성은 형태 표현형, 생존율(동결 후 회복된 녹색 식물의 백분율) 및 전해질 누출(%; 토양에서 자란 4 주령 식물의 완전히 발달된 로제트 잎으로 측정)을 WT 식물체와 비교 측정하여 평가하였다. 식물의 전해질 누출을 측정하기 위해 적어도 3 세트의 다음 실험이 수행되었고 평균±표준 오차(SE)로 나타내었다. 하나의 절개된 리플렛을 100 ㎕의 증류수를 함유하는 시험관에 넣고 이를 순환조에 0 ℃에서 1 시간 동안 두었다.

[0184] 각 튜브에 아이스 크리스탈을 첨가한 후, 튜브를 순환조에서 인큐베이션 시키고, 그의 온도는 원하는 온도에 도달할 때까지 30 분당 2 ℃의 속도로 감소하도록 프로그램 하였다. 원하는 온도에서 1 시간 동안 튜브를 인큐베이션 한 후, 튜브를 점진적으로 해동할 수 있도록 즉시 얼음조로 옮겼다. 해동 후, 튜브 내의 모든 내용물을 20 ml의 증류수를 함유하는 새로운 튜브로 옮기고 밤새 흔들었다. 용액의 전도도는 전도도 측정기(Cole-Parmer Instrument, Vernon Hills, IL, USA)를 사용하여 측정하였다. 이어서 리플렛을 함유하는 튜브를 100 ℃에서 15 분 동안 고압 멸균하고, 진탕 기에서 실온으로 냉각시키고 용액의 전도도를 다시 측정하였다. 오토클레이브 전후의 전해질 누출 비율은 동결 응력으로 인한 막 손상의 지표로 사용되었다.

표 1

프라이머	서열(5'→3')
식물체 변형을 위한 컨스트럭트용 프라이머	
Trx-h2 F (*Cla*I)	ATCGATATGGGAGGAGCTTTATCAACT
Trx-h2 R (*Xba*I)	TCTAGATGCTCTGAGTTTGCTAACTTTCTT
Trx-h2(C/S) F	GGCCTCATGGTCCGGACCATCTAGGATGA
Trx-h2(C/S) R	TCATCCTAGATGGTCCGGAGCATGAGGCC
Trx-h2(G/A) F (*BamH*I)	GGATCCATGGCAGGAGCTTTATC
RT-PCR 및 지노타입 **PCR** 용 프라이머	
Trx-h2 F	ATGGGAGGAGCTTTATCAAC
Trx-h2 R	TTATGCTCTGAGTTTGCTAA
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
Tubulin F	CCAACAACGTGAAATCGACA
Tubulin R	TCTTGGTATTGCTGGTACTC
정량적 실시간 **PCR** 용 프라이머	
Trx-h2 qF	ACAGCTGCAGGGACCGAAT
Trx-h2 qR	CCGAGCGGAAGAGCTAAACTT
UBQ10qF	GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG
UBQ10qR	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT
ACT2 qF	CTTGCACCAAGCAGCATGAA
ACT2 qR	CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT
COR15a II F	ACGAAACGATTCTATTACAAGTAATGA
COR15a II R	GCCCAAATGAGTTGAAACCACAAAC
COR15a III F	GCCGACATACATTTGTTTCTATTACA
COR15a III R	GTGGTTTTCAGAAAGAAGAAGAAAAA
TA3 FW	CTGCGTGGAAGTCTGTCAAA
TA3 RW	CTATGCCACAGGGCAGTTTT
BiFC 에세이에 사용된 컨스트럭트용 프라이머	
Trx-h2 attB1 F	AAAAAGCAGGCCATATGGGAGGAGCTTTATCAAC
Trx-h2 attB2 R	AGAAAGCTGGGTTATGCTCTGAGTTTGCTAA

[0186]

[0187]

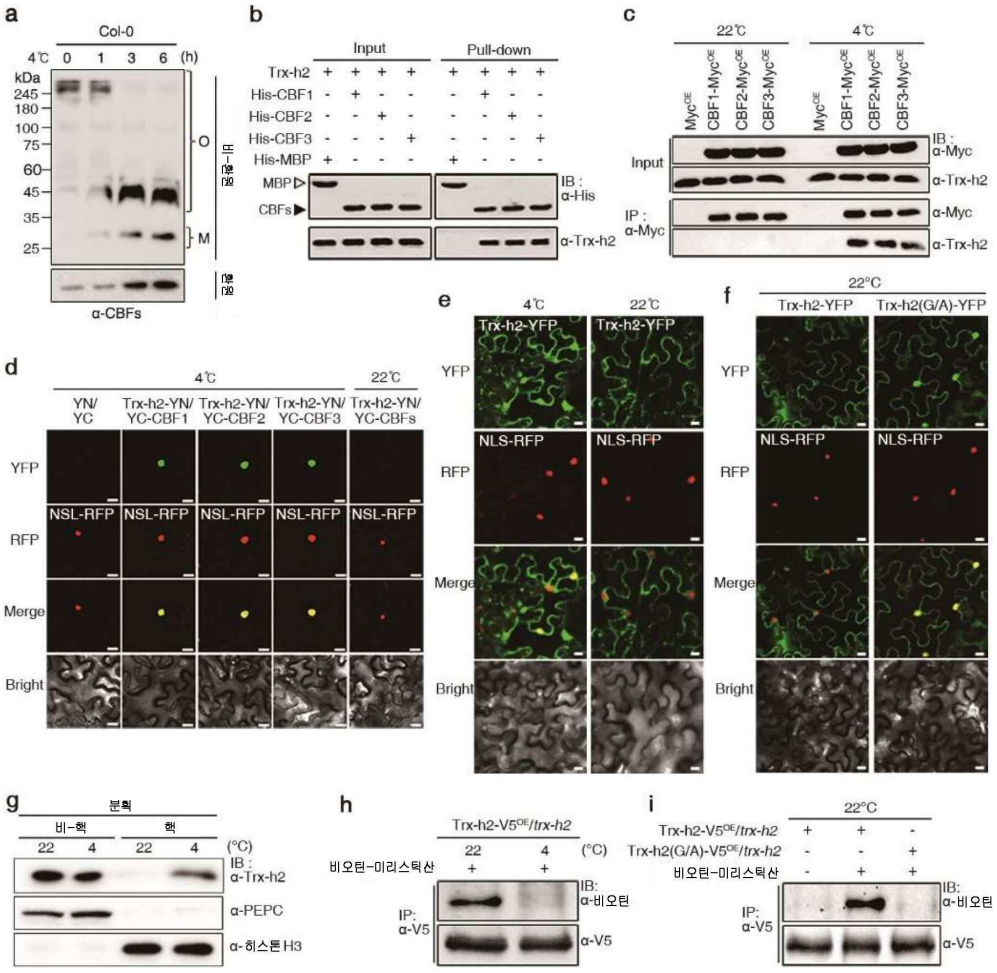
프라이머	서열 **(5'→3')**
attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCCAT
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
CBF1 F	ATGAACTCATTTTCAGCTTTTTCTGAA
CBF1 R	TTAGTAACTCCAAAGCGACACGTC
CBF1 attB1 F	AAAAAGCAGGCCATATGAACTCATTTTCAG
CBF1 attB1 R	AGAAAGCTGGGTTAGTAACTCCAAAGCGAC
CBF2 F	ATGAACTCATTTTCTGCCTTTTCTGA
CBF2 R	TTAATAGCTCCATAAGGACACGTCATC
CBF2 attB1 F	AAAAAGCAGGCCATATGAACTCATTTTCTG
CBF2 attB1 R	AGAAAGCTGGGTTAATAGCTCCATAAGGAC
CBF3 F	ATGAACTCATTTTCTGCTTTTTCTGAAA
CBF3 R	TTAATAACTCCATAACGATACGTCGTCAT
CBF3 attB1 F	AAAAAGCAGGCCATATGAACTCATTTTCTG
CBF3 attB1 R	AGAAAGCTGGGTTAATAACTCCATAACGAT
시험관 내 풀-다운 에세이를 위한 컨스트럭트용 프라이머	
Trx-h2 F (*BamH*I)	GGATCCAATGGGAGGAGCTTTATCA
Trx-h2 R (*Hind*III)	AAGCTTTTATGCTCTGAGTTTGCTAACTTT
CBF1 F (*EcoR*I)	GAATTCATGAACTCATTTTCAGCT
CBF1 R (*Hind*III)	AAGCTTTTAGTAACTCCAAAGCGA
CBF2 F (*EcoR*I)	GAATTCATGAACTCATTTTCTGCCT
CBF2 R (*Hind*III)	AAGCTTTTAATAGCTCCATAAGGACAC
CBF3 F (*EcoR*I)	GAATTCATGAACTCATTTTCTGCTT
CBF3 R (*Hind*III)	AAGCTTTTAATAACTCCATAACGAT
점-변환된 **CBF1** 을 위한 컨스트럭트용 프라이머	
CBF1 C23, 30S F	AGTCCGACGTTGGCCACGAGTAGT
CBF1 C23, 30S R	ACTACTCGTGGCCAACGTCGGACT
CBF1 C100S F	CAAGTCTCAACTTCGCTGACT
CBF1 C100S R	AGTCAGCGAAGTTGAGACTTG
CBF1 C117S F	AGCGCCAAGGATATCCAAA
CBF1 C117S R	TTTGGATATCCTTGGCGCT

[0188]

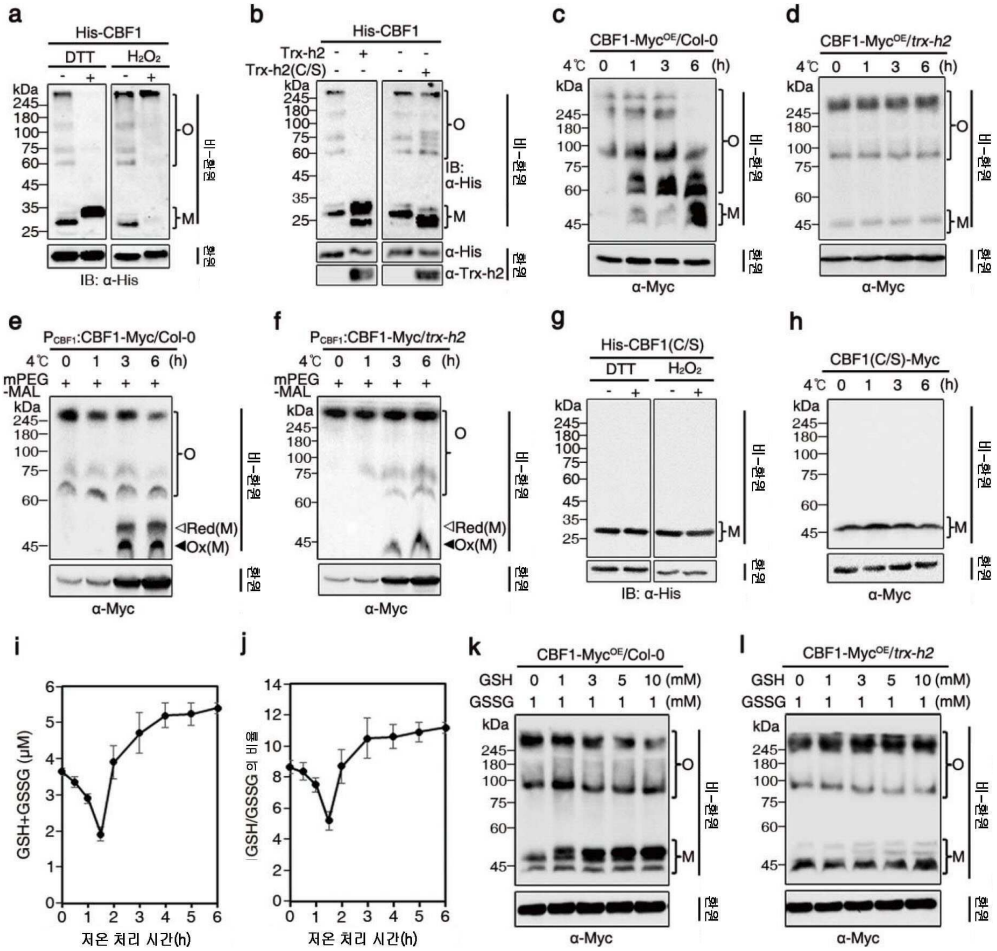
프라이머	서열 **(5'→3')**
CBF1 C137S F	CGAGTGATACGACGACCA
CBF1 C137S R	TGGTCGTCGTATCACTCG
EMSA 에세이를 위한 컨스트럭트용 프라이머	
CRT/DRE F'	ATTTCATGGCCGACCTGCTTTTT
CRT/DRE R'	AAAAAGCAGGTCGGCCATGAAAT
일시적인 트랜스액티베이션 에세이를 위한 컨스트럭트용 프라이머	
P_{COR15a} F	TATTTCATATTGAATTAGGAGATGTTACTG
P_{COR15a} R	GAAGCTGCTCTGCTTGGCTC
P_{COR15a} attB1 F	AAAAAGCAGGCCATTATTTCATATTGAAT
P_{COR15a} attB2 R	AGAAAGCTGAAGCTGCTCTGCTT

도면

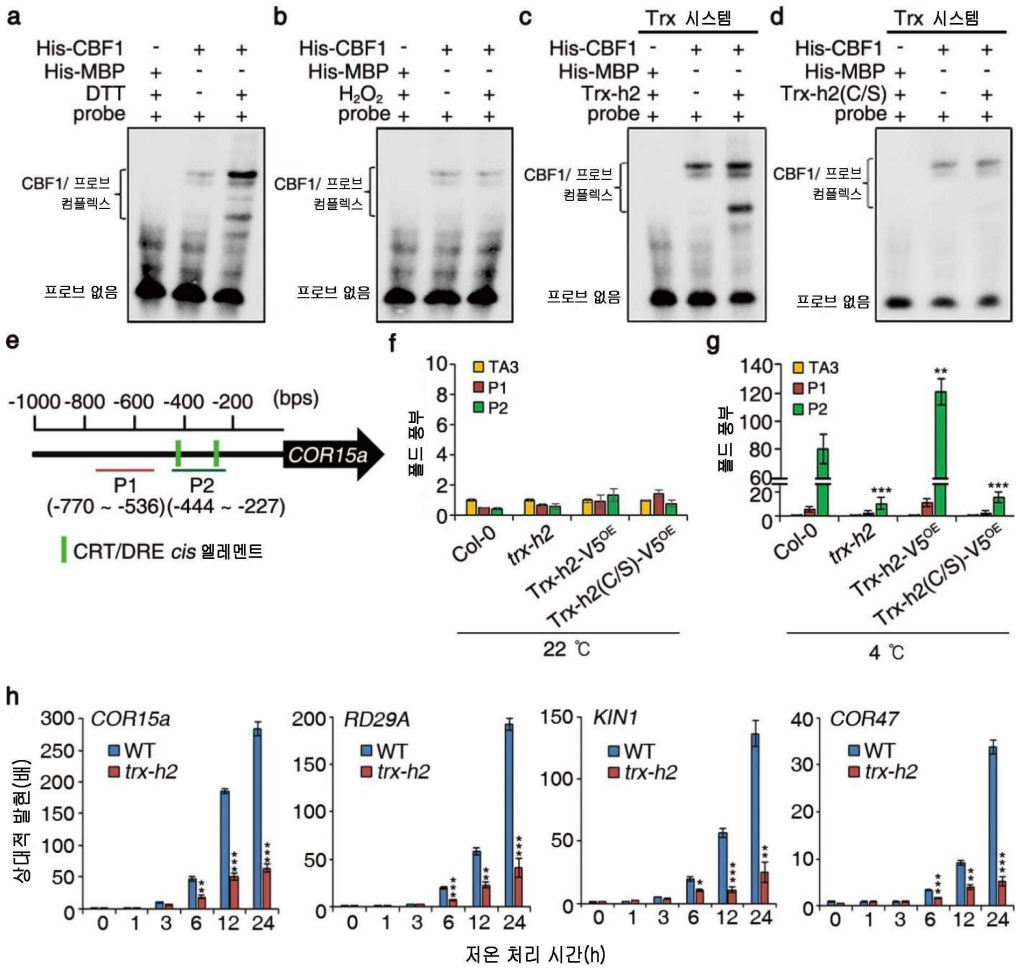
도면1


a
Col-0
4℃ 0 1 3 6 (h)
kDa
245
180
100
75
60
45
35
25
O
M
α-CBFs
b
Input
Pull-down
Trx-h2
His-CBF1
His-CBF2
His-CBF3
His-MBP
MBP
CBFs
IB : α-His
α-Trx-h2
c
22℃
4℃
Myc^OE
CBF1-Myc^OE
CBF2-Myc^OE
CBF3-Myc^OE
Input
IP : α-Myc
IB : α-Myc
α-Trx-h2
d
4℃
22℃
YN/YC
Trx-h2-YN/YC-CBF1
Trx-h2-YN/YC-CBF2
Trx-h2-YN/YC-CBF3
Trx-h2-YN/YC-CBFs
YFP
RFP
Merge
Bright
NSL-RFP
e
4℃
22℃
Trx-h2-YFP
NLS-RFP
f
22°C
Trx-h2-YFP
Trx-h2(G/A)-YFP
g
분획
비-핵
핵
(°C)
IB : α-Trx-h2
α-PEPC
α-히스톤 H3
h
Trx-h2-V5^OE/trx-h2
비오틴-미리스틱산
IP: α-V5
IB: α-비오틴
α-V5
i
Trx-h2-V5^OE/trx-h2
Trx-h2(G/A)-V5^OE/trx-h2
비오틴-미리스틱산
22°C

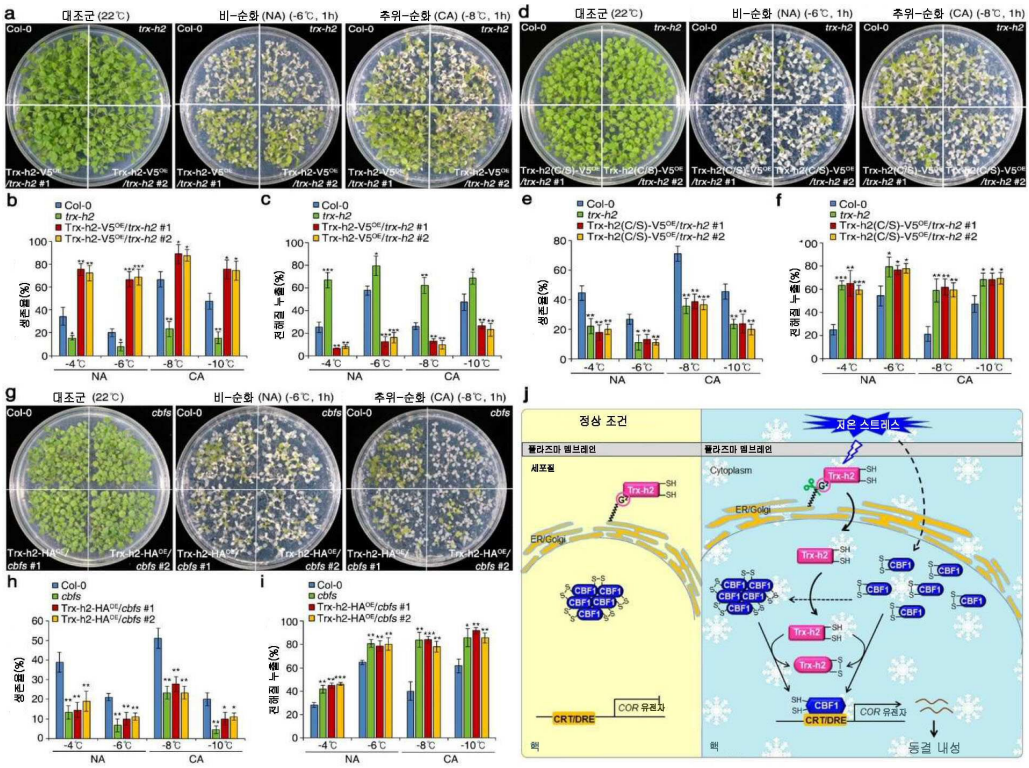
도면2


a
His-CBF1
DTT
H2O2
kDa
245
180
100
75
60
45
35
25
O
M
비-환원
환원
IB: α-His
b
His-CBF1
Trx-h2
Trx-h2(C/S)
IB: α-His
α-His
α-Trx-h2
c
CBF1-MycOE/Col-0
4℃ 0 1 3 6 (h)
α-Myc
d
CBF1-MycOE/trx-h2
α-Myc
e
PCBF1:CBF1-Myc/Col-0
mPEG -MAL
◁Red(M)
◀Ox(M)
α-Myc
f
PCBF1:CBF1-Myc/trx-h2
α-Myc
g
His-CBF1(C/S)
IB: α-His
h
CBF1(C/S)-Myc
α-Myc
i
GSH+GSSG (μM)
저온 처리 시간(h)
j
GSH/GSSG 의 비율
저온 처리 시간(h)
k
CBF1-MycOE/Col-0
GSH 0 1 3 5 10 (mM)
GSSG 1 1 1 1 1 (mM)
α-Myc
l
CBF1-MycOE/trx-h2
α-Myc

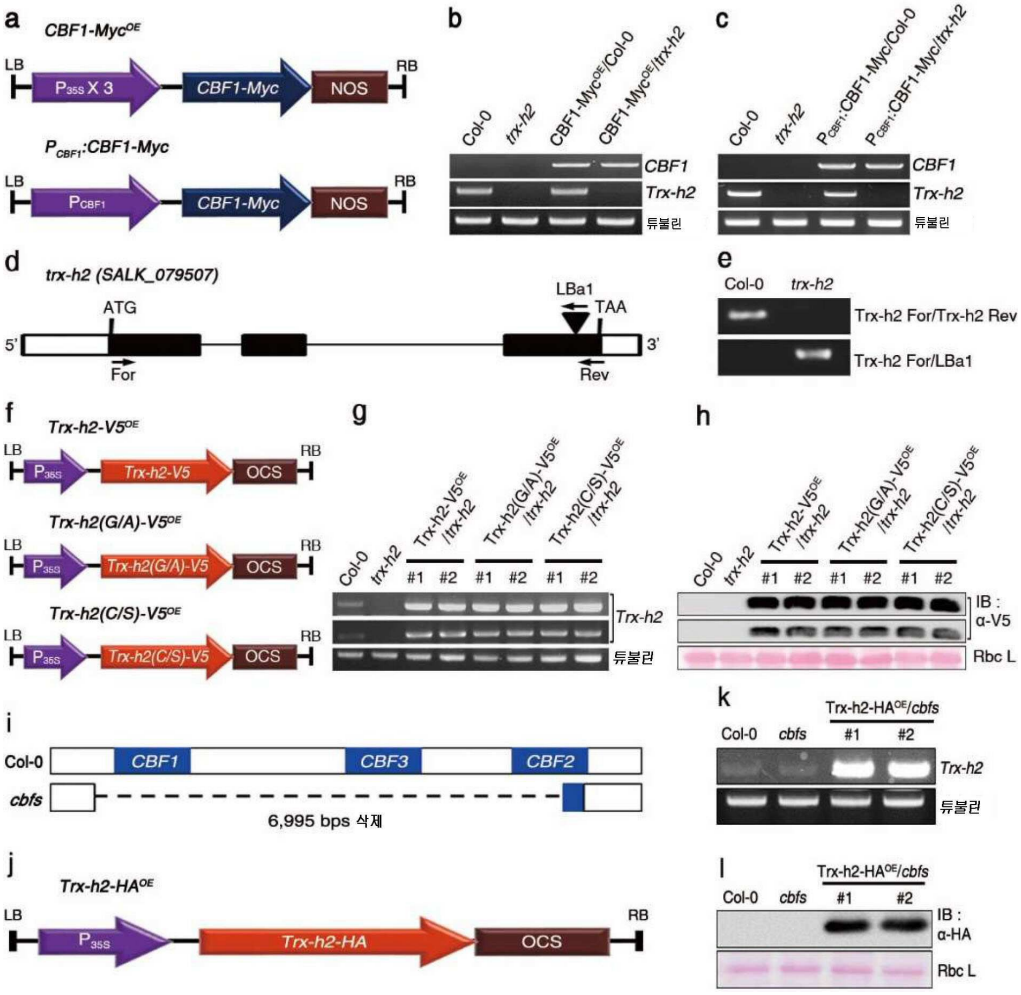
도면3


a
b
c
d
Trx 시스템
His-CBF1
His-MBP
DTT
H2O2
Trx-h2
Trx-h2(C/S)
probe
CBF1/ 프로브 컴플렉스
프로브 없음
e
-1000 -800 -600 -400 -200 (bps)
COR15a
P1
P2
(-770 ~ -536)(-444 ~ -227)
CRT/DRE cis 엘레멘트
f
g
TA3
P1
P2
볼드 봉파
Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE
Trx-h2(C/S)-V5OE
22 ℃
4 ℃
h
COR15a
RD29A
KIN1
COR47
WT
trx-h2
상대적 발현(배)
저온 처리 시간(h)

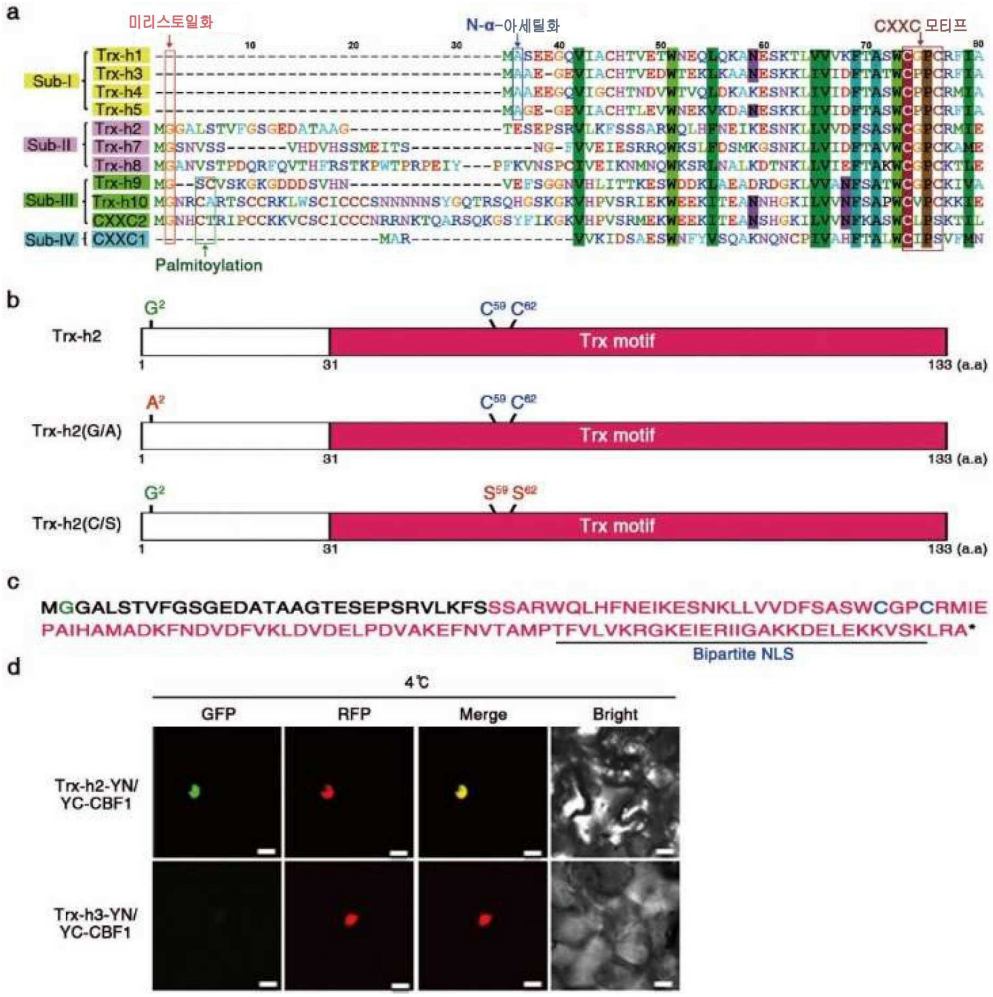
도면4


a
대조군 (22℃)
비-순화 (NA) (-6℃, 1h)
추위-순화 (CA) (-8℃, 1h)
Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE /trx-h2 #1
Trx-h2-V5OE /trx-h2 #2
b
c
d
Trx-h2(C/S)-V5OE /trx-h2 #1
Trx-h2(C/S)-V5OE /trx-h2 #2
e
f
g
cbfs
Trx-h2-HAOE/ cbfs #1
Trx-h2-HAOE/ cbfs #2
h
i
생존율(%)
전해질 누출(%)
-4℃
-6℃
-8℃
-10℃
NA
CA
j
정상 조건
저온 스트레스
플라즈마 멤브레인
세포질
Cytoplasm
ER/Golgi
Trx-h2
SH
CBF1
CRT/DRE
COR 유전자
핵
동결 내성

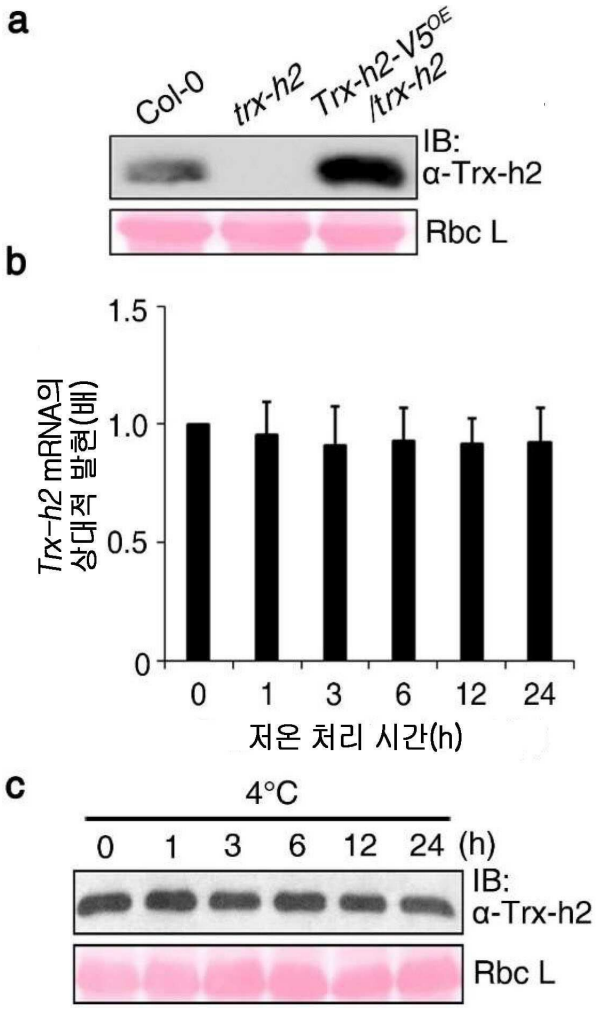
도면5


a
CBF1-Myc^OE
LB
P35S X 3
CBF1-Myc
NOS
RB
P_CBF1:CBF1-Myc
P_CBF1
b
Col-0
trx-h2
CBF1-Myc^OE/Col-0
CBF1-Myc^OE/trx-h2
CBF1
Trx-h2
튜불린
c
P_CBF1:CBF1-Myc/Col-0
P_CBF1:CBF1-Myc/trx-h2
d
trx-h2 (SALK_079507)
ATG
TAA
LBa1
5'
3'
For
Rev
e
Trx-h2 For/Trx-h2 Rev
Trx-h2 For/LBa1
f
Trx-h2-V5^OE
Trx-h2(G/A)-V5^OE
Trx-h2(C/S)-V5^OE
P35S
Trx-h2-V5
Trx-h2(G/A)-V5
Trx-h2(C/S)-V5
OCS
g
Trx-h2-V5^OE/trx-h2
Trx-h2(G/A)-V5^OE/trx-h2
Trx-h2(C/S)-V5^OE/trx-h2
#1
#2
h
IB : α-V5
Rbc L
i
Col-0
CBF1
CBF3
CBF2
cbfs
6,995 bps 삭제
j
Trx-h2-HA^OE
Trx-h2-HA
k
Trx-h2-HA^OE/cbfs
l
IB : α-HA

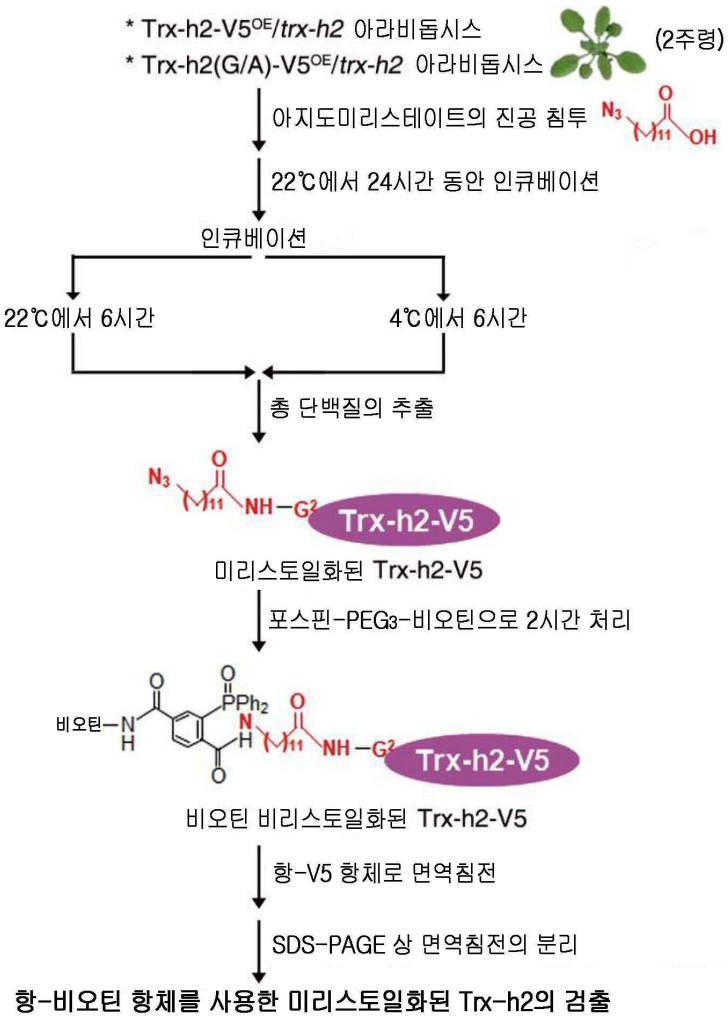
도면6


a
미리스토일화
N-α-아세틸화
CXXC 모티프
Sub-I
Trx-h1
Trx-h3
Trx-h4
Trx-h5
Sub-II
Trx-h2
Trx-h7
Trx-h8
Sub-III
Trx-h9
Trx-h10
CXXC2
Sub-IV
CXXC1
Palmitoylation
b
Trx-h2
G2
C59 C62
Trx motif
1
31
133 (a.a)
Trx-h2(G/A)
A2
Trx-h2(C/S)
S59 S62
c
MGGALSTVFGSGEDATAAGTESEPSRVLKFSSARWQLHFNEIKESNKLLVVDFSASWCGPCRMIE
PAIHAMADKFNDVDFVKLDVDELPDVAKEFNVTAMPTFVLVKRGKEIERIIGAKKDELEKKVSKLRA*
Bipartite NLS
d
4℃
GFP
RFP
Merge
Bright
Trx-h2-YN/
YC-CBF1
Trx-h3-YN/
YC-CBF1

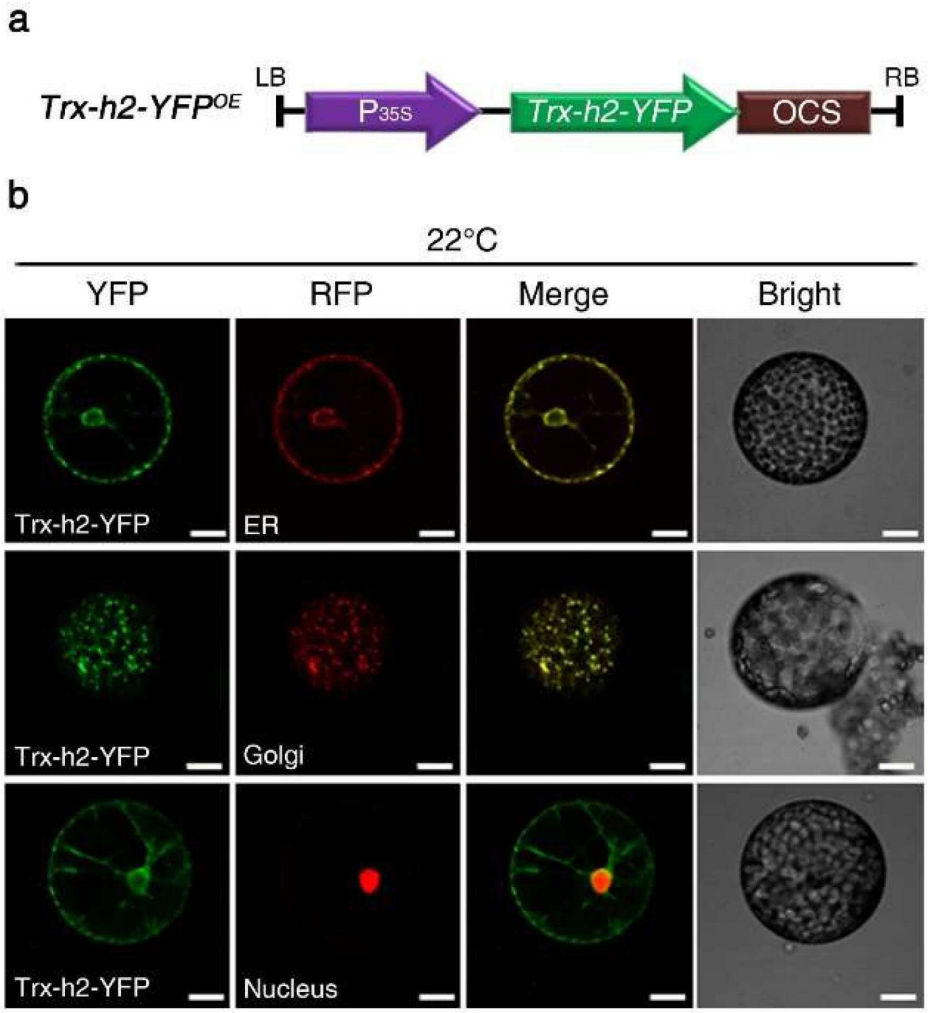
도면7


a
Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE /trx-h2
IB: α-Trx-h2
Rbc L
b
Trx-h2 mRNA의 상대적 발현(배)
1.5
1.0
0.5
0
0 1 3 6 12 24
저온 처리 시간(h)
c
4°C
0 1 3 6 12 24 (h)
IB: α-Trx-h2
Rbc L

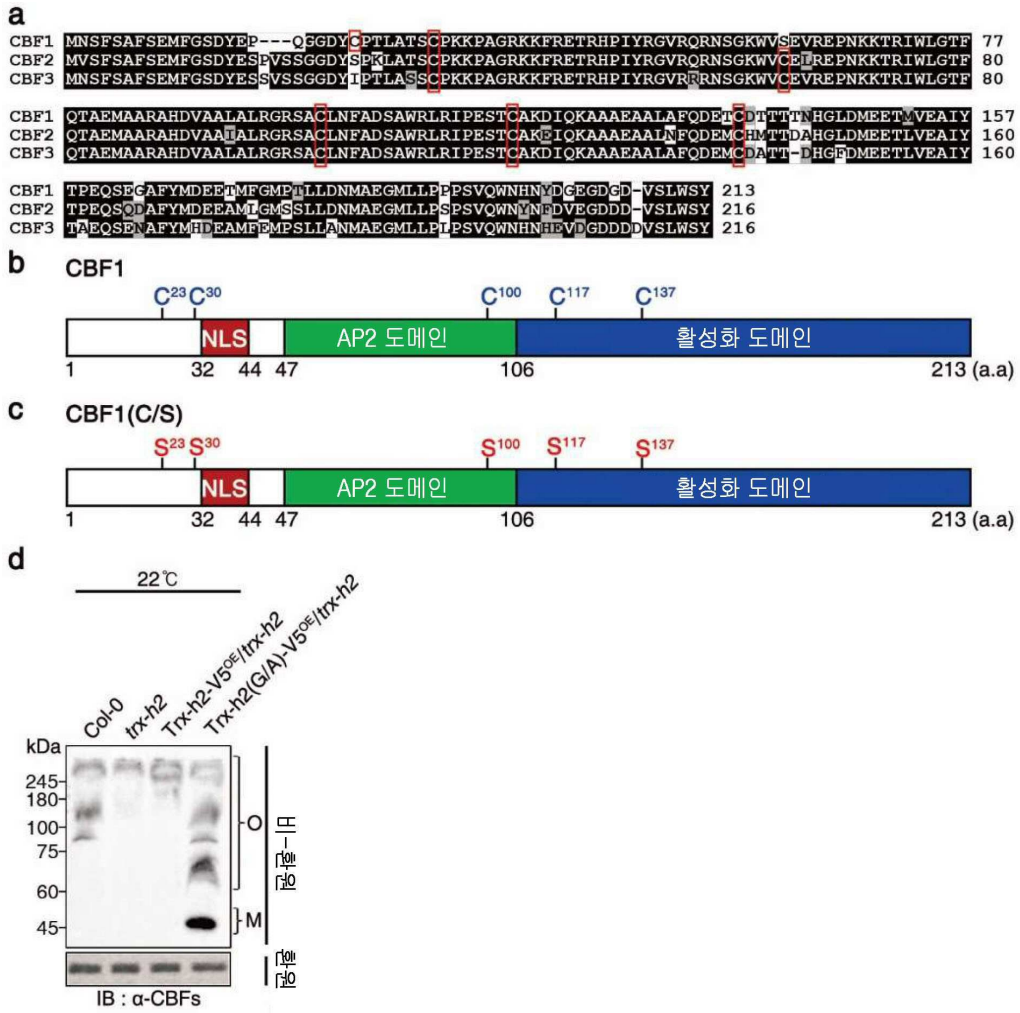
도면8


* Trx-h2-V5OE/trx-h2 아라비돕시스
* Trx-h2(G/A)-V5OE/trx-h2 아라비돕시스
(2주령)
아지도미리스테이트의 진공 침투
22℃에서 24시간 동안 인큐베이션
인큐베이션
22℃에서 6시간
4℃에서 6시간
총 단백질의 추출
Trx-h2-V5
미리스토일화된 Trx-h2-V5
포스핀-PEG3-비오틴으로 2시간 처리
비오틴
Trx-h2-V5
비오틴 미리스토일화된 Trx-h2-V5
항-V5 항체로 면역침전
SDS-PAGE 상 면역침전의 분리
항-비오틴 항체를 사용한 미리스토일화된 Trx-h2의 검출

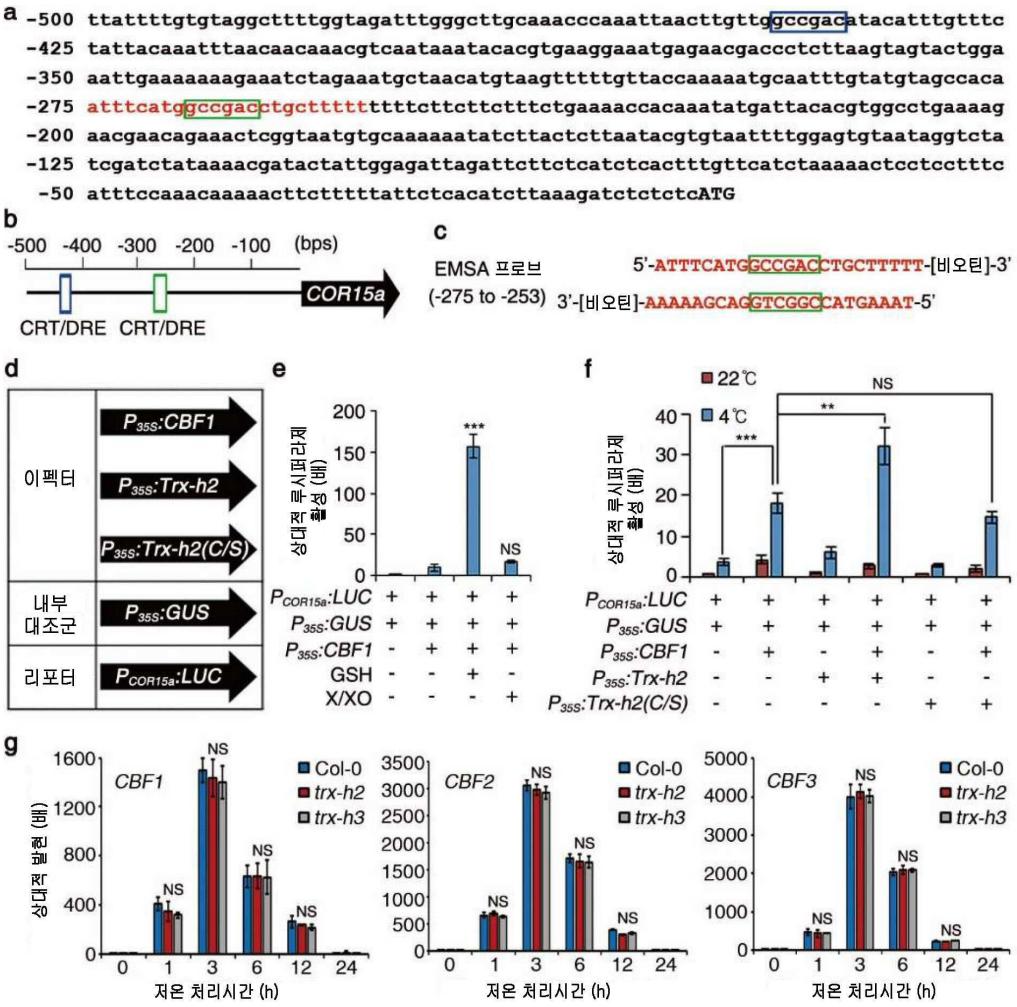
도면9


a
Trx-h2-YFPOE
LB
P35S
Trx-h2-YFP
OCS
RB
b
22°C
YFP
RFP
Merge
Bright
Trx-h2-YFP
ER
Trx-h2-YFP
Golgi
Trx-h2-YFP
Nucleus

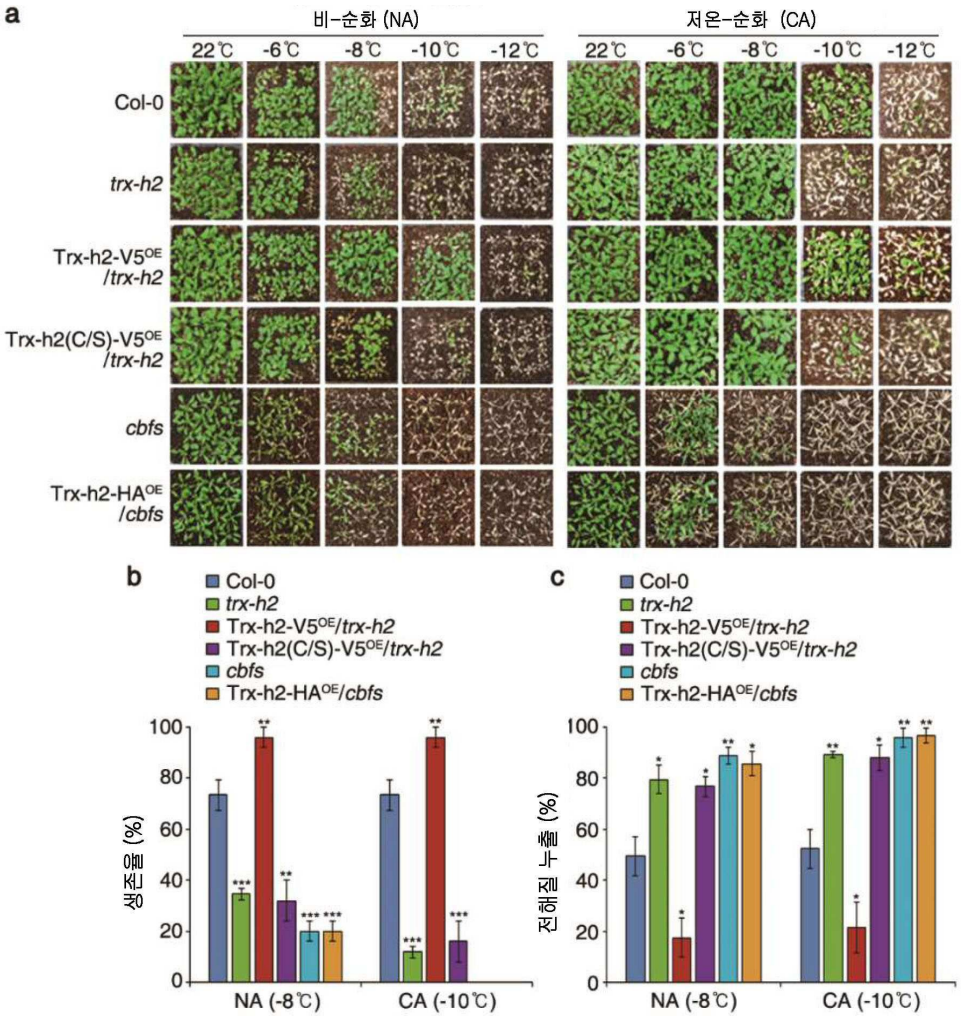
도면10


a
CBF1 MNSFSAFSEMFGSDYEP---QGGDYCPTLATSCPKKPAGRKKFRETRHPIYRGVRQRNSGKWVSEVREPNKKTRIWLGTF 77
CBF2 MVSFSAFSEMFGSDYESPVSSGGDYSPKLATSCPKKPAGRKKFRETRHPIYRGVRQRNSGKWVCELREPNKKTRIWLGTF 80
CBF3 MNSFSAFSEMFGSDYESSVSSGGDYIPTLASSCPKKPAGRKKFRETRHPIYRGVRRRNSGKWVCEVREPNKKTRIWLGTF 80
CBF1 QTAEMAARAHDVAALALRGRSACLNFADSAWRLRIPESTCAKDIQKAAAEAALAFQDEICDTTTTNHGLDMEETMVEAIY 157
CBF2 QTAEMAARAHDVAAIALRGRSACLNFADSAWRLRIPESTCAKEIQKAAAEAAINFQDEMCHMTTDAHGLDMEETLVEAIY 160
CBF3 QTAEMAARAHDVAALALRGRSACLNFADSAWRLRIPESTCAKDIQKAAAEAALAFQDEMCDATT-DHGFDMEETLVEAIY 160
CBF1 TPEQSECAFYMDEETMFGMPTLLDNMAEGMLLPPPSVQWNHNYDGEGDGD-VSLWSY 213
CBF2 TPEQSQDAFYMDEEAMLGMSSLLDNMAEGMLLPSPSVQWNYNGDVEGDDD-VSLWSY 216
CBF3 TAEQSENAFYMHDEAMFPMPSLLANMAEGMLLPLPSVQWNHNHEVDGDDDDVSLWSY 216
b
CBF1
C23 C30
C100
C117
C137
NLS
AP2 도메인
활성화 도메인
1
32
44
47
106
213 (a.a)
c
CBF1(C/S)
S23 S30
S100
S117
S137
NLS
AP2 도메인
활성화 도메인
1
32
44
47
106
213 (a.a)
d
22℃
Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE/trx-h2
Trx-h2(G/A)-V5OE/trx-h2
kDa
245
180
100
75
60
45
O
M
IB : α-CBFs
비-환원
환원

도면11


a
-500 ttattttgtgtaggcttttggtagatttgggcttgcaaacccaaattaacttgttggccgacatacatttgtttc
-425 tattacaaatttaacaacaaacgtcaataaatacacgtgaaggaaatgagaacgaccctcttaagtagtactgga
-350 aattgaaaaaaagaaatctagaaatgctaacatgtaagtttttgttaccaaaaatgcaatttgtatgtagccaca
-275 atttcatggccgacctgctttttttttcttcttctttctgaaaaccacaaatatgattacacgtggcctgaaaag
-200 aacgaacagaaactcggtaatgtgcaaaaaatatcttactcttaatacgtgtaattttggagtgtaataggtcta
-125 tcgatctataaaacgatactattggagattagattcttctcatctcactttgttcatctaaaaactcctcctttc
-50 atttccaaacaaaaacttctttttattctcacatcttaaagatctctctcATG
b
-500 -400 -300 -200 -100 (bps)
COR15a
CRT/DRE CRT/DRE
c
EMSA 프로브
(-275 to -253)
5'-ATTTCATGGCCGACCTGCTTTTT-[비오틴]-3'
3'-[비오틴]-AAAAAGCAGGTCGGCCATGAAAT-5'
d
이펙터
P35S:CBF1
P35S:Trx-h2
P35S:Trx-h2(C/S)
내부 대조군
P35S:GUS
리포터
PCOR15a:LUC
e
상대적 루시퍼라제 활성 (배)
200
150
100
50
0
***
NS
PCOR15a:LUC + + + +
P35S:GUS + + + +
P35S:CBF1 - + + +
GSH - - + -
X/XO - - - +
f
22℃
4℃
NS
**
***
40
30
20
10
0
상대적 루시퍼라제 활성 (배)
PCOR15a:LUC + + + + + +
P35S:GUS + + + + + +
P35S:CBF1 - + - + - +
P35S:Trx-h2 - - + + - -
P35S:Trx-h2(C/S) - - - - + +
g
CBF1
CBF2
CBF3
Col-0
trx-h2
trx-h3
상대적 발현 (배)
NS
0 1 3 6 12 24
저온 처리시간 (h)

도면12



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Transgenic plant having cold resistance overexpressing thioredoxin Trx-h2 protein

<130> KP-1046

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Gly Gly Ala Leu Ser Thr Val Phe Gly Ser Gly Glu Asp Ala Thr
1 5 10 15

Ala Ala Gly Thr Glu Ser Glu Pro Ser Arg Val Leu Lys Phe Ser Ser

20 25 30

Ser Ala Arg Trp Gln Leu His Phe Asn Glu Ile Lys Glu Ser Asn Lys

35 40 45

Leu Leu Val Val Asp Phe Ser Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Met

50 55 60

Ile Glu Pro Ala Ile His Ala Met Ala Asp Lys Phe Asn Asp Val Asp

65 70 75 80

Phe Val Lys Leu Asp Val Asp Glu Leu Pro Asp Val Ala Lys Glu Phe

85 90 95

Asn Val Thr Ala Met Pro Thr Phe Val Leu Val Lys Arg Gly Lys Glu

100 105 110

Ile Glu Arg Ile Ile Gly Ala Lys Lys Asp Glu Leu Glu Lys Lys Val

115 120 125

Ser Lys Leu Arg Ala

130

<210> 2

<211> 213

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu

1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Asp Tyr Cys Pro Thr Leu Ala Thr Ser Cys Pro Lys

20 25 30

Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His Pro Ile Tyr

35 40 45

Arg Gly Val Arg Gln Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Ser Glu Val Arg

50 55 60

Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe Gln Thr Ala

65 70 75 80

Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala Leu Arg Gly

85 90 95

Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg Leu Arg Ile
100 105 110
Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala Ala Glu Ala
115 120 125
Ala Leu Ala Phe Gln Asp Glu Thr Cys Asp Thr Thr Thr Thr Asn His
130 135 140
Gly Leu Asp Met Glu Glu Thr Met Val Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu
145 150 155 160
Gln Ser Glu Gly Ala Phe Tyr Met Asp Glu Glu Thr Met Phe Gly Met

165 170 175
Pro Thr Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro Pro Pro
180 185 190
Ser Val Gln Trp Asn His Asn Tyr Asp Gly Glu Gly Asp Gly Asp Val
195 200 205
Ser Leu Trp Ser Tyr
210