(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0110438
(43) 공개일자 2012년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0028292
(22) 출원일자 2011년03월29일
심사청구일자 2011년03월29일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
한태룡
경기도 용인시 수지구 상현로 58, 금호베스트빌 251동 1803호 (상현동)
조만호
경기도 용인시 기흥구 금화로11번길 10, 금화마을 주공아파트 306동 403호 (상갈동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

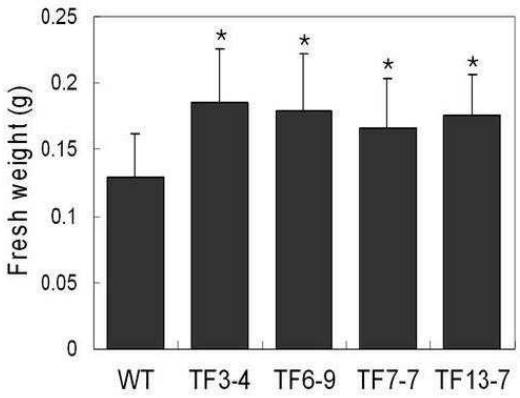
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **성장이 향상된 형질전환 식물체**

(57) 요 약

본 발명은 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자가 이중 과발현된 형질전환 식물체를 제공한다. 본 발명의 형질전환 식물체는 향상된 성장 속도, 광합성 능력 및 광합성산물의 분배 능력을 나타낸다. 따라서, 식량 작물의 생산속도 및 생산성이 우수하며, 농업 생산성 증가에 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도9



(72) 발명자

장아름

경기도 안양시 동안구 관악대로 135, 삼성래미안아파트 130동 2501호 (비산동)

부성희

경기도 용인시 기흥구 보라동 민속마을쌍용아파트 109동 1003호

전종성

경기도 안양시 동안구 학의로 390, 인덕원 대우아파트 110동 1001호 (평촌동)

특허청구의 범위

청구항 1

TPT (Triose phosphate/phosphate translocator) 유전자 및 cFBPase (cytosolic fructose-1,6-bisphospatase) 유전자가 이중 과발현된, 성장이 촉진된 형질전환 식물체.

청구항 2

제1항에 있어서, TPT 유전자는 서열번호 1에 기재된 애기장대 TPT 유전자인, 형질전환 식물체.

청구항 3

제1항에 있어서, cFBPase 유전자는 서열번호 2에 기재된 애기장대 cFBPase 유전자인, 형질전환 식물체.

청구항 4

제1항에 있어서, 도1에 기재된 TPT 유전자 발현 벡터 및 도4에 기재된 cFBPase 유전자 발현 벡터로 형질전환된, 형질전환 식물체.

청구항 5

제4항에 있어서, 아그로박테리움 투메시엔스를 매개로 형질전환되는, 형질전환 식물체.

청구항 6

제1항에 있어서, 형질전환되는 식물체가 애기장대인, 형질전환 식물체.

청구항 7

식물체에서 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자를 이중 과발현시킴으로써, 식물체의 성장을 촉진하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, TPT 유전자는 서열번호 1에 기재된 애기장대 TPT 유전자인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, cFBPase 유전자는 서열번호 2에 기재된 애기장대 cFBPase 유전자인 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 식물체에서 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자의 이중 과발현이 도1에 기재된 TPT 유전자 발현 벡터 및 도4에 기재된 cFBPase 유전자 발현 벡터로 식물체를 형질전환함으로써 달성되는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, TPT 유전자 발현 벡터 및 cFBPase 유전자 발현 벡터에 의한 형질전환은 아그로박테리움 투메시엔스를 매개로 달성되는 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 형질전환되는 식물체가 애기장대인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 성장이 향상된 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 2025년까지 80억명에 달할 것으로 예상되는 빠르게 성장하는 전세계 인구를 뒷받침하기 위하여 (Sakamoto and Matsuoka, 2004), 식량 생산 증가 및 곡물 생산성 향상이 요구되고 있다. 고등 식물에서, 녹색 잎은 광합성을 하지 않는 저장 조직으로 전달되는 당을 합성하는 광합성을 하는 공급 조직으로써 기능한다. 저장 조직은 전달된 당을 탄소와 에너지원으로 이용한다. 결과적으로, 잎에서의 광합성 및 탄소 대사는 식물 공급 능력 및 생산성의 결정인자인 것으로 여겨지고 있다.

[0003] 이와 관련하여, 잎에서 주된 탄소 대사에 관여하는 대사 유전자의 조작을 통한 식물 공급 능력을 향상시키고자 하는 많은 연구가 있어 왔다. 시아노박테리아 프럭토스-1,6-/세도헵툴로스-1,7-비스포스파타제 (fructose-1,6-/sedoheptulose -1,7-bisphosphatase: FBP/SBPase) 유전자를 담배식물체에 도입하여 그들의 광합성 능력을 향상시킨 예가 보고된 바 있다 (Miyagawa et al., 2001). 형질전환 담배 식물체의 엽록체에서 시아노박테리아 FBP/SBPase를 과발현시켜 광합성 능력 및 성장의 향상이 야기되었다. 옥수수에서 수크로스-포스페이트 신타제 (sucrose-phosphate synthase: SPS) 유전자의 발현이 빛 및 CO_2 포화 조건 하에서 형질전환 토마토의 광합성 속도의 증가를 초래하였음이 보고된 바 있으며, 이는 증가된 SPS 활성이 우호적 조건 하에서 광합성 능력을 향상시킨다는 것을 시사한다(Galtier et al., 1993).

[0004] 식물의 잎에서, 낮 동안 광합성산물은 엽록체로부터 트리오스 포스페이트(trioseP)의 형태로 세포질로 배출되거나 (Fliege et al., 1978), 또는 엽록체에 전분의 형태로 일시적으로 저장된다(Zeeman et al., 2002; Smith et al., 2003).

[0005] 세포질로 이동한 트리오스 포스페이트는 공급 조직과 저장 조직 사이의 광합성산물의 주된 운송 형태인 수크로스로 전환된다(van Bel 2003). 엽록체 내막에 위치하는 트리오스 포스페이트/포스페이트 트랜스로케이터(Triose phosphate/phosphate translocators: TPT)와 세포질 프럭토스-1,6-비스포스파타제 (cytosolic fructose-1,6-bisphospatase: cFBPase)는 광합성 산물의 수크로스로의 전환에 주된 요소이다 (Riesmeier et al., 1993; Zrenner et al., 1996; Lee et al., 2008). 낮 동안 광합성산물을 세포질로 이동시키는 경로로써, TPT 는 엽록체 스트로마 내의 트리오스 포스페이트와 세포질 Pi 의 상호교환을 중개한다 (Fliege et al., 1978). 안티센스 억제를 이용한 형질전환 토마토 및 담배식물, 그리고 애기장대 넉아웃 돌연변이체의 연구에서 TPT 발현의 감소가 낮 동안 잎에서 수크로스, 글루코스, 및 프럭토스의 수준 감소를 야기하는 것으로 보고된 바 있으며, 이는 광합성산물의 분배(photosynthetic carbon partitioning)에서 TPT의 역할의 중요성을 시사한다 (Riesmeier et al., 1993; Hausler et al., 2000; Schneider et al., 2002). 그러나, TPT 손상은 정상 성장 조건 하에서 형질전환 담배식물체, 애기장대(Arabidopsis)의 성장 표현형에 어떠한 영향도 나타내지 않았다 (Hausler et al., 2000; Schneider et al., 2002).

[0006] 광합성산물을 이용한 수크로스 합성과정에서, cFBPase는 프럭토스-1,6-비스포스페이트(F-1,6-P2)를 프럭토스-6-포스페이트(F-6-P)와 Pi로 전환하는 첫번째 비가역 반응을 촉매하고, 수크로스 생합성에서 중요한 조절 역할을 수행한다(Stitt, 1990; Daie, 1993). 형질전환 애기장대에서, cFBPase의 안티센스 억제는 수크로스 합성의 억제, 인산화된 중간체의 축적, 및 광합성 제한을 야기하는 것으로 보고되었으며(Strand et al., 2000), 형질전환 감자에서 cFBPase 활성의 감소는 광합성에 의한 수크로스 합성의 제한을 야기하는 것으로 보고되었다 (Zrennner et al., 1996). 이러한 변화에도 불구하고, cFBPase 감소는 식물 성장 또는 형질전환 감자에서 괴경 생산에 영향을 미치지 않는다.

[0007] 광합성산물의 대사에서 중요한 역할에도 불구하고, TPT 또는 cFBPase 중 어느 하나가 과발현된 형질전환 식물체는 성장에 있어 어떠한 표현형 상의 변화가 관찰되지 않는 것으로 보고되었다 (Hasler et al., 2000; Tamoi et al., 2005).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 성장이 촉진되고 광합성 능력 및 광합성산물의 분배가 향상된 형질전환 식물체를 제공하고자 한다.

[0009] 본 발명은 또한 식물체에 성장을 촉진하고, 광합성 능력 및 광합성산물의 분배를 향상시키는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제을 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자가 이중 과발현된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 식물체에서 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자를 이중 과발현시킴으로써 식물체의 성장을 촉진하고, 광합성 능력 및 광합성산물의 분배를 향상시키는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명자들은 TPT 유전자 또는 cFBPase 유전자 중 어느 하나가 과발현된 형질전환 식물체에서는 성장 표현형상에 변화가 없으나, TPT 유전자 및 cFBPase 유전자 모두가 이중 과발현되는 형질전환 애기장대 식물체는 광합성 능력 및 광합성산물의 분배가 향상될 뿐 아니라 성장 속도가 증가된다는 점을 처음으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0013] 본 발명은 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자가 이중 과발현된, 성장, 광합성 능력 및 광합성산물의 분배 능력이 향상된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0014] 본 발명의 형질전환 식물체는 TPT 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 cFBPase 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환되거나, TPT 유전자 및 cFBPase 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체로, 이는 TPT와 cFBPase를 모두를 과다 발현하도록 조작된 형질전환 식물체이다.

[0015] 바람직하게는, 상기한 TPT (Triose phosphate/phosphate translocator) 유전자는 애기장대 TPT 유전자이며, 애기장대 TPT 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열(AGI 번호: At5g46110)로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편 또는 변이체를 포함한다.

[0016] 바람직하게는, 상기한 cFBPase (cytosolic fructose-1,6-bisphospatase) 유전자는 애기장대 cFBPase 유전자이며, 애기장대 cFBPase 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열 (AGI 번호: At1g43670)로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편 또는 변이체를 포함한다.

[0017] 본 발명의 구현예로써, 본 발명은 애기장대 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자가 이중 과발현된, 성장, 광합성 능력 및 광합성산물의 분배 능력이 향상된 형질전환 애기장대 식물체를 제공한다.

[0018] 본원에서 사용되는 애기장대 TPT 유전자와 "기능적으로 동등한 절편"은 야생형 애기장대 TPT 단백질의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산이 결실 또는 절단된 폴리펩티드를 인코딩하며, 그 폴리펩티드가 야생형 애기장대 TPT 단백질과 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분을 의미한다.

[0019] 본원에서 사용되는 애기장대 cFBPase 유전자와 "기능적으로 동등한 절편"은 야생형 애기장대 cFBPase 단백질의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산이 결실 또는 절단된 폴리펩티드를 인코딩하며, 그 폴리펩티드가 야생형 애기장대 cFBPase 단백질과 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분을 의미한다.

[0020] 상기한 핵산의 절편은 서열번호 1 또는 2에 기재된 염기서열과 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지며, 이러한 핵산 절편은 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.

[0021] "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며, DNA를 복제하고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다.

[0022] "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현벡터는 진핵세포에서 이용가능한 하나 이상의 복제기점, 프로모터, 선택마커, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 서열을 포함할 수 있다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서, 발현 벡터는 재조합 DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입시, 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 게놈 내에 통합되는 것들을 포함한다.

[0023] 본원에서는, 형질전환되는 식물체에 도입되어 TPT, cFBPase 단백질을 발현할 수 있는 임의의 식물 발현 벡터가

이용가능하며, 이러한 재조합 식물 발현 벡터는 당업계에 알려진 통상적 기술을 이용하여 제작될 수 있다.

[0024] 본 발명에서 이용되는 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)가 현재 식물세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 이원(binary) 벡터이다.

[0025] 본 발명에 따른 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0026] 본 발명의 식물 발현 벡터는 또한 선택마커, 프로모터 및 터미네이터를 포함한다.

[0027] 본 발명에서 사용가능한 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate), 포스피노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서 사용가능한 프로모터는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터로서, CaMV35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, 히스톤 프로모터 등이 있으며, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터가 사용된다.

[0029] 본 발명에서 사용가능한 터미네이터는 당업계에서 통상적으로 사용되는 터미네이터일 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS) 터미네이터, 벼 a-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으며, 바람직하게는 NOS 터미네이터가 사용된다.

[0030] 본 발명에서 바람직한 TPT 과발현용 재조합벡터는 2개의 T-DNA 보더 사이에 하이그로마이신 항생제 저항성을 가지는 유전자, 바람직하게는, 하이그로마이신 B 포스포트랜스퍼라제 유전자(hygromycin B phosphotransferase gene), CaMV 35S 프로모터 및 노스(NOS) 터미네이터를 포함하고, 유전자가 프로모터와 작동가능하게 연결된 식물 발현 재조합벡터이다. 본 발명의 일 구현예에 따른 상기 벡터는 도 1에 기재된 TPT 과발현용 벡터이다.

[0031] 본 발명에서 바람직한 cFBPase 과발현용 재조합벡터는 2개의 T-DNA 보더 사이에 카나마이신 항생제 저항성을 가지는 유전자, 바람직하게는, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 II 유전자(neomycin phosphotransferase II gene), CaMV 35S 프로모터 및 노스(NOS) 터미네이터를 포함하고, 유전자가 프로모터와 작동가능하게 연결된 식물 발현 재조합벡터이다. 본 발명의 일 구현예에 따른 상기 벡터는 도 4에 기재된 cFBPase 과발현용 벡터이다.

[0032] 본 명세서에서 유전자와 프로모터가 작동가능하게 연결되었다고 함은 핵산 서열들이 이들의 의도된 기능을 수행하도록 연결된 상태를 지칭한다. 예를 들어, 프로모터 서열을 목적하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결시킨다는 것은 프로모터 서열이 목적하는 뉴클레오티드 서열의 전사를 지시할 수 있게 하는 방식으로 프로모터 서열과 목적하는 뉴클레오티드 서열을 연결하는 것을 의미한다.

[0033] 상기 재조합벡터는 당업계에 알려진 재조합 DNA 기술을 이용한 재조합 수단에 의하여 제조될 수 있다.

[0034] 상기한 재조합 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포; 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 임의의 식물 세포가 이용가능하다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 가능하다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다.

[0036] 숙주 세포에 대한 적당한 배양 배지 및 조건은 당업자에게 널리 알려져 있다. 본 발명에서는 식물체 형질전환

에 사용하기 위하여 아그로박테리움 속 미생물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0037] 본 발명은 또한 상기한 재조합 벡터로 형질전환된, 성장, 광합성 능력 및 광합성산물의 분배 능력이 향상된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0038] 본 발명의 재조합 벡터에 의한 식물체의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키기 위한 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 예를 들어, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호), 플로랄-딥 형질전환법(floral-dip transformation method; Clough SJ and Bent AF, 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J 16:735-43)등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 바람직하게는 아그로박테리움 매개 DNA 전달을 포함한다. 바람직하게는 플로랄-딥 형질전환법이 이용된다.

[0039] 아그로박테리움 벡터에 의한 식물체의 형질전환을 위한 최적 절차는 형질전환될 식물체의 종류에 따라 다양하다. 아그로박테리움 매개 형질전환을 위한 대표적인 방법은 멸균된 묘목 및/또는 작은 식물체로부터 유래된, 배축, 정단(shoot tip), 줄기, 잎 또는 꽃 조직의 외식편의 형질전환을 포함한다. 그와 같은 형질전환된 식물체는 유성생식으로 또는 세포 또는 조직 배양에 의해 번식될 수 있다. 아그로박테리움 매개 형질전환은 이전에 다수의 상이한 종류의 식물체를 위해 기재되었으며 그와 같은 형질전환을 위한 방법은 당업계에 공지된 문헌에서 찾을 수 있다.

[0040] 본 발명에서 사용가능한 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 이용되는 어떠한 균주라도 사용이 가능하다. 구체적으로 본 발명에서는, 식물시료에 침투하여 외래 유전자를 전달하는데 필요한 병원성이 큰 것으로 알려진 아그로박테리움 투메파시엔스, 더욱 바람직하게는 GV3101 계통의 아그로박테리움 투메파시엔스를 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 식물의 성장이 촉진될 수 있는 식물체로는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스 등을 포함하는 사료작물류가 포함된다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 식물의 성장이 촉진된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0043] 본 발명에 따른 식물의 성장이 촉진된 식물은 당업계의 통상적인 방법인 유성번식 방법 또는 무성번식 방법을 통해 수득할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 식물체는 꽃의 수분과정을 통하여 종자를 생산하고 상기 종자로부터 번식하는 과정인 유성번식을 통해 수득할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환한 다음 통상적인 방법에 따라 캘러스의 유도, 발근 및 토양 순화의 과정인 무성번식 방법을 통해 수득할 수 있다. 즉, TPT 유전자 및 cFBPase 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 식물의 절편체를 당업계에 공지된 적합한 배지에 치상한 다음 적정 조건으로 배양하여 캘러스의 형성을 유도하고, 신초가 형성되면 호르몬 무첨가 배지로 옮겨 배양한다. 약 2주 후 상기 신초를 발근용 배지에 옮겨서 뿌리를 유도한다. 뿌리가 유도된 다음 이를 토양에 이식하여 순화시킴으로써 발생 또는 분화가 촉진된 식물을 수득할 수 있다. 본 발명에서 형질전환 식물은 전체 식물체뿐만 아니라 그로부터 수득될 수 있는 조직, 세포 또는 종자를 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명은 또한 식물체에서 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자를 이중 과발현시킴으로써 식물체의 성장을 촉진하고, 광합성 능력 및 광합성산물의 분배를 향상시키는 방법을 제공한다. 식물체에서 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자를 과다 발현시키는 방법으로는 TPT 유전자 및/또는 cFBPase 유전자를 포함하는 식물체 또는 상기 유전자를 포함하고 있지 않은 식물체 내로 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자를 도입함으로써 수행될 수 있다.

상기 "유전자의 과다 발현"이란 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미한다. 식물체 내로 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자를 도입하는 방법으로는 프로모터의 조절을 받는 TPT 유전자가 포함된 발현벡터 및 cFBPase 유전자가 포함된 발현 벡터, 또는 이 둘 모두를 포함하는 발현벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 방법이 있다. 본 방법의 실시를 위하여 이용되는 유전자, 벡터, 숙주세포, 형질전환체 등에 관한 사항은 위의 형질전환 식물체에 관하여 기재된 것과 동일하다.

발명의 효과

[0045] 본 발명에 따른 TPT 유전자 및 cFBPase 유전자가 이중 과발현된 형질전환된 식물체는 성장 속도 및 정도가 향상하고, 광합성 능력 및 광합성산물의 분배 능력이 뛰어나다. 따라서, 식량 작물의 생산속도 및 생산성이 우수하며, 농업 생산성 증가에 기여할 수 있다

도면의 간단한 설명

[0046] 도1은 TPT 발현 벡터의 구조를 나타낸 그림이다.

도2는 TPT 발현 벡터로 형질전환된 애기장대 식물체의 노던 블롯 결과를 나타낸 그림이다.

도3은 24일 성장한 TPT 과발현 형질전환 애기장대 식물체의 표현형을 나타낸 그림이다.

도4는 cFBPase 발현 벡터의 구조를 나타낸 그림이다.

도5는 cFBPase 발현 벡터로 형질전환된 애기장대 식물체의 노던 블롯 결과를 나타낸 그림이다.

도6은 cFBPase 발현 벡터로 형질전환된 애기장대 식물체의 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 그림이다.

도7은 24일 성장한 TPT 및 cFBPase 이중 과발현 형질전환 애기장대 식물체의 표현형을 나타낸 그림이다.

도8은 TPT 및 cFBPase 이중 과발현 형질전환 애기장대 식물체의 성장과정 중 로제트의 직경 변화를 나타낸 그림이다.

도9는 24일 성장한 TPT 및 cFBPase 이중 과발현 형질전환 애기장대 식물체의 묘조의 생중량(shoot fresh weight)을 나타낸 그래프이다.

도10은 TPT 및 cFBPase 이중 과발현 형질전환 애기장대 식물체의 가용성 당 및 전분 함량을 나타낸 그래프이다 (10A: 낮, 밤 종료 시점의 잎의 수크로스 함량, 10B: 낮, 밤 종료 시점의 잎의 글루코스 함량, 10C: 낮, 밤 종료 시점의 잎의 프럭토스 함량, 10D: 낮, 밤 종료 시점의 잎의 헥소스-포스페이트 함량, 10E: 낮, 밤 종료 시점의 잎의 전분 함량).

도11은 TPT 및 cFBPase 이중 과발현 형질전환 애기장대 식물체의 광합성 능력을 나타낸 그래프이다 (도 11A: CO_2 동화 속도 측정 결과, 도 11B: $^{14}CO_2$ 주입시 생체 구성 성분의 ^{14}C 표지 측정 결과).

도12는 pPZP2Ha3(-) 벡터의 구조를 나타낸 그림이다.

도13은 pPZP211EX의 제작을 위해 사용된 pPZP211 벡터의 구조를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0048] [제조예]

[0049] **TPT 유전자 발현 벡터 및 cFBPase 유전자 발현 벡터의 구축**

[0050] 야생형 애기장대(Arabidopsis thaliana ecotype Columbia: Col-0)의 무균종자를 상토에 뿌리고, 23의 낮/밤 온도 및 100 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ 의 광세기를 갖는 16시간 광/8시간 암 주기 기후-통제 성장상에서 성장시켰다.

[0051] TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 앞서 키운 야생형 애기장대의 잎으로부터 전체 RNA를 얻었다. RT-PCR용 제1가닥 cDNA 합성 키트 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)를 이용하여 전체 RNA로부터 cDNA를 합성하였다.

[0052] 상기 합성된 제1가닥 DNA로부터 애기장대 TPT (At5g46110) 및 애기장대 cFBPase (At1g43670) 유전자를 얻기 위하여 전장 cDNA를 PCR-증폭하였다. 사용한 프라이머 서열은 아래 표와 같으며, TPT용 프라이머는 SalI 및 XbaI 제한효소부위를 포함하고, cFBPase용 프라이머는 KpnI 및 XbaI 제한효소부위를 포함하도록 디자인하였다 (서열 중 밑줄 친 부분).

[0053] [PCR용 프라이머]

[0054]

TPT용 프라이머	5′-GTCGACATGGAGTCACGCGTGCTGTTACGC-3′	센스
	5′-TCTAGACTATGCTTTCTTTCCTTGCCGTTT-3′	안티센스
cFBPase용 프라이머	5′-GGTACCATGGATCACGCAGCAGATGC-3′	센스
	5′-GGTACCATGGATCACGCAGCAGATGC-3′	안티센스

[0055] 생성된 PCR 산물을 각각 pGEMTM-T 이지 벡터 (Promega, Madison, WI)로 서브클로닝하였다. 서열확인 후, TPT 및 cFBPase 에 대한 각각의 전장 cDNA를 각각 발현벡터 pPZP2Ha3(-) (Takuchi Fuse et al., Plant Biotechnology, 18(3), pp.219-222, 2001) 및 pPZP211EX (Seok-Yoon Yoon et al., Journal of Plant Biology, 47(1), pp.42-47, March 2004) 내로 클로닝하였다. 상기 pPZP2Ha3(-) 벡터 및 pPZP211EX 벡터는 해당 논문의 저자로부터 직접 입수하였다. 참고로, 상기 벡터 pPZP211EX는 [Peter Hajdukiewiez et al., Plant Molecular Biology, 25, pp.989-994, 1994]에 기재된 이원벡터 pPZP211 내에 35S 프로모터와 NOS 터미네이터를 도입하여 제작된 것이다. 생성된 구축물을 아래와 같이 애기장대 형질전환을 위하여 사용하였다.

[0056] [실시예]

[0057] **TPT 유전자 및 cFBPase 유전자 이중 과발현 형질전환체의 제작**

[0058] **1. TPT 유전자 과발현 형질전환체의 제작 및 확인**

[0059] 앞서 제작한 애기장대 TPT 유전자 발현벡터를 전기천공을 통하여 아그로박테리움 투메파시엔스 GV3101 (Agrobacterium tumefaciens GV3101)내에 형질전환하였다. 상기 형질전환된 아그로박테리움 형질전환체를 가지고 플로랄-딥 방법(floral dip method: Clough and Bent 1998)을 이용하여 앞서 키운 야생형 애기장대의 형질전환을 수행하였다.

[0060] 종자를 수확한 후, 카나마이신을 포함하는 GM 플레이트(Gamborg B5 배지 함유) 상에서 배양하여 TPT를 과발현하는 형질전환체를 선별하였다.

[0061] 상기 제작한 애기장대 TPT 유전자 과발현 형질전환체의 무균종자를 상토에 뿌리고, 23℃의 낮/밤 온도 및 100 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ 의 광세기를 갖는 16시간 광/8시간 암 주기 기후-통제 성장상에서 성장시켰다.

[0062] 상기 형질전환 애기장대 식물체의 잎을 취하여 TRIzol 시약을 이용하여 전체 RNA 를 얻었다. 분리된 전체 RNA (35㎍)을 포름알데히드를 함유하는 1.3% 아가로스 젤 상에서 분리하고, HyBond N^+ 나일론 멤브레인(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)으로 이동시켰다.

[0063] RNA 젤 블롯에 대한 TPT용 프로브를 다음의 프라이머로 PCR-증폭하였다. PCR 증폭시 [a-32P] dCTP를 반응액에 첨가하여 PCR 반응으로 증폭되는 프로브를 32P dCTP로 표지하였다.

[0064] [노던 블롯 분석용 프로브용 프라이머]

[0065]

TPT용 프라이머	5′-TCACTGGATTCTTCTTCTTCATGT-3′
	5′-TATCAGTCATGGCTTTCTTGGAGA-3

[0066] 상기 HyBond N^+ 나일론 멤브레인을 앞서 제조한 [$a-^{32}P$] dCTP-표지 프로브와 혼성화시켰다(Lim et al., 2009). 타이푼 9210 포스포 이미지 분석기 (Typhoon 9210 phospho image analyzer: Amersham Biosciences)로 혼성화 신호를 기록하였다. 야생형 애기장대와 비교하여 높은 TPT 발현 수준을 나타내는 3개의 과발현 라인 (T3-3, T20-3, T24-2)를 선별하였다 (도2). 이렇게 얻은 애기장대 TPT 과발현 형질전환 식물체를 아래의 TPT 및 cFBPase 이중 과발현 형질전환 식물체의 제작 및 아래 실험예의 비교예로써 사용하였다.

[0067] **2. TPT 유전자 및 cFBPase 유전자 이중 과발현 형질전환체의 제작 및 확인**

[0068] 앞서 제조예에서 제작한 애기장대 cFBPase 유전자 발현벡터를 전기천공을 통하여 아그로박테리움 투메파시엔스 GV3101 (Agrobacterium tumefaciens GV3101) 내에 형질전환하였다. 상기 형질전환된 아그로박테리움 형질전환체를 가지고 플로랄-딥 방법(floral dip method: Clough and Bent 1998)을 이용하여 앞서 제작한 TPT 과발현 형질전환체 중 T3-3(도 2)의 형질전환 애기장대 식물체의 형질전환을 수행하였다.

[0069] 종자를 수확한 후, 하이그로마이신을 포함하는 GM 플레이트 상에서 배양하여 cFBPase를 과발현하는 형질전환체를 선별하였다. 이로써, TPT 및 cFBPase 모두를 과발현하는 형질전환 애기장대를 제작하였다.

[0070] 상기 제작한 애기장대 TPT 및 cFBPase 이중 과발현 형질전환체의 무균종자를 상토에 뿌리고, 23℃의 낮/밤 온도 및 100 μmol $m^{-2}s^{-1}$ 의 광세기를 갖는 16시간 광/8시간 암 주기 기후-통제 성장상에서 성장시켰다. 하기 실험을 위하여 상기 형질전환 식물체의 잎을 채취하였다.

[0071] RNA 젤 블롯에 대한 cFBPase용 프로브를 다음의 프라이머를 사용하여 제조한 것을 제외하고, 위와 동일한 방법으로 노던 블롯 분석을 수행하여 cFBPase 발현을 측정하였다.

[0072]

cFBPase용 프라이머	5′-GAAGATGAGGAAGCTACGTTTGTG-3′
	5′-TACAAGAAGATTCCTCCATAAAGT-3′

[0073] 야생형 애기장대와 비교하여 높은 cFBPase 발현 수준을 나타내는 4개의 발현 라인 (TF3-4, TF6-9, TF7-7, TF13-7)를 선별하였다 (도5).

[0074] 형질전환 애기장대 식물체의 TPT 및 cFBPase 단백질 발현 양상을 확인하기 위하여, 잎 시료를 분쇄한 후 포스페이트 버퍼 (50mM sodium phosphate, pH 7.8)를 이용하여 추출하였다. 추출액을 원심분리하여 조 단백질을 포함한 상등액을 수집하였다. 이렇게 얻은 조 단백질 추출물(5㎍)을 12% SDS-폴리아크릴아미드 젤 상에서 전개하였다. 대조군으로 야생형 식물체의 잎으로부터 얻은 조 단백질 추출물을 사용하였다. 전기영동 후, 단백질을 PVDF 멤브레인 (Invitrogen)으로 이동시켰다.

[0075] 상기 멤브레인을 애기장대 cFBPase에 대한 항체(Agrisera, Stockholm, Sweden)의 1:5000 희석물과 인큐베이션하였다. cFBPase 단백질을 HRP가 결합된 이차 토끼 항체로 면역염색하고, ECL 웨스턴 블롯팅 검출 시약 (Amersham Biosciences)을 이용하여 시각화하여 cFBPase의 과발현을 확인하였다 (도6).

[0076] [실험예]

[0077] **실험예 1. 형질전환된 애기장대의 성장 표현형 확인**

[0078] TPT 및 cFBPase 이중 과발현 애기장대 형질전환체(실시예)와 야생형 애기장대(대조군), 및 TPT 과발현 애기장대 형질전환체(비교예)와 야생형 애기장대의 성장 표현형을 성장상에서 키우며 비교하였다.

[0079] 표현형 분석 결과, TPT 과발현 애기장대 형질전환체(T3-3, T20-3, T24-2)는 야생형 애기장대와 유사한 성장을 나타냈다 (도 3). 이러한 결과는 TPT를 과발현하는 형질전환 담배식물이 야생형과 비교하여 어떤 표현형의 차이도 나타내지 않았다는 종래 보고(Hasler et al. 2000)와 일치한다. TPT 과발현이 이들 식물종에서 성장을 촉진할 수 없다는 것을 확인하였다.

[0080] TPT 및 cFBPase 이중 과발현 애기장대 형질전환체 (TF3-4, TF6-9, TF7-7, TF13-7)를 성장상에서 키우며, 로제트 직경을 모니터링하였다. 표현형 분석 결과, 이들 형질전환체들이 야생형과 비교하여 식물 생장 단계 동안 더 큰 로제트 크기를 나타냈으며, 이는 모든 형질전환체들이 야생형보다 빠르게 성장하는 것을 나타낸다 (도7). 24일된 식물에서, 이중 과발현 형질전환체들의 로제트 직경은 1.13 내지 1.39 배 더 컸다 (도8). 또한, 이중 과발현 형질전환체는 야생형과 비교하여 27-43%의 묘조 생중량 증가를 나타냈다 (도9). 이는 TPT 및 cFBPase 이중 과발현이 애기장대의 성장을 촉진하였다는 것을 확인한 것이다.

[0081] **실험예 2. 대사물질의 추출 및 분석**

[0082] 야생형 및 이중 과발현 애기장대 잎 약 0.1g 을 낮이 끝나는 시점 및 밤이 끝나는 시점에 채취하여 액체 질소 내에서 미세 분말로 분쇄하였다. 생성된 분말을 80℃에서 20분 동안 킬링 용액 (killing solution: 80% 에탄올, 20% 포름산) 1 ml 내에서 추출하였다. 원심분리 후, 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 펠렛을 80℃에서 20분 동안 80% 에탄올 1 ml 로 재추출하고, 이어서 원심분리하였다. 상층액을 앞서 추출로부터 얻은 상층액과 결

합하고, 농축기 내에서 증발시켰다. 추출물을 H_2O 500㎕ 내에 재현탁하고, 가용성 당 함량을 측정하는데 사용하였다.

[0083] 전분 함량을 측정하기 위하여, 상기 추출 과정으로부터 얻은 불용성 펠렛을 H_2O 500㎕ 내에 재현탁하고, 가압멸균기를 이용하여 121℃에서 3시간 동안 수화하였다. 수화된 상기 현탁물의 분취물 (50㎕)을 알파-아밀라제(alpha-amylase)와 아밀로글루코시다제(amyloglucosidase)를 이용하여 가용성 당으로 가수분해하였다. 가수분해된 가용성 당 용액을 전분 함량 측정에 사용하였다.

[0084] 당 함량을 CARY 300 바이오 UV/Vis 분광광도계 (Varian, Palo Alto, CA)를 이용하여 Stitt et al. (1989)에 의해 기재된 효소적 방법으로 결정하였다.

[0085] 이중 과발현 형질전환체, TF3-4, TF6-9의 잎에서 당의 함량은 낮이 끝나는 시점에 야생형 식물과 비교하여 각각 41 및 39% 증가하였음을 확인하였다 (도10A-C). 이는 당합성 속도가 저장 조직으로 배출 속도보다 더 큰 것을 의미한다. 이중 과발현 형질전환체에서 수크로스 수준 (도 10A), 글루코스 수준 (도 10B) 및 프럭토스 수준 (도 10C)이 낮이 끝나는 시점에 야생형과 비교하여 증가하였음을 확인하였다. 탄수화물 대사의 중간 산물인 헥소스-포스페이트 함량은 이중 과발현 형질전환체에서 밤이 끝나는 시점에서 약간 증가하였다(도10D). 또한, 이중 과발현 형질전환체에서 낮이 끝나는 시점에 전분 함량에 증가하였음을 확인하였다(도10E). 공급 잎의 가용성 당 및 녹말 함량의 증가는 형질전환 애기장대 잎에서 광합성 능력 및 광합성산물인 당으로의 효율적 전환의 증가를 반영한다.

[0086] **실험예 3. 형질전환 애기장대에서 광합성 능력 증가 확인**

[0087] **(1) CO_2 동화 속도 측정**

[0088] 400 μmol mol^{-1} 의 세포내 CO_2 농도에서 상이한 광세기로 애기장대의 성숙한잎의 광합성 활성을 LI-6400 포터블 광합성 측정 시스템 (Li-Cor, Lincoln, NE)을 이용하여 측정하였다. 오토매틱 인젝터로 이산화탄소를 펌핑하고, 빛은 잎 챔버에 부착된 LED 소스로부터 공급하였다.

[0089] 대기 CO_2 농도 (400 μ몰 $m^{-2}s^{-1}$)에서, 이중 과발현된 라인 TF3-4, TF6-9의 완전히 확장된 잎의 광합성에 의한 CO_2 동화 속도가 야생형과 비교하여 100 μ몰 $m^{-2}s^{-1}$ 광세기에서 각각 20 및 30% 증가하였음을 확인하였다 (도 11A). 이중 과발현 라인의 광합성 속도가 또한 증가된 광조건 (500 μ몰 $m^{-2}s^{-1}$) 하에서 24-39% 증가하였음을 확인하였다.

[0090] **(2) $^{14}CO_2$ 의 대사물질 내 주입 측정**

[0091] 5주령 애기장대를 25l 밀봉 챔버에 위치시켰다. 전조명(preillumination)을 필터 페이퍼(Whatman, Maidstone, UK)의 존재 하 150 μmol $m^{-2}s^{-1}$ 의 광세기로 15분 동안 수행하여 빛과 가스상 사이의 CO_2 평형을 확립하였다. 프로피온산 1 ml을 1 M $NaH_{14}CO_3$ 100㎕ 내로 주입하여 $^{14}CO_2$ 를 챔버 내로 확산시켰다. 소형 전기 팬을 이용하여 챔버내 공기를 순환시켰다. ^{14}C 표지를 150 μmol $m^{-2}s^{-1}$ 의 광세기로 15분 동안 수행하였다. 챔버를 15분 동안 대기로 세척하고, 식물을 2시간 동안 열린 챔버에서 인큐베이션하였다. 식물체의 지상부를 수확하고, 액체 질소에서 동결시켰다. 식물 시료를 분쇄한 후 80℃에서 20분 동안 에탄올 500㎕로 3회 추출하고, 이어서 가용성 및 불용성 분획을 분리하였다. 가용성 및 불용성 분획의 방사능을 LS7000 액체 섬광계수기(Beckman, Fullerton, CA)로 결정하였다.

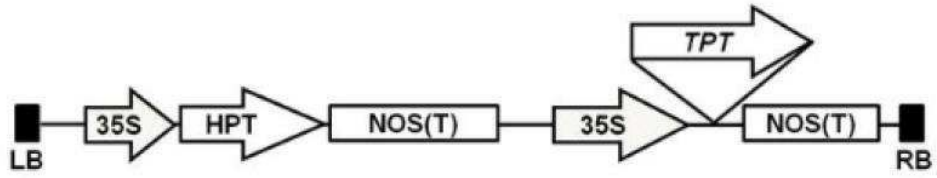
[0092] $^{14}CO_2$ 표지 실험을 통해 이중 과발현 라인에서 세포 성분 내 고정된 ^{14}C의 양이 증가하였음을 확인하였다 (도 11B). 가용성 당을 포함하는 가용성 분획에서 ^{14}C 표지가 형질전환체, TF3-4, TF6-9에서 각각 69% 및 59% 증가하였음을 확인하였다. 전분을 대표하는 불용성 분획 내 $^{14}CO_2$ 주입은 야생형과 비교하여 30-67% 증가하였음을 확인하였다.

[0093] 상기 CO_2 동화 속도 및 $^{14}CO_2$ 표지 실험을 통해 TPT 및 cFBPase 이중 과발현이 광합성 능력을 향상시켰음을 확인

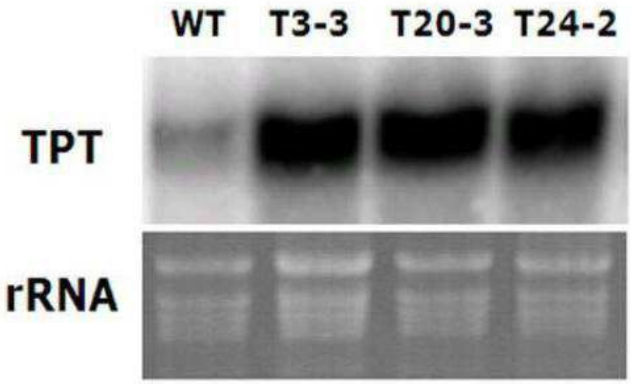
하였다.

도면

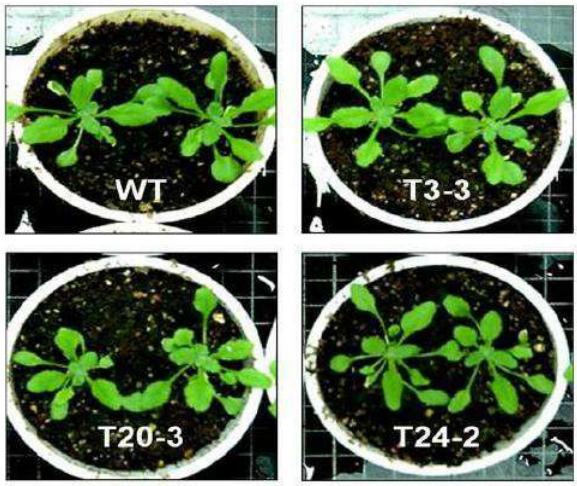
도면1



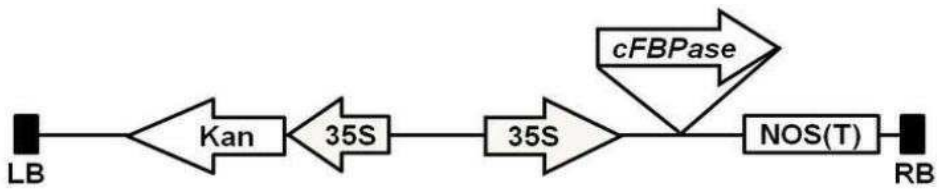
도면2



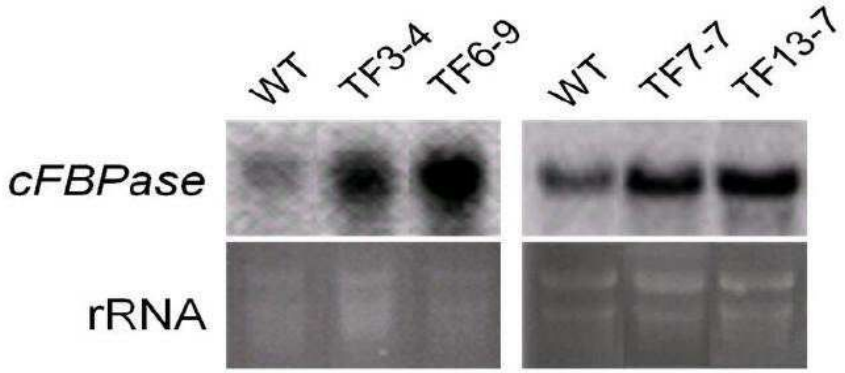
도면3



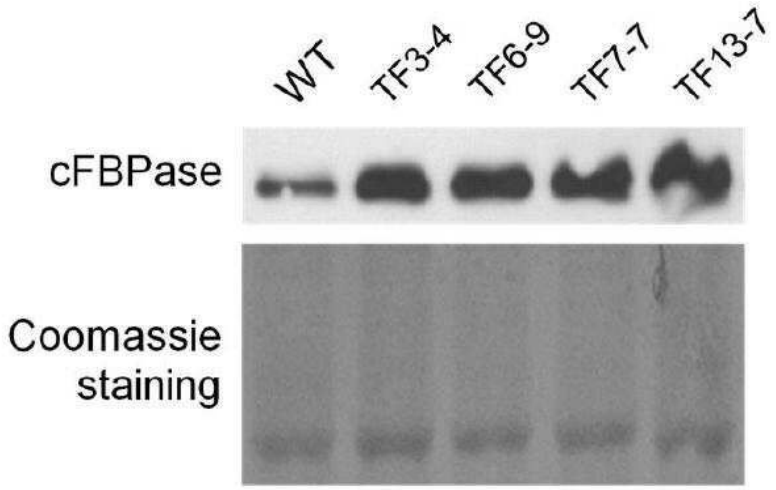
도면4



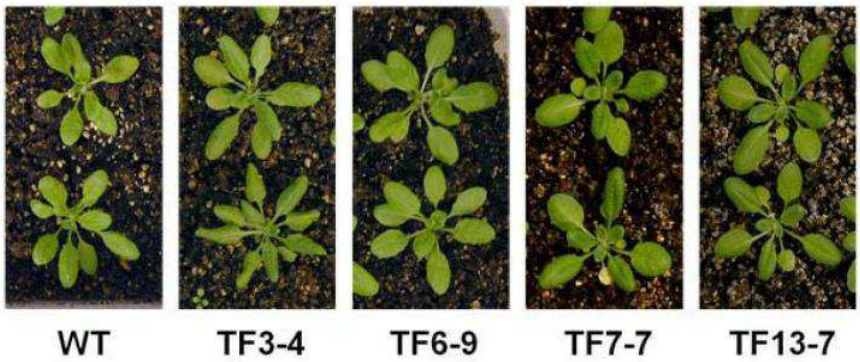
도면5


WT
TF3-4
TF6-9
WT
TF7-7
TF13-7
cFBPase
rRNA

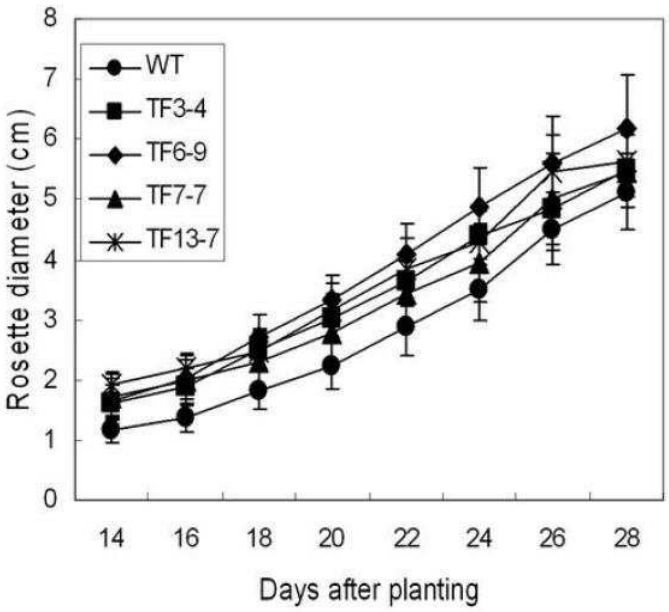
도면6


WT
TF3-4
TF6-9
TF7-7
TF13-7
cFBPase
Coomassie staining

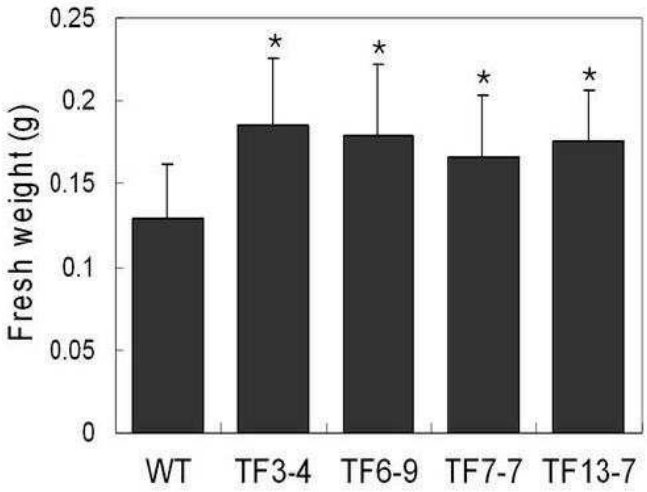
도면7


WT
TF3-4
TF6-9
TF7-7
TF13-7

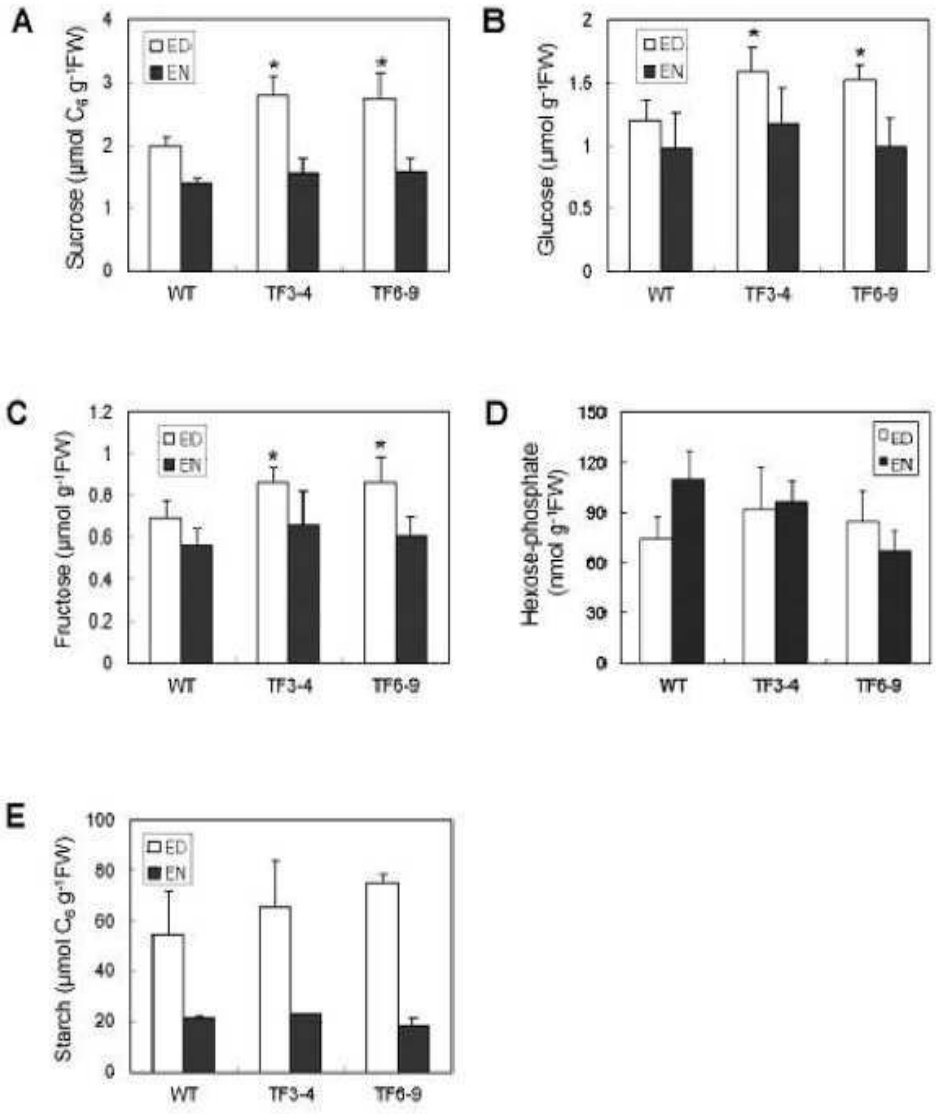
도면8


WT
TF3-4
TF6-9
TF7-7
TF13-7
Rosette diameter (cm)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
14
16
18
20
22
24
26
28
Days after planting

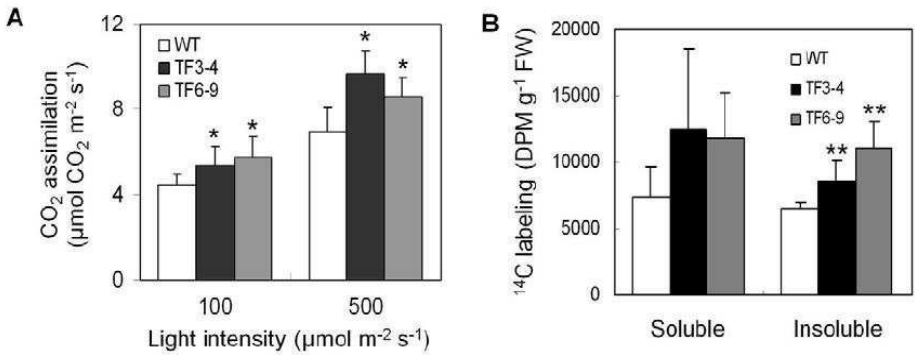
도면9


Fresh weight (g)
0
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
*
*
*
*
WT
TF3-4
TF6-9
TF7-7
TF13-7

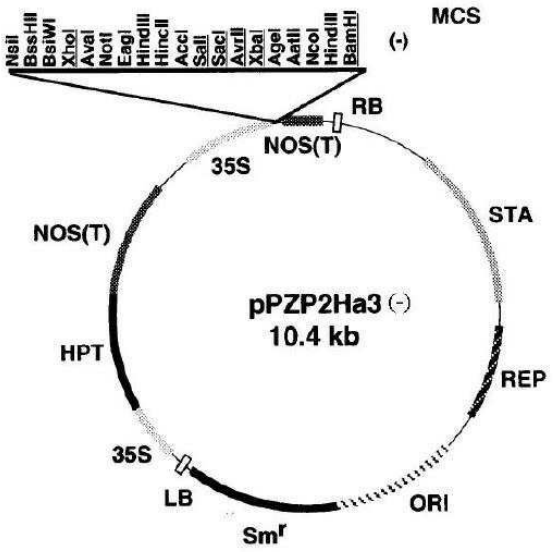
도면10


A
Sucrose (μmol C6 g-1FW)
ED
EN
WT
TF3-4
TF6-9
B
Glucose (μmol g-1FW)
C
Fructose (μmol g-1FW)
D
Hexose-phosphate (nmol g-1FW)
E
Starch (μmol C6 g-1FW)

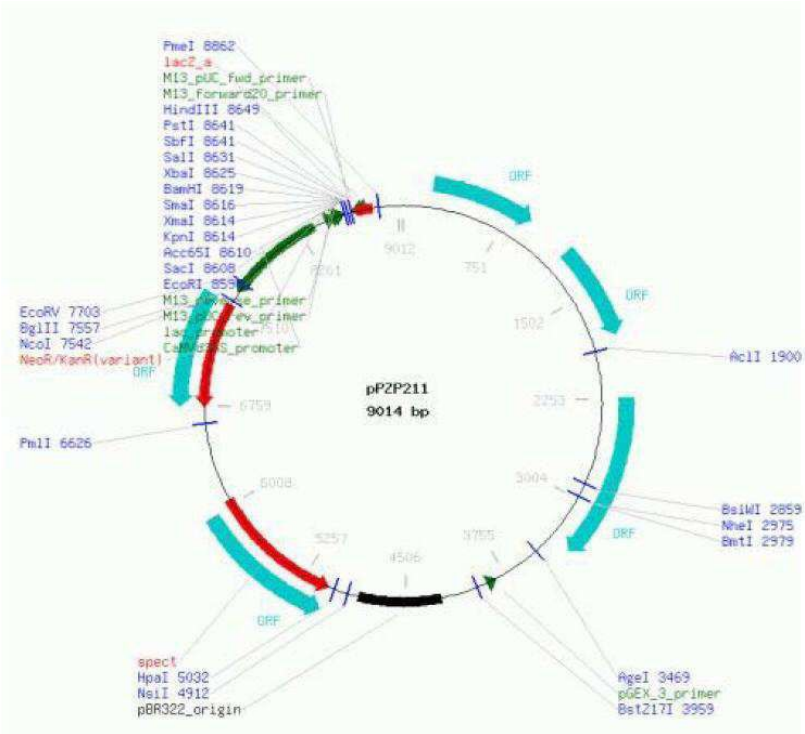
도면11


A
CO2 assimilation (μmol CO2 m-2 s-1)
WT
TF3-4
TF6-9
100
500
Light intensity (μmol m-2 s-1)
B
14C labeling (DPM g-1 FW)
Soluble
Insoluble

도면12



도면13



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> TRANSGENIC PLANT WITH ENHANCED GROWTH

<130> P11-016-KHU

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1248

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220><221> gene

<222> (1)..(1248)

<223> TPT gene

<400> 1

atggagtcac gcgtgctgtt acgcgccacc gcgaatgtcg ttggaattcc gaaattgaga 60

cgaccaatcg gagcgatcca ccgtcaattc agcactgcat cgtcttcctc gttctcggtt 120

aaaccaatcg gaggaatcgg agagggagcg aatctgatct ccggtcgtca gcttcgtcca 180

attcttcttc tcgattcgtc ggcgatcaac ggaggagaga aaagagaaat tctcaaaccg 240

gttaaagccg ccgctgctga aggtggagat accgctgggg atgctaaagt tggattcctc 300

gccaagtatc catggctagt cactggattc ttcttcttca tgtggtactt cttgaatgtg 360

attttcaaca tccttaacaa gaagatctat aattacttcc cttatcccta ttttgtatcg 420

gtgatacact tgttcgtggg agttgtttac tgcttgatca gctggtccgt gggtcttcct 480

aaacgtgccc cgattgactc gaacctcctc aaggtattga taccagtcgc agtctgtcac 540

gccttaggcc atgtcactag caatgtctct ttcgctgcgg ttgctgtctc cttcactcac 600

accatcaaag cacttgagcc attcttcaat gcggctgctt ctcaattcat tatgggacaa 660

tccatcccca taacactatg gttgtctcta gctcctgttg ttcttggtgt tgcaatggct 720

tcactaactg agctatcatt caactggctc ggtttcatca gtgctatgat atcaaacatt 780

tctttcactt accgaagcat cttctccaag aaagccatga ctgatatgga cagtacaaat 840

gtctacgctt acatctccat catcgcactc ttcgtctgca ttcctcctgc catcatcgtt 900

gaaggtccta aactacttaa ccatggtttc gccgacgcga ttgctaaagt tggaatgact 960

aaattcatct ctgatctctt ctgggttgga atgttttacc atctctacaa tcagctggct 1020

accaatacct tggagagggt tgcaccgctg actcacgcgg ttggaaacgt tctgaaacgt 1080

gtgttcgtga tcggtttctc catcgttatc ttcggaaaca agatatcgac acagacaggt 1140

ataggaacag gaatagccat tgctggagtt gcaatgtact ctatcattaa ggccaagatc 1200

gaagaagaga aacgggtcac aaggaaagaa agcatagaaa gcagctga 1248

<210> 2

<211> 1026

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220><221> gene

<222> (1)..(1026)

<223> cFBPase gene

<400> 2

atggatcacg cagcagatgc tcaccgtacg gatttgatga ccattacaag attcgtgttg 60

aatgaacaat caaagtatcc agaatctcgt ggtgatttca ccattttgct tagtcacatc 120

gttttgggtt gcaaattcgt ttgcagtgct gttaataagg ctggtttggc taagttaatt 180

ggacttgcag gggaaacaaa cattcagggt gaagagcaaa agaaacttga tgtgctctct 240

aatgatgtct ttgtcaacgc tttggttagc agtggtagaa cttctgttct tgtctcggag 300

gaagatgagg aagctacgtt tgtggagcca tccaagcgtg gaaagtactg tgttgttttt 360

gatccgcttg atggatcttc aaacattgac tgtggtgttt ccattggcac aatttttgga 420

atttacacgt tggaccacac tgatgagcca accactgcag atgttctgaa acctgggaat 480

gaaatggtgg ctgcaggtta ttgtatgtac ggaagctcct gcatgcttgt gttgagcact 540

ggaaccggtg tccacggatt tacactggac ccatctctag gagagttcat tctaactcac 600

ccggacatta agattccaaa taagggaaac atttattcgg tgaatgaagg caatgcgcag 660

aactgggatg gtccaactac aaagtatgta gagaaatgca agtttcctaa agatggttct 720

cctgcaaagt ctctgagata cgtaggaagt atggtagctg atgttcatcg tacactactt 780

tatggaggaa tcttcttgta cccggctgac aagaaaagcc ccaatggaaa attgcgtgtc 840

ttgtatgaag ttttcccgat gtcgtttttg atggagcaag ccggaggtca ggcctttacg 900

ggaaagaaaa gggcgctaga ccttgtcccg gagaagatcc atgagcgttc tccgatattt 960

cttggtagct acgatgatgt agaagagatt aaagctctct atgctgagga ggaaaagaag 1020

aactaa 1026