(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0042454
(43) 공개일자 2019년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8281 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0120559
(22) 출원일자 2018년10월10일
심사청구일자 2018년10월10일
(30) 우선권주장
1020170133770 2017년10월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
조만호
경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 14 108동 904호(상갈동, 금화마을대우현대1단지아파트)
부성희
경기도 용인시 기흥구 사은로126번길 10 109동 1003호 (보라동, 민속마을 쌍용아파트)
박혜린
경기도 수원시 영통구 덕영대로1681번길 16 103호 (영통동)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 14 항

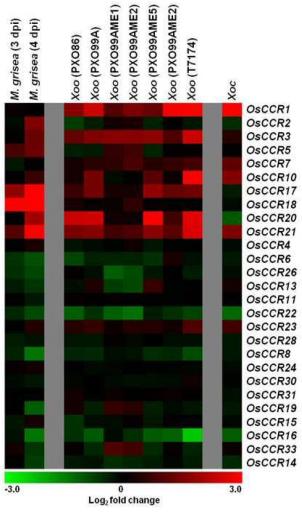
(54) 발명의 명칭 **OsCCR 유전자의 발현이 증진된 스트레스 저항성 형질전환 식물체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 Cinnamoyl-CoA reductase(OsCCR) 유전자의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된, 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체; 상기 형질전환 식물체의 제조방법; OsCCR 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 스트레스 저항성 증진용 조성물에 관한 것이다.

벼의 게놈으로부터 유래된 33개의 OsCCR 유전자 중 생화학적으로 기능성을 갖는 유전자를 발굴하였고, 특히 OsCCR 17 및 OsCCR 21 유전자가 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 식물체의 저항성 및 방어 기전에 관련이 있음을 확인하였는바, 상기 유전자의 활성 강화는 식물체의 스트레스 저항성 증진 목적으로 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01107501
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 시스템합성농생명공학사업단
연구사업명 차세대바이오그린21-시스템합성농생명공학사업
연구과제명 복합 스트레스 저항성 벼 개발을 위한 페닐프로파노이드 경로 유전자 기능 규명
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

Cinnamoyl-CoA reductase(OsCCR) 유전자의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된, 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 OsCCR 유전자는 OsCCR 17(LOC_Os09g04050) 또는 OsCCR 21(LOC_Os02g08420)인 것인, 식물체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 스트레스는 생물학적 스트레스 또는 비생물학적 스트레스인 것인, 식물체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 생물학적 스트레스는 *Magnaporthe grisea* 또는 *Xanthomonas oryzae*의 감염에 의해 유발되는 것인, 식물체.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 생물학적 스트레스는 벼 흰잎마름병 또는 벼 도열병인 것인, 식물체.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 비생물학적 스트레스는 냉해, 건조, 고염분 및 자외선 조사로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 식물체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 식물체는 벼인 것인, 식물체.

청구항 8

Cinnamoyl-CoA reductase(OsCCR) 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시키는 단계를 포함하는, 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 OsCCR 유전자는 OsCCR 17(LOC_Os09g04050) 또는 OsCCR 21(LOC_Os02g08420)인 것인, 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 스트레스는 흰잎마름병인 것인, 제조방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 식물체는 벼인 것인, 제조방법.

청구항 12

Cinnamoyl-CoA reductase(OsCCR) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 OsCCR 유전자는 OsCCR 17(LOC_Os09g04050) 또는 OsCCR 21(LOC_Os02g08420)인 것인, 재조합 벡터.

청구항 14

제12항 또는 13항의 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 스트레스 저항성 증진용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Cinnamoyl-CoA reductase(OsCCR) 유전자의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된, 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체; 상기 형질전환 식물체의 제조방법; OsCCR 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 스트레스 저항성 증진용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 식물은 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 의해 끊임없이 직면하게 되고, 이는 수확량의 현저한 감소로 이어진다. 가뭄, 염분 및 고온 등을 비롯한 비생물학적 스트레스는 작물 손실의 주된 요인이며, 주요 작물의 평균 수확량을 50% 이상 감소시킬 수 있다. 또한, 비생물학적 스트레스뿐만 아니라 병원균에 의한 감염 등 생물학적 스트레스는 곡물의 수확량을 심각하게 감소시킬 수 있다. 지난 2001-2003년 동안, 생물학적 스트레스로 인한 전세계의 쌀 생산의 손실은 실제 달성 가능한 것으로 예상된 총 생산량의 37.4%에 달하는 것으로 보고된바 있다. 한편, 이러한 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 대처하기 위해 식물은 세포벽 강화, 파이토알렉신(phytoalexin)의 생산 및 활성 산소종의 축적과 같은 다양한 방어 기전을 개발하였다.

[0004] 리그닌은 모노리그놀 유래의 H(p-hydroxyphenyl)-unit, G- unit 및 S(syringyl)-unit으로 구성된 방향족 중합체로, 주로 목질부 및 섬유 세포의 2차 세포벽에 축적되어 식물의 세포벽을 단단하고 불침투성으로 만드는 역할을 한다. 리그닌화된 2차 세포벽은 물의 전달 및 관다발 식물의 지지에 중요한 역할을 하며, 또한 병원균 및 초식 동물에 대한 물리적 장벽으로 작용하여 식물을 방어한다. 발달 단계에서 리그닌의 축적 이외에도 리그닌 관련 페놀성(lignin-related phenolic) 화합물의 합성 및 축적은 앞서 말한 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 대한 반응으로 유도될 수 있다. 이와 관련하여, Cinnamoyl-CoA reductase (CCR)는 리그닌 생합성 경로 중 hydroxycinnamoyl-CoA에서 모노리그놀(monolignol)로의 전환 경로에 관여하는 첫번째 효소로, p-coumaroyl-CoA, feruloyl-CoA 및 sinapoyl-CoA 각각의 p-coumaraldehyde, coniferaldehyde 및 sinapadehyde로의 전환을

촉매하는 것으로 알려져 있으나, 벼의 CCR 및 CCR-유사 유전자(CCR-like genes)의 생화학 및 생리학적 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않았다.

[0005] 이러한 배경 하에서, 본 발명의 발명자들은 MSU Rice Genome Annotation Project(RGAP) 데이터베이스로부터 CCR 및 CCR-유사 유전자로 분류되는 33개의 유전자를 총칭하여 OsCCR로 명명하고, 생화학적으로 기능성르 지는 벼 OsCCR의 특성 및 역할에 대해 밝히고자 예의 노력한 결과, 특히 OsCCR17 및 OsCCR21 유전자가 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 식물체의 저항성 및 방어 기전에 관련이 있음을 발견하고, 상기 유전자의 활성 강화가 식물체의 스트레스 저항성 증진 목적으로 활용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 Cinnamoyl-CoA reductase(OsCCR) 유전자의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된, 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 OsCCR 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 스트레스 저항성 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 Cinnamoyl-CoA reductase(OsCCR) 유전자의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된, 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어 벼의 게놈으로부터 유래된 33개의 OsCCR 유전자 중 생화학적으로 기능성을 갖는 유전자, 특히 OsCCR 17 및 OsCCR 21 유전자가 식물체의 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 대한 저항성 및 방어 기전에 관련이 있음은 본 발명의 발명자들에 의해 최초로 발견된 것으로, 상기 유전자를 식물체 내에서 과발현시킴으로써 흰잎마름병 감염을 비롯한 스트레스에 대한 저항성을 현저히 높일 수 있고, 작물의 수확량을 증가시킬 수 있다는 점에서 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서 "Cinnamoyl-CoA reductase"는 리그닌 생합성 경로 중 hydroxycinnamoyl-CoA에서 모노리그놀(monolignol)로의 전환 경로에 관여하는 첫번째 효소로, cinnamaldehyde: NADP+ oxidoreductase로도 불리운다. CCR은 cinnamoyl-CoA를 그와 상응하는 cinnamaldehyde로 환원시키고 NADPH와 H^+를 이용하여 유리 CoA 및 $NADP^+$를 방출시킨다. 본 명세서 내에서 Cinnamoyl-CoA reductase는 CCR 또는 OsCCR과 혼용될 수 있다.

[0017] 구체적으로, 본 발명에서 CCR은 OsCCR 17 또는 OsCCR 21일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 OsCCR17을 코딩하는 유전자(LOC_Os09g04050)는 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것일 수 있으며, 서열번호 1의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 OsCCR17과 실질적으로 동일한 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 이에 제한없이 포함될 수 있다.

[0018] 또한, 상기 OsCCR21을 코딩하는 유전자(LOC_Os02g08420)는 서열번호 2의 염기서열로 구성된 것일 수 있으며, 서열번호 2의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 OsCCR21과 실질적으로 동일한 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 이에 제한없이 포함될 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서 유전자의 활성이 "강화된" 것은 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 활성이 새로이 도입되거나, 미생물이 가진 내재적 활성에 비해 유전자의 활성이 향상된 것을 의미하는 것으로, 특정 유전자가 과발현되는 것과 혼용될 수 있다. 상기 "내재적"은 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화될 경우, 형질의 변화 전 균주가 본래 가지고 있던 상태를 의미하며, 상기 "도입"은 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성이 자연적 혹은 인위적으로 나타나게 되는 것을 의미한다.

[0020] 구체적으로, 본 발명에 있어서 유전자의 활성 강화는 목적 단백질을 코딩하는 유전자의 세포 내 카피수 증가, 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법, 상기 단백질을 코딩하는 유전자 발현 조절 서열을 활성이 강력한 서열로 교체하는 방법, 상기 단백질 활성이 증가되도록 돌연변이된 유전자로 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 대체하는 방법, 및 상기 단백질의 활성이 강화되도록 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 변이를 도입시키는 방법 등 당업계의 통상의 기술자에게 널리 알려진 방법에 의해 수행될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 상기 목적 단백질은 구체적으로 OsCCR, 보다 구체적으로 OsCCR 17 또는 OsCCR 21일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명에 있어서 "스트레스"는 생체에 가해지는 여러 종류의 상해 및 자극 조건 등을 의미하는 것으로, 식물체에 가해지는 비생물학적 스트레스(고염분, 고온, 저온 또는 가뭄과 같은 환경 조건) 및 생물학적 스트레스(세균, 진균 또는 바이러스의 감염 등)를 모두 포함하는 개념으로 사용된다. 구체적으로, 상기 생물학적 스트레스는 *Magnaporthe grisea* 및 *Xanthomonas oryzae* 등의 병원체의 감염에 의해 유발되는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 상기 *Xanthomonas oryzae*는 *X.oryzae pv. Oryzae*(*Xoo*) 및 *X.oryzae pv. Oryzicola*(*Xoc*)일 수 있다. 또한 상기 생물학적 스트레스는 벼 흰잎마름병 또는 벼 도열병일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에서는, UV 또는 고염분이 처리된 벼에 대하여 qRT-PCR 분석을 수행한 결과 UV 또는 고염분이 처리된 벼에서 OsCCR17과 21의 발현 수준이 비처리 또는 모의 처리된 대조군에 비해 현저한 수준으로 증가하였음을 확인하였으며(도 5), 전사체(transcriptomic) 분석 결과, 비생물학적 스트레스 처리 하에서 OsCCR21 및 17은 각각 추위 및 고염분 스트레스에 대해 현저하게 발현이 증가되는 것을 확인하였다(도 6).

[0023] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 마이크로어레이 데이터의 in silico 분석 결과 OsCCR1, 2, 3, 5, 17, 18, 20 및 21의 발현은 *M. grisea*의 감염에 의해 유도됨을 확인하였으며, 특히 OsCCR 17 및 21의 발현이 현저하게 증가되었음을 확인하였다. 또한, *Xoo* 감염은 OsCCR20 및 21의 발현을 증가시켰고, *Xoc* 감염은 OsCCR21 발현을 현저히 증가시킴을 확인하였다.

[0024] 즉, 이는 OsCCR 17 및 21 유전자가 냉해, 건조, 고염분 및 UV 조사 등을 포함하는 비생물학적 스트레스뿐 아니라 *M. grisea, X, Xoo* 및 *Xoc* 감염과 같은 생물학적 스트레스에 대한 방어 기전과 관련이 있으며, 특히 상기 유전자를 과발현시킬 경우 비생물학적/생물학적 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 증진시킬 수 있음을 나타내는 것이다.

[0025] 본 발명에 있어서 "저항성"은 상기 스트레스가 가해질 경우 이를 견디는 식물체의 성질 또는 그 정도를 의미할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서 "식물체"는 "식물" 또는 "작물"과 혼용될 수 있으며, 전체 식물, 생장 영양기관/구조(잎, 줄기 및 덩이줄기), 뿌리, 꽃 및 꽃 기관/구조 (예를 들어, 포, 꽃받침, 꽃잎, 수술, 심피, 꽃밥 및 배주), 종자(배, 배유 및 종피), 과실, 식물 조직(유관속조직, 기본조직) 및 식물 세포(공변세포, 난세포 등)를 모두 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 상기 식물체는 벼(*Oryza sativa*)일 수 있으며, 보다 구체적으로 OsCCR17 또는 21 유전자가 과발현된 벼 일 수 있으며, 보다 더 구체적으로는 OsCCR21 유전자가 과발현된 벼일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명에 있어서 "형질전환"은 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 식물체 내에 도입하여 식물체 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 식물체 내에서 발현될 수 있기만 한다면, 식물체의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 목적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 식물체 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 식물체에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터, 전사 종결신호, 리보좀 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있

다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 식물체에 도입되어 식물체에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다. 상기 목적 단백질은 구체적으로 OsCCR, 보다 구체적으로 OsCCR 17 또는 OsCCR 21일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 Cinnamoyl-CoA reductase(OsCCR) 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시키는 단계를 포함하는, 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다. 상기 OsCCR, 식물체, 도입, 스트레스 및 저항성은 전술한 바와 같다.

[0030] 본 발명의 제조방법에 있어서 상기 OsCCR 유전자는 OsCCR 17(LOC_Os09g04050) 또는 OsCCR 21(LOC_Os02g08420)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 "과발현"은 특정 유전자의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된 것과 혼용될 수 있다.

[0032] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 OsCCR 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0033] 본 발명에 있어서 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 본 발명에 있어서 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 이에 제한되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다.

[0034] 상기 제조방법은 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 식물체 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당업계에 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다.

[0036] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 스트레스 저항성 증진용 조성물을 제공한다. 상기 벡터, 식물체, 스트레스 및 저항성은 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0038] 벼의 게놈으로부터 유래된 33개의 OsCCR 유전자 중 생화학적으로 기능성을 갖는 유전자를 발굴하였고, 특히 OsCCR 17 및 OsCCR 21 유전자가 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 식물체의 저항성 및 방어 기전에 관련이 있음을 확인하였는바, 상기 유전자의 활성 강화는 식물체의 스트레스 저항성 증진 목적으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 OsCCR 및 다른 식물 CCR 유전자의 엑손-인트론 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 OsCCR 및 다른 식물 종 유래 17개 특징적인 CCR의 계통 발생 분석을 나타낸 것이다.

도 3은 다른 식물 종 유래의 기능성 CCR과 OsCCR의 NAD(P)-결합 모티프, NADP 특이성 및 CCR 촉매 모티프의 Multiple Sequence Alignment를 나타낸 것이다.

도 4는 대장균에서 발현된 재조합 OsCCR(OsCCR1, 5, 19, 20, 21 및 26)의 정제 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 UV 조사 및 염분 처리에 대한 OsCCR17, 19, 20 및 21 유전자 발현의 qrt-PCR 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6a는 비생물학적 스트레스(추위, 건조, 고염분)에 반응하는 OsCCR 유전자 발현의 *in silico* 마이크로어레이

분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6b는 비생물학적 스트레스(UV 조사)에 반응하는 OsCCR 유전자 발현의 *in silico* 마이크로어레이 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 생물학적 스트레스(*M. grisea, X. oryzae pv. Oryzae* 및 *X. oryzae pv. Oryzicola*의 감염)에 반응하는 OsCCR 유전자 발현의 *in silico* 마이크로어레이 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 OsCCR21 유전자가 과발현된 벼의 흰잎마름병 저항성에 관한 실험 결과를 나타낸 것이다. 구체적으로, 도 8의 A는 야생형(HY) 및 OsCCR21 유전자가 과발현된 벼의 잎에서 병변 정도를 비교한 것이고, 도 8의 B는 벼 유비퀴틴 5(UBQ5) 유전자를 참조로 하여 OsCCR21 유전자의 과발현 여부를 확인한 결과, 도 8의 C는 야생형(HY) 및 OsCCR21 유전자가 과발현된 벼에서 병변의 길이(cm)를 비교한 그래프를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0043] **실시예 1: 식물체(벼)의 성장 및 시료**

[0045] 12시간의 광주기 및 28℃ 온도의 성장 챔버 내 Murashige and Skoog (MS) 배지(Duchefa, Harlem, Netherlands)에서 야생형 벼(*Oryza sativa* L. spp. *Japonica* cv. *Dongjin*)의 무균 종자를 발아시켰다. 10일령 모종을 토양으로 옮겨 낮에는 28℃, 밤에는 20℃의 온실에서 재배하였다. 10주령 벼에서 줄기 및 잎의 샘플을 수집하고, 14주령 벼에서 원추(panicle) 시료를 수집하였다. 뿌리 및 싹의 샘플은 10일령 모종에서 수집하였다.

[0046] hydroxycinnamoyl-CoA 생산을 위한 p-Coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, coenzyme-A(CoA) 및 β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 완충액, 배지 및 다른 시약은 Sigma-Aldrich 및 Duchefa로부터 입수하였다.

[0048] **실시예 2: OsCCR의 Multiple Sequence Alignment 및 계통 발생 분석**

[0050] OsCCR 및 다른 식물 종에서 확인된 기능성 CCR의 단백질 서열을 MSU RGAP 데이터베이스(http://rice.plantbiology.msu.edu/, Kawahara et al., 2013) 및 National Center for Biotechnological Information(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 데이터베이스에서 각각 획득하였다. Clustal-W(Thompson et al., 1994)를 이용하여 여러 아미노산 배열을 정렬하였고, MEGA ver.6으로 neighbor-joining method을 사용하여 계통 발생 분석을 수행하였다(Tamura et al., 2013).

[0051] 그 결과, OsCCR 1-25 펩타이드는 다른 식물 종 유래의 기능성 CCR과 30 내지 90%의 서열 유사성을 가지는 것을 확인하였으며, 특히 OsCCR 17, 19, 20 및 21은 알려진 CCR과 높은 상동성(62 내지 92%)을 나타냄을 확인하였다. 계통 분석에 따르면 OsCCR 17, 18, 19, 20 및 21은 알려진 CCR과 함께 그룹화될 수 있으며, 구체적으로 OsCCR 19 및 20은 PvCCR1 (*P.virgatum* CCR1), SbCCR1, ZmCCR1, LpCCR (*Lolium perenne* CCR), HvCCR (*Hordeum vulgare* CCR) 및 TaCCR1 (*T.aestivum* CCR1)과 관련이 있고, OsCCR 17, 18 및 21은 ZmCCR2, SbCCR2, TaCCR2, 및 PvCCR2와 관련이 있음을 확인하였다(도 2). 또한, OsCCR과 기능성 CCR의 펩타이드의 서열 사이의 상동성은 두 개의 고도로 보존된 모티프 영역에서 찾을 수 있었고, 이는 각각 N-말단의 NAD(P)-결합 모티프(NAD(P)-binding motif) 및 CCR 활성을 위한 촉매 모티프(catalytic motif)임을 확인하였다(도 3). 구체적으로, 상기 NAD(P)-결합 모티프는 포유류 3β-HSD/식물 DFR 단백질 슈퍼 패밀리에서 보조인자 결합을 위한 보존된 모티프이고, 상기 촉매 모티프(NWYCYGK)는 NWYCY 서열이 CCR 활성에 결정적일 수 있는, 특징적 모티프에 해당한다.

[0053] **실시예 3: OsCCR 유전자 클로닝**

[0055] RNAiso(Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 8주령 벼에서 총 RNA를 분리하였다. 첫번째 cDNA는 총 RNA 및 올리고 dT 프라이머가 있는 SuPrimeScript RT premix(GeNet Bio, Daejeon, Korea)를 사용하여 합성하였다. OsCCR 유전자의 클로닝 프라이머는 MSU RGAP 데이터베이스의 서열에 따라 설계되었다. PCR은 SolgTM Pfu DNA Polymerase(SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 수행하였다. 생성된 PCR 산물은 pGEMTM-T Easy 벡터(Promega, Madison, WI, USA) 또는 pJET 1.2 blunt 클로닝 벡터(Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA)에 서브 클로닝 하였다. 서열 확인 후, OsCCR 유전자를 적절한 제한효소로 절단하고, pET28a(+) 벡터(Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입하였다. 생성된 OsCCR/pET28a(+)는 OsCCR의 이형 발현을 위해 대장균 BL21(DE3) 세포로 각각 형질전환시켰다.

[0057] **실시예 4: 재조합 OsCCR의 발현 및 정제**

[0059] OsCCR/pET28a(+)를 갖는 대장균 형질전환체를 카나마이신(25㎍/mL)을 함유하는 LB 배지에서 약 0.6의 OD_{600}이 될 때까지 37℃에서 성장시켰다. 이 시점에서, 단백질 발현을 유도(induction)하기 위해 0.1mM의 isopropyl β-D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 배양물에 첨가 하였다. 추가로 18 또는 25℃에서 16시간 동안 배양한 후, 원심분리(5,000g, 15분)하여 세포를 수득하였다. 리소자임(1mg/mL) 및 페닐 phenylmethylsulfonyl fluoride(1mM)를 포함하는 인산염 완충 생리 식염수(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4, 2mM KH_2PO_4)에 세포 펠렛을 재현탁시켰다. 재현탁된 세포를 얼음 위에서 초음파 처리하고, 원심분리(15,900 g, 20분, 4℃)하여 조단백질 추출물을 얻었다. 조단백질 샘플을 Ni-NTA Agarose beads(Qiagen, Hilden, Germany)와 혼합하고 4℃에서 2시간 동안 교반하면서 배양하였다. 혼합물을 크로마토그래피 칼럼에 충진하고, Tris 완충액(50mM Tris, pH 8.0, 300mM NaCl) 중 5 칼럼 부피의 20mM 이미다졸로 3 회 세척하였다. 재조합 OsCCR을 Tris 완충액 중 50-100 mM 이미다졸로 용출하였다. 용출된 단백질은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분석하였다.

[0061] **실시예 5: Hydroxycinnamoyl-CoA의 효소적 합성**

[0063] OsCCR 활성 분석을 위해, Beuerle and Pichersky(2002)에 기술된 방법으로 hydroxycinnamoyl-CoA를 합성하였다. *A. thaliana* cDNA로부터 Arabidopsis 4-coumarate: CoA ligase 1(*At4CL1*)을 클로닝하고, 생성된 유전자를 pET28a(+) 벡터에 삽입하였다(Stuible and Kombrink, 2001). 재조합 At4CL1을 대장균에서 발현시키고 상기 기술된 방법에 따라 Ni-NTA 아가로스 비드로 정제하였다. hydroxycinnamoyl-CoA ester를 합성하기 위해, 3.3mg hydroxycinnamic acid (p-coumaric, ferulic 또는 sinapic acids), 2mg CoA 및 6.9mg ATP를 2.5mM $MgCl_2$를 포함하는 50mM의 Tris-HCl pH 7.5 완충액에 총 부피 10mL가 되도록 용해시켰다. 반응은 0.25mg의 정제 된 At4CL1의 첨가에 의해 개시되었다. 교반하면서 실온에서 5시간 인큐베이션한 후, 반응 혼합물에 6.9mg ATP, 2mg CoA 및 0.25mg 정제된 At4CL1 효소를 첨가하고, 실온에서 12시간 동안 배양을 계속 하였다. 이후 암모늄 아세테이트(0.4 g)를 혼합물에 첨가하여 반응을 정지시켰다. Sep-Pak R Vac tC_{18} 카트리지(Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여 MeOH, H_2O 및 4 % 암모늄 아세테이트 용액(각각 5 컬럼 부피)으로 연속적으로 세척함으로써 hydroxycinnamoyl-CoA ester를 정제하였다. 반응 혼합물을 전처리된 카트리지에 로딩하고, 칼럼을 4 % 암모늄 아세테이트 용액으로 세척하였다. hydroxycinnamoyl-CoA ester는 H_2O로 용리되었다. hydroxycinnamoyl-CoA ester를 함유하는 분획물을 V-550 UV/Vis-분광 광도계(Jasco, Tokyo, Japan)를 사용하여 기록된 UV/Vis 스펙트럼을 통해 확인하였고, 정제된 생성물을 저장을 위해 동결 건조시켰다.

[0065] **실시예 6: CCR 활성 분석 및 Kinetic Parameter의 결정**

[0067] OsCCR 활성은 LÜderitz and Grisebach(1981)의 방법에 따라 측정하였다. 반응 혼합물은 100mM의

sodium/potassium phosphate buffer(pH 6.25)에서 0.1mM NADPH, 30㎛M hydroxycinnamoyl-CoA, 5㎛g의 정제된 재조합 OsCCR 단백질로 구성되며 총 부피는 500 ㎛L이었다. 효소 반응은 30℃에서 수행하였다. 상기 반응은 재조합 OsCCR 단백질의 첨가에 의해 시작하여, A_{366}의 감소를 Cary 300 Bio UV/Vis 분광 광도계 (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia)을 통해 10분간 모니터링하였다. K_M과 V_{max}을 결정하기 위해, 기질은 5-50 ㎛M의 농도로 사용하였다. K_M 및 V_{max}는 Lineweaver-Burk polt에서 외삽법(extrapolation)에 의해 결정하였다. 효소 검정을 4회 반복하여 그 결과를 평균±표준편차로 나타내었다.

[0068] 구체적으로, OsCCR의 효소적 특성을 분석하고자, 재조합 OsCCR의 활성을 각각 리그닌의 H-unit, G-unit, 및 S-unit에 해당하는 p-coumaroyl-CoA, feruloyl- CoA, 및 sinapoyl-CoA를 기질로 사용하여 평가하였다. 그 결과, 아래의 표 1과 같이 OsCCR 17, 19, 20 및 21은 각각의 기질에 대해 환원 효소 활성을 나타냄을 확인하였다(- 기호는 효소 활성의 측정 불가, + 기호는 기질에 대해 환원 효소 활성이 있음을 의미한다).

[0069] **[표 1]**

[0070]

	OsCCR1	OsCCR5	OsCCR17	OsCCR19	OsCCR20	OsCCR21	OsCCR26
p-Coumaroyl-CoA	-	-	+	+	+	+	-
Feruloyl-CoA	-	-	+	+	+	+	-
Sinapoyl-CoA	-	-	+	+	+	+	-

[0072] 또한, 재조합 OsCCR 19, 20, 및 21의 hydroxycinnamoyl-CoA 에 대한 촉매 반응의 kinetic parameter를 결정하였다. 한편, OsCCR17은 효소 활성을 나타내긴 하나 kinetic analysis를 수행하기에 대장균 배양물로부터 정제된 단백질의 양이 적었다.

[0073] 그 결과, 아래 표 2로부터 알 수 있듯이, p-coumaroyl-CoA, feruloyl- CoA 및 sinapoyl-CoA에 대한 OsCCR20의 K_M 값은 각각 24.08 ㎛M, 15.71 ㎛M, 및 23.34 ㎛M로 나타났다. feruloyl-CoA(1.41 μM^{-1} min^{-1})에 대한 OsCCR20의 k_{cat}/K_M 값은 p-coumaroyl-CoA 및 sinapoyl-CoA(각각 0.32 및 0.24 μM^{-1} min^{-1})보다 약 5배 높았으며, 이는 다른 기질에 비해 feruloyl-CoA에 대한 촉매 효율이 더 높음을 알 수 있었다(표 2). 또한, p-coumaroyl-CoA, feruloyl-CoA 및 sinapoyl-CoA에 대한 OsCCR21의 K_M 값은 각각 16.36 ㎛M, 2.70 ㎛M 및 10.20㎛M이었고, 이는 OsCCR21 또한 다른 기질보다 feruloyl-CoA에 대한 기질 친화성이 더 높음을 알 수 있었다. 즉, feruloyl-CoA에 대해 OsCCR20 및 21의 선호도가 가장 높게 나타난 결과는 Dongjin 벼 품종의 줄기에서의 리그닌 함량(G-unit, S-unit, H-unit 각각 62 %, 35 %, 3 %) 및 Gui et al. (2011)에서의 보고 결과(G-unit, S-unit, H-unit 각각 70 %, 20 %, 10 %)와 일치하였다.

[0074] 한편, p-coumaroyl-CoA, feruloyl-CoA 및 sinapoyl-CoA에 대한 OsCCR19의 K_M 값은 각각 36.66 ㎛M, 26.85 ㎛M 및 2.54 ㎛M로 나타났다. OsCCR19는 각각 0.60, 0.43, 0.55 μM^{-1} min^{-1}의 kcat/KM 값을 나타내어 p-coumaroyl-CoA, feruloyl-CoA 및 sinapoyl-CoA에 대해 유사한 촉매 효율을 나타내었다.

[0075] [표 2]

OsCCR	기질	K_M (μM)	V_{max}(μmol min^{-1} mg^{-1})	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M (μM^{-1} min^{-1})
OsCCR19	p-Coumaroyl-CoA	36.66 ± 3.06	0.51 ± 0.11	21.17	0.60
	Feruloyl-CoA	26.85 ± 6.68	0.28 ± 0.12	11.48	0.43
	Sinapoyl-CoA	62.54 ± 14.08	0.83 ± 0.04	34.19	0.55
OsCCR20	p-Coumaroyl-CoA	24.08 ± 3.05	0.17 ± 0.02	7.72	0.32
	Feruloyl-CoA	15.71 ± 1.55	0.58 ± 0.12	22.61	1.41
	Sinapoyl-CoA	23.34 ± 2.60	0.13 ± 0.01	5.64	0.24
OsCCR21	p-Coumaroyl-CoA	16.36 ± 4.69	0.02 ± 0.003	1.12	0.08
	Feruloyl-CoA	2.70 ± 1.69	0.03 ± 0.003	1.59	0.77
	Sinapoyl-CoA	10.20 ± 1.84	0.02 ± 0.004	0.72	0.07

[0076]

[0078] **실시예 7: RNA 분리 및 Quantitative Real-Time PCR 분석**

[0080] 벼 샘플로부터의 총 RNA 추출 및 cDNA 합성은 상기 기술된 방법을 사용하여 수행하였다. Quantitative real-time PCR(qRT-PCR)은 Rotor-Gene Q instrument system(Qiagen)에서 Prime Q-Mastermix(GeNet Bio, Daejeon, Korea)를 사용하여 수행하였다. 전사 수준의 정규화를 위해, 벼에서 안정적으로 발현되는 벼 유비퀴틴 5(UBQ5) 유전자(LOC_Os01g22490)를 참조 유전자로 사용하였다(Jain et al., 2006). 발현 수준을 계산하기 위해 Δ Δ 11Ct 방법을 사용하였다(Choi et al., 2014). 프라이머 특이성을 보장하기 위해, 용융 곡선이 단일 피크를 나타낼 때의 데이터를 사용하였다. OsCCR19, 20, 21 및 UBQ5에 대한 프라이머 서열은 Koshiba et al. (2013)의 기재에 따른다. 다양한 조직 및 스트레스 조건에서 OsCCR17, 19, 20 및 21의 발현을 평가하기 위해, 3배의 생물학적 시료에 대해 qRT-PCR 분석을 수행하였고, 각 시료에 대해 technical replicate로 두 번 분석하였다. 그 결과는 평균±표준 편차로 나타내었다. 모든 통계 분석은 SPSS 통계를 사용하여 수행하였다.

[0082] **실시예 8: UV, 염분 처리 방법 및 생물학적/비생물학적 스트레스에 대한 OsCCR 유전자의 발현 분석**

[0084] **8-1: 비생물학적 스트레스(UV, 염분)의 처리 및 OsCCR 유전자의 전사체 분석**

[0085] 야생형의 동진(Dongjin)벼는 발아 후 8주 동안 온실에서 성장시켰다. 벼의 UV-C 처리는 Park et al. (2013)에 기술된 방법을 사용하여 수행하였다. 자외선 처리 후 1, 24 및 48 시간 후에 자외선 처리된 벼의 잎을 수득하였다. 염분 스트레스를 가하기 위해 벼 모종을 MS 배지(Duchefa)에서 수경 재배한 후, 10일령의 벼 모종을 250mM NaCl로 처리 하였다. 염분 처리 1, 3, 6, 12 및 24 시간 후, OsCCR 발현 분석을 위해 벼 모종을 수집하였다.

[0086] 또한, 벼의 다양한 발달 단계에서의 생물학적(*M.grisea, X.oryzae pv. Oryzae* 및 *X.oryzae pv. Oryzicola*의 감염) 및 비생물학적 스트레스(건조, 염분 및 추위) 하에 있는 OsCCR 유전자의 공개 전사체(transcriptomic) 분석 데이터를 Genevestigator 식물 생물학 데이터베이스(https://genevestigator.com/gv/doc/intro_plant.jsp, (Hruz et al., 2008)에서 다운로드하였다. UV-C 처리된 벼의 마이크로 어레이 데이터는 Park et al. (2013)에서 수행된 전사체 분석으로부터 획득하였다. 두 배 이상 발현이 변화된 유전자($p<0.05$)는 차별적으로 발현된 유전자로 확인되었다. 정규화된 데이터를 업로드하고 히트맵 표현 패턴을 Multi Experiment Viewer 프로그램(http://mev.tm4.org/#/welcome)을 사용하여 생성하였다.

[0088] **8-2: 비생물학적 스트레스에 대한 저항성 증진 유전자 확인**

[0089] OsCCRs 유전자의 스트레스 유도성 발현을 확인하기 위해, UV 또는 고염분이 처리된 벼 잎 또는 모종에 대해 qRT-PCR 분석을 수행 하였다. 그 결과, UV 처리한 벼 잎에서 OsCCR17과 21의 발현 수준이 UV 처리 1시간 후 비처리 대조군에 비해 각각 약 70 배와 10 배 증가하였고(도 5의 A), 고염분이 처리된 벼에서 OsCCR17 및 21의 발현 수준이 모의 처리된 대조군에 비해 현저히 증가하였음을 확인하였다(도 5의 B). 반면, OsCCR19와 20의 전사

체 수준은 UV 및 고염분의 스트레스 조건에 의해 크게 변화하지 않았음을 확인하였다. 즉, 이러한 결과는 OsCCR17과 21이 UV, 고염분과 같은 비생물학적 스트레스에 대한 방어 기전과 가장 관련되어 있음을 나타내는 것이다.

[0090] 또한 도 6a로부터 알 수 있듯이, 전사체(transcriptomic) 분석에 따라 OsCCR의 발현은 추위(OsCCR1, 2, 6, 21, 23, 및 33), 건조(OsCCR3, 7, and 15), 및 고염분(OsCCR3, 7, 17, 및 18)과 같은 비생물학적 스트레스 처리 하에 현저하게 증가됨을 확인하였다. 특히, 비생물학적 스트레스 처리 하에서 OsCCR21 및 17은 각각 추위 및 고염분 스트레스에 대해 현저하게 발현이 증가되는 것을 알 수 있었다. 한편 벼 잎에 대해 UV를 조사한 결과, OsCCR1, 3, 17, 20, 21 및 23의 발현이 증가된 것을 확인하였으며, 상기 qRT-PCR 분석 결과와 마찬가지로 특히 OsCCR 17 및 21은 UV 조사 1시간 후에 현저히 발현이 증가되었음을 알 수 있었다(도 6b).

[0091] 즉, 이러한 결과는 OsCCR 17 및 21 유전자가 냉해, 건조, 고염분 및 UV 조사 등을 포함하는 비생물학적 스트레스에 대한 방어 기전과 관련이 있음을 나타내는 것으로, 상기 유전자를 과발현시킬 경우 비생물학적 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0093] **8-3: 생물학적 스트레스에 대한 저항성 증진 유전자 확인**

[0094] 한편, 마이크로어레이 데이터의 in silico 분석 결과에 따르면, 몇몇 OsCCR 유전자의 발현은 *M. grisea, X. oryzae pv. Oryzae*(*Xoo*) 및 *X. oryzae pv. Oryzicola*(*Xoc*) 균주의 감염 등 생물학적 스트레스에 대해서도 증가되었음을 확인하였다. 구체적으로, 도 7로부터 알 수 있듯이, OsCCR1, 2, 3, 5, 17, 18, 20 및 21의 발현은 *M. grisea*의 감염에 의해 유도됨을 확인하였으며, 특히 OsCCR 17 및 21의 발현이 현저하게 증가되었음을 확인하였다. 또한, *Xoo* 감염은 OsCCR20 및 21의 발현을 증가시켰고, *Xoc* 감염은 OsCCR21 발현을 현저히 증가시킴을 확인하였다.

[0095] 즉, 이러한 결과는 OsCCR 17 및 21 유전자가 *M. grisea, X, Xoo* 및 *Xoc* 감염과 같은 생물학적 스트레스에 대한 방어 기전과 관련이 있음을 나타내는 것으로, 상기 상기 유전자를 과발현시킬 경우 이러한 생물학적 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 증진시키고, 보다 구체적으로는 상기 균주의 감염으로부터 유발되는 벼 흰잎바름병에 대한 저항성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0097] **실시예 9: OsCCR21 유전자가 과발현된 벼에서 흰잎마름병 저항성 확인**

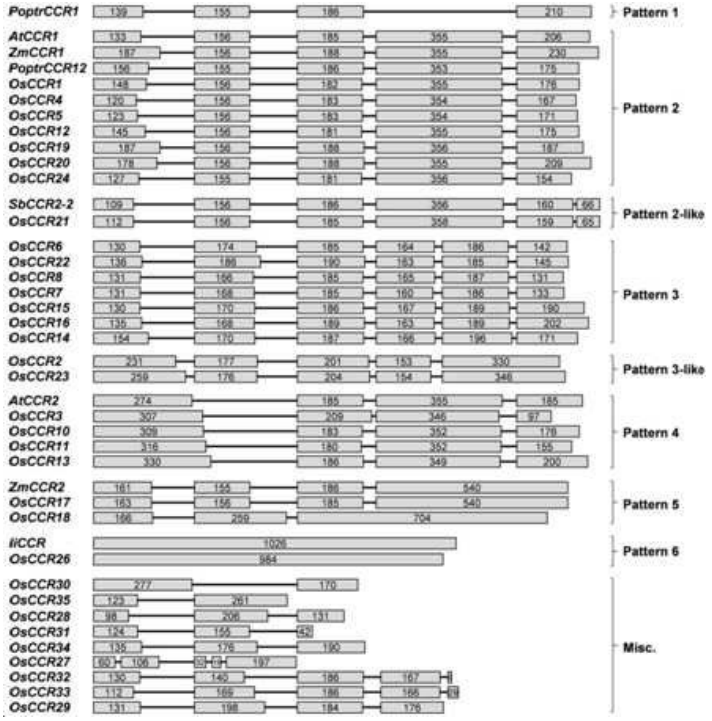
[0099] OsCCR21 유전자가 과발현된 벼와 그렇지 않은 벼의 잎에 흰잎마름병균 *Xanthomonas oryzae*는 *X.oryzae pv. Oryzae*(*Xoo*)을 접종한한 후, 잎에 나타나는 병변의 길이를 비교하여 OsCCR21 유전자가 갖는 흰잎마름병에 대한 저항성 증진 활성을 확인하였다.

[0100] 구체적으로, OsCCR21 유전자가 과발현된 벼(CCR21 AC) 및 야생형 벼(HY) 잎의 끝을 자른 후 각각에 흰잎마름병균을 접종하고, 접종 2주 후에 병변의 길이를 측정하였다. 그 결과, 야생형 벼의 경우 벼 잎에 약 8cm 가량의 병변이 뚜렷하게 나타났으나, OsCCR21 유전자가 과발현된 벼는 약 2cm 미만의 병변 길이를 나타내는 것을 확인하였다(도 8). 이러한 결과는 OsCCR21 유전자가 흰잎마름병 감염과 같은 생물학적 스트레스에 대한 벼의 저항성을 증진시킬 수 있음을 나타내는 것이다.

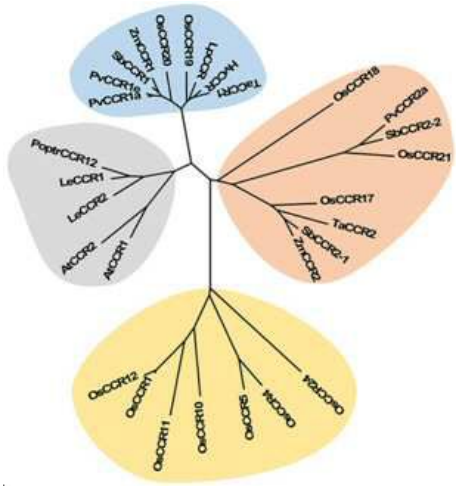
[0102] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

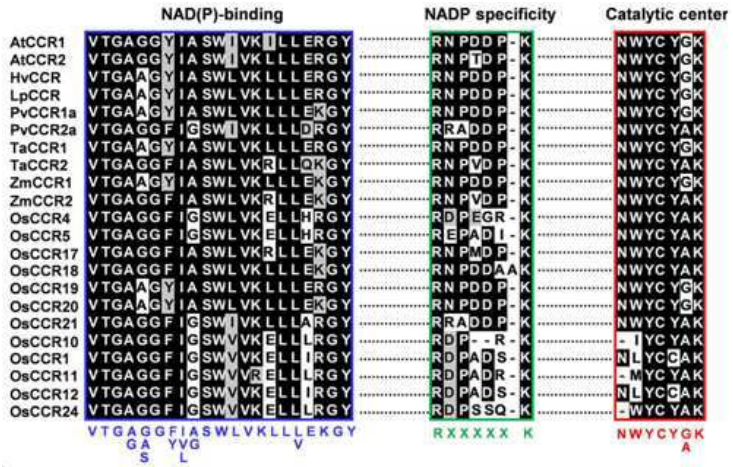
도면1


PoptrCCR1
AtCCR1
ZmCCR1
PoptrCCR12
OsCCR1
OsCCR4
OsCCR5
OsCCR12
OsCCR19
OsCCR20
OsCCR24
SbCCR2-2
OsCCR21
OsCCR6
OsCCR22
OsCCR8
OsCCR7
OsCCR15
OsCCR16
OsCCR14
OsCCR2
OsCCR23
AtCCR2
OsCCR3
OsCCR10
OsCCR11
OsCCR13
ZmCCR2
OsCCR17
OsCCR18
liCCR
OsCCR26
OsCCR30
OsCCR35
OsCCR28
OsCCR31
OsCCR34
OsCCR27
OsCCR32
OsCCR33
OsCCR29
Pattern 1
Pattern 2
Pattern 2-like
Pattern 3
Pattern 3-like
Pattern 4
Pattern 5
Pattern 6
Misc.

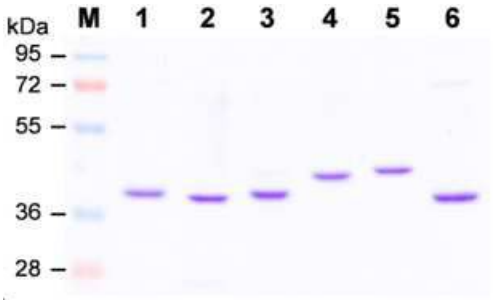
도면2


ZmCCR1
OsCCR20
OsCCR19
LpCCR
HvCCR
TaCCR1
SbCCR1
PvCCR1a
PvCCR1b
OsCCR18
PvCCR2a
SbCCR2-2
OsCCR21
OsCCR17
TaCCR2
SbCCR2-1
ZmCCR2
PoptrCCR12
LeCCR1
LeCCR2
AtCCR2
AtCCR1
OsCCR12
OsCCR1
OsCCR11
OsCCR10
SbCCR1
HvCCR1
HvCCR2

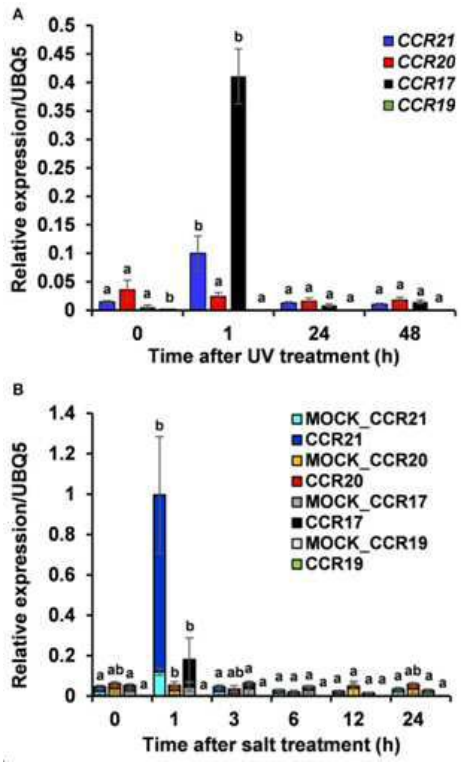
도면3


NAD(P)-binding
NADP specificity
Catalytic center
AtCCR1
AtCCR2
HvCCR
LpCCR
PvCCR1a
PvCCR2a
TaCCR1
TaCCR2
ZmCCR1
ZmCCR2
OsCCR4
OsCCR5
OsCCR17
OsCCR18
OsCCR19
OsCCR20
OsCCR21
OsCCR10
OsCCR1
OsCCR11
OsCCR12
OsCCR24
VTGAGGFIASWLVKLLLEKGY
RXXXXX K
NWYCYGK

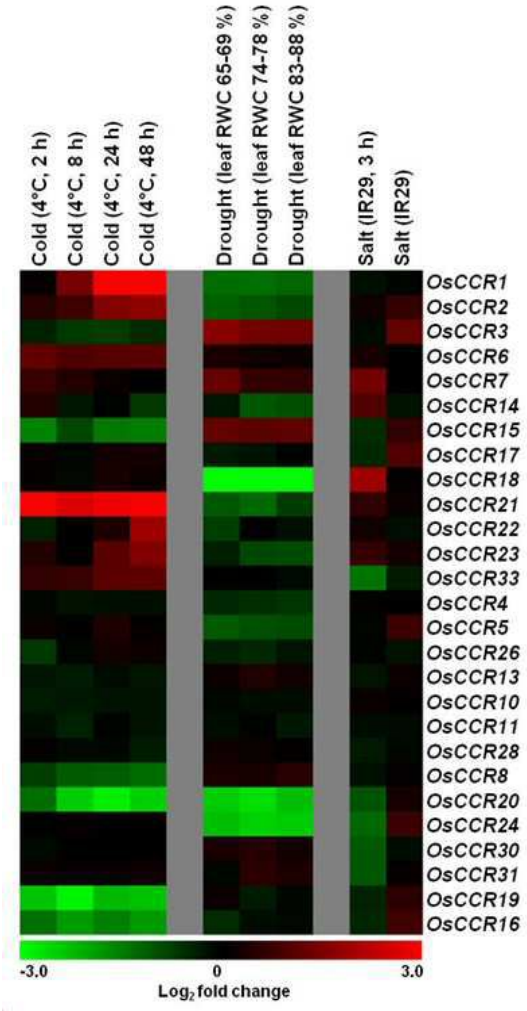
도면4


kDa
M
1
2
3
4
5
6
95
72
55
36
28

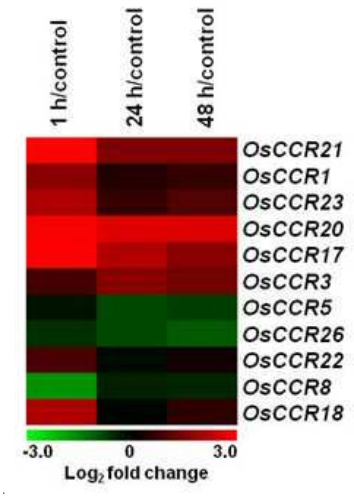
도면5


A
Relative expression/UBQ5
CCR21
CCR20
CCR17
CCR19
Time after UV treatment (h)
B
Relative expression/UBQ5
MOCK_CCR21
CCR21
MOCK_CCR20
CCR20
MOCK_CCR17
CCR17
MOCK_CCR19
CCR19
Time after salt treatment (h)

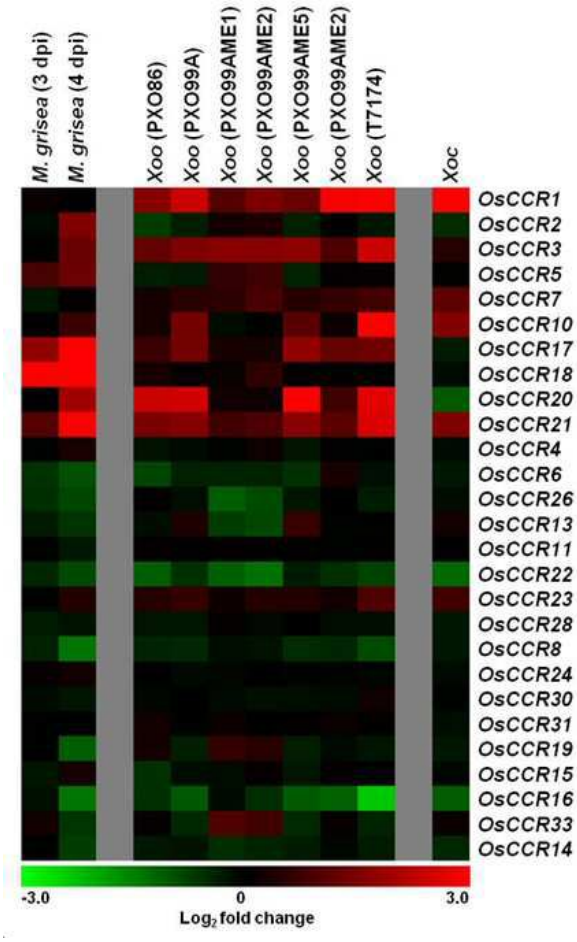
도면6a


Cold (4°C, 2 h)
Cold (4°C, 8 h)
Cold (4°C, 24 h)
Cold (4°C, 48 h)
Drought (leaf RWC 65-69 %)
Drought (leaf RWC 74-78 %)
Drought (leaf RWC 83-88 %)
Salt (IR29, 3 h)
Salt (IR29)
OsCCR1
OsCCR2
OsCCR3
OsCCR6
OsCCR7
OsCCR14
OsCCR15
OsCCR17
OsCCR18
OsCCR21
OsCCR22
OsCCR23
OsCCR33
OsCCR4
OsCCR5
OsCCR26
OsCCR13
OsCCR10
OsCCR11
OsCCR28
OsCCR8
OsCCR20
OsCCR24
OsCCR30
OsCCR31
OsCCR19
OsCCR16
-3.0
0
3.0
Log2 fold change

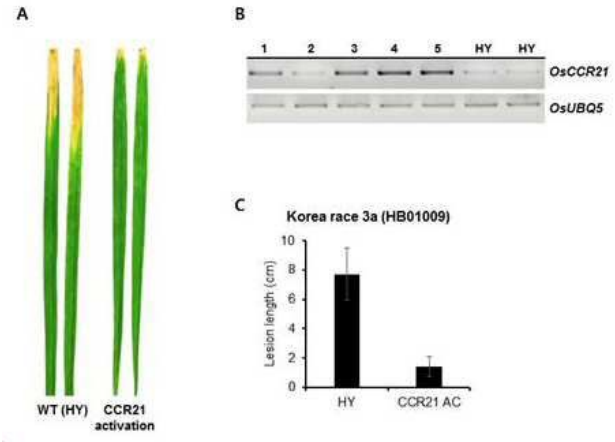
도면6b


1 h/control
24 h/control
48 h/control
OsCCR21
OsCCR1
OsCCR23
OsCCR20
OsCCR17
OsCCR3
OsCCR5
OsCCR26
OsCCR22
OsCCR8
OsCCR18
-3.0
0
3.0
Log2 fold change

도면7



도면8



서 열 목 록

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

<120> Stress-resistant transgenic plants with enhanced OsCCR gene expression and preparation method thereof

<130> KPA171096-KR-P1

<150> KR 10-2017-0133770

<151> 2017-10-16

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1044

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

atgccgactg acgagacagc cgcggcggcg ccggccacca ccgcgctctc cggccatggg 60

tgcaccgtgt gcgtcaccgg cgccggcggg ttcatcgcgt cgtggctcgt caagcgcctc 120

ctcgagaagg gctacaccgt gcgtggcacc gtccggaacc ctatggaccc gaagaacgac 180

cacctgagag ccctggacgg cgccggcgag cgcctcgtcc tcctccgcgc cgacctcctc 240

gaccccgaca gcctcgtcgc cgccttcacc ggctgcgagg gcgtcttcca cgctgcctcc 300

cccgtcaccg atgatcctga gaagatgata gagccggcga tcaggggggac gagatacgtg 360

ataacggcgg cggccgacac cggcatcaag cgagtggtgt tcacgtcctc catcggcact 420

gtctacatga acccctacag ggaccccaac aagcccgtcg acgacacctg ctggagtgac 480

ctcgaatact gcaagaggac agagaactgg tactgctacg cgaagacggt ggcggagcag 540

ggtgcgtggg aggtggcgcg gcggcgtggg gtggacctgg tcgtagtgaa cccggtgctg 600

gtgctgggac cgctgctgca ggcgacggtg aacgcgagca cggagcacgt gatgaagtac 660

ctgacggggt cggccaagac gtacgtgaac gcagcgcagg cgtacgtcca cgtccgcgac 720

gtcgccgagg cgcacgtccg cgtgtacgac tgcggcggcg cgcggggccg gtacatctgc 780

gccgagagca ccctgcaccg cggcgacctc tgccgcgccc tcgccaagct tttcccggag 840

taccccgtcc cgagcaggtg caaggacgag gcggcgccgc cggtgaaggg gtacctcttc 900

tccaaccagc gcctccgtga cctcggcatg gacttcgtcc ccgtccgcca gtgcctctac 960

gaaaccgtgc gaagcctcca ggacaagggc ttgctgccgg tgctgccgcc caccgccgac 1020

gaccaccacc acccttcctc gtga 1044

<210> 2

<211> 1035

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 2

atggccgccg ccgtcgtctg cgtcaccggc gccggcgggt tcatcgggtc gtggatcgtc 60

aagctcctcc tcgcccgcgg ctacgccgtc cgcggcacat cccgccgcgc cgatgacccg 120

aagaacgcgc acctgtgggc gctcgacggc gcggcagagc ggctgacgat ggtgagcgtc 180

gacctgctcg accgtggcag cctccgcgcc gccttcgccg gctgccacgg cgtcatccac 240

accgcctcgc cgatgcacga cgacccggag gagatcatcg agccggtgat caccgggacg 300

ctgaacgtgg tggaggtggc cgccgacgcc ggcgtgcggc gggtggtgct ctcctccacc 360

atcggcacca tgtacatgga ccctcgccgc gaccccgact ccccccctcga cgactccttc 420

tggagcgatc tcgactactg caagaacacc aagaattggt attgctacgc gaagacgata 480

gcggagagga aggcgtggga ggtggcgagg ggtcgggggg tggacatggc ggtggtgatc 540

ccggtggtgg tgctcggcga gctgctgcag ccagggatga acaccagcac caagcacatt 600

ctcaagtacc tcaccggcga ggccaagacg tacgtcaacg agtcccacgc ctacgtgcac 660

gtcgtggacg ccgccgaggc ccacgtcagg gtgctggagg cgccgggggc cggcggacgc 720

cggtacatct gcgccgagcg caccctgcac cgcggcgagc tctgccggat cctcgccggc 780

ctcttcccgg agtatccgat ccctacaagg tgcagggatg agataaatcc accaaagaag 840

ggctacaagt tcacaaacca acctctgaag gatctaggca tcaagttcac acctgtgcat 900

gaatacctgt atgaagcagt gaagtccctg gaagacaaag gattcatcaa gaagacctcc 960

aataccaagg agcttcacag gcaaagttct ccccctcaaa attcacccgc gagcatgctg 1020

atgtcgaagc tttga 1035