



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월15일
(11) 등록번호 10-1857452
(24) 등록일자 2018년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8271 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0169185
(22) 출원일자 2016년12월13일
심사청구일자 2016년12월13일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100100097 A*
Evolutionary Applications. Vol.6, No.3, 페이지 434-449 (2013.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이상열
경상남도 진주시 진주대로 829번길 21 삼환나우빌
101동 1801호
이은선
전라남도 순천시 연향1로 55 부영아파트 1201동
702호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

전체 청구항 수 : 총 1 항

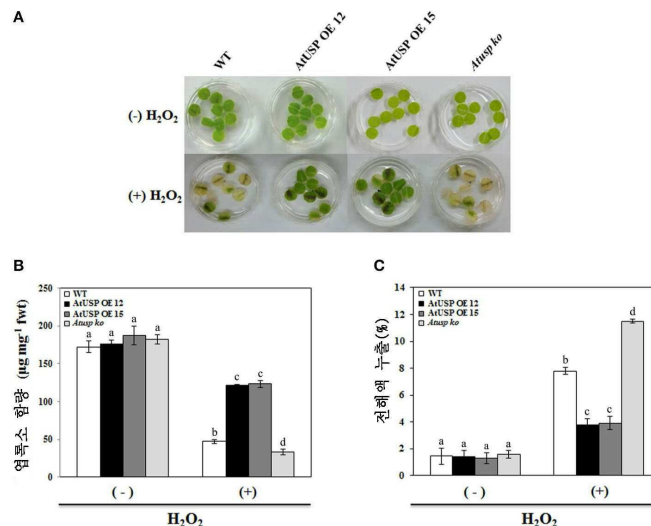
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 아라비돕시스 보편적 스트레스 단백질을 과발현하는 열 충격 및 산화 스트레스 저항성 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 열 충격 및 산화 스트레스 저항성을 나타내는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 아라비돕시스 보편적 스트레스 단백질(AtUSP) 과발현 형질전환 식물체에 관한 것이다. 또한 상기 아라비돕시스 보편적 스트레스 단백질은 외부 열 충격 및 산화 스트레스에 응답하여 저분자량(LMW)의 중 물질로부터 고분자량(HMW)의 복합체로 전환되고 스트레스 조건하에서 강한 샤페론 기능을 나타내는 단백질을 특징으로 하는 AtUSP 과발현 형질전환 식물체에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 15/8273 (2013.01)

(72) 발명자

박정훈

대구광역시 동구 신암로16길 33 신천가람타운 104
동 809호

강창호

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교

지용훈

경상남도 진주시 진양호로125번길 17

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-1091

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 저온 스트레스 하에서의 대장균 Heat shock proein 33(Hsp33)의 RNA chaperone으로서의 기능 규명(1차년도)

기여율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2014.12.17 ~ 2015.12.16

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-0838

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초지원사업

연구과제명 (1차년도) 수도에서 구리독성에 대한 엽록체 산화환원 단백질인 OsTrxm의 방어기작 메커니즘에 대한 연구

기여율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

식물체 내에서 외부 열 충격 및 산화 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 열 충격 및 산화 스트레스에 응답하여 분자량 17.8 kDa의 아라비돕시스 보편적 스트레스 단백질(AtUSP) 모노머로부터 AtUSP 단백질 올리고머 복합체로 전환되어 열 충격 및 산화 스트레스 조건하에서 샤페론 기능을 나타내는 서열번호: 1의 아미노산 서열로 구성된 아라비돕시스 보편적 스트레스 단백질(AtUSP)을 포함하는 조성물에 있어서,

상기 AtUSP 단백질 모노머로부터 AtUSP 단백질 올리고머 복합체로 전환은 가역적 산화환원 의존적으로 전환되며,

AtUSP 단백질 올리고머 복합체로의 전환은 AtUSP 아미노산 서열 내의 소수성 극성 아미노산 그룹과 ATP-결합 모티프 사이의 수소결합 형성으로 분자 구조가 전환되는 것이며,

AtUSP 단백질 모노머의 가역적 환원은 디티오프레이톨(DTT) 처리로 AtUSP 단백질 모노머로 분해시키는 것이며,

상기 ATP-결합 모티프는 G-2X-G-9X-G-(S/T)(상기 식에서 2X는 임의의 2개의 아미노산, 9X는 임의의 9개의 아미노산을 의미함)이고,

AtUSP 단백질을 과발현하는 식물체는 열 충격 및 산화 스트레스로부터 향상된 저항성을 나타냄

을 특징으로 하는 AtUSP 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 열 충격 및 산화 스트레스 저항성을 나타내는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 아라비돕시스 보편적 스트레스 단백질(AtUSP) 과발현 형질전환 식물체에 관한 것이다. 또한 상기 아라비돕시스 보편적 스트레스 단백질은 외부 열 충격 및 산화 스트레스에 응답하여 저분자량(LMW)의 중 물질로부터 고분자량(HMW)의 복합체로 전환되고 스트레스 조건하에서 강한 샤페론 기능을 나타내는 단백질임을 특징으로 하는 AtUSP 과발현 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

식물은 고작 생물체이기 때문에 성장, 발달, 생존이 추위, 더위, 가뭄, 홍수, 고염 및 강풍을 포함하는 다양한 외부 환경적 스트레스에 상당한 영향을 받는다. 이러한 스트레스는 과산화수소(H_2O_2), 과산화 음이온($\cdot O_2^-$), 싱글렛 산소(1O_2) 및 히드록시기($\cdot OH$)와 같은 활성산소종(ROS)의 생성에 원인이 된다. 활성산소종(ROS) 생성량에 따라 단백질 키나제, 포스파타제, 전사 인자, 분자 샤페론 및 방어 관련 단백질과 같은 세포 내 하부 시그널 시스템이 활성화 될 수 있다. ROS는 이중적 기능을 나타내고 유익한 시그널 분자로서 방어 시그널 캐스케이드를

활성화시키며 한편으로는 유해한 식물 호기성 대사 부산물을 생성하는 것이다.

- [0003] 보편적 스트레스 단백질 도메인(USP) 유전자는 보편적 스트레스 단백질 A 도메인(USPA, Pfam 접근번호 PF00582) 내에 140 내지 160개의 매우 고도로 보존된 잔기를 포함하는 단백질을 코드화시킨 것으로 대표적 스트레스 반응 유전자이다. 예를 들면 염분, 가뭄, 추위, 더위 및 산화 스트레스와 같은 다양한 환경 스트레스에 응답 반응을 나타낸다. USP 유전자는 세균, 고세균, 진균, 원생동물, 식물체, 포유류 등을 포함하는 대부분의 생물체 전반에 널리 퍼져있다.
- [0004] C13.5 단백질은 박테리아로부터 처음 분리되었다. 그 명칭은 USP로 변경되었으며 이는 다양한 스트레스에 응답하는 능력을 지닌 것을 반영한 것이다. 대장균으로부터 USP는 그 단백질 구조 및 아미노산 서열에 따라 4개의 클래스로 나눌 수 있다. 클래스 1(UspA, USPC 및 USPD), 클래스 2 (UspG 및 UspF) 및 클래스 3 및 4(UspE의 2개의 도메인)로 구성되어 있다. 박테리아 USP는 철 포집, 산화 스트레스 저항성, 세포 부착 및 세포 운동성과 관련되어 있다. Methanocaldococcus jannaschii로부터 분리된 MJ0577 내의 USP 도메인은 ATP-결합 모티프를 포함하고 ATP아제 또는 ATP-결합 분자 스위치로서 생화학적 기능을 나타낼 수 있다. 이와 반대로 Haemophilus influenza 내의 USP 도메인은 ATP-결합 잔기 또는 ATP-결합 활성을 모두 지니지 않는다.
- [0005] 박테리아 USP 단백질의 다양한 영역의 생리학적 정보에도 불구하고 USP의 생화학적, 분자 메커니즘은 아직 규명되지 못하고 있다. 이는 본 발명자들에게 식물체 내에서 이러한 단백질의 생화학적 기능을 조사하도록 동기 부여하였다.
- [0006] 아라비도시스 탈리아나 유전자는 박테리아 USP와 동등한 44개 단백질을 포함하고 있으며 이러한 단백질 서열 및 구조 유사성에 근거하여 아라비도시스로부터 USP의 서열 분석은 이러한 단백질이 1MJH-유사 기원 단백질로부터 진화하였음을 나타낸다.
- [0007] AtPHOS32 및 AtPHOS34 등의 두 개의 아라비도시스로부터 유래된 USP는 미생물 유발(elicitation)에 응답하여 인산화되고 AtPHOS32는 MAP 키나제 3 및 6의 기질로 나타난다. 벼에 있어서, OsUSP1은 생물체내의 가스상태 호르몬인 에틸렌에 응답하여 세포 하부 시그널 캐스케이드를 활성화시키는 것으로 나타난다. 이는 식물체가 산소 감소 상태에서 적응할 수 있게 한다. 이와 유사하게 Gossypium arboreum, Astragalus sinicus, Solanum pennellii 및 Salicornia brachiata의 USP 유전자는 수분 스트레스 및 근류 형성(nodulation), 가뭄, 염분 및 삼투압 저항성에 관련된 것으로 여겨진다.
- [0008] 본 발명자들은 AtUSP를 과발현하는 형질전환 식물을 분석함으로써 AtUSP(At3g53990)의 생화학적 및 분자적 기능을 조사하였으며 또한 Atusp의 넥아웃 변이체와 AtUSP의 재조합 형질전환체의 기능 역시 조사하였다.
- [0009] 이에 따라 본 발명자들은 AtUSP를 과발현하는 식물체는 열충격 및 산화 스트레스에 대한 강한 저항성을 나타냄을 확인하고 AtUSP가 분자 샤페론 기능을 나타내고 샤페론 활성은 산화환원과 열 충격-의존적으로 조절되고 단백질의 구조적 변화를 동반함을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다. 또한 AtUSP의 샤페론 기능은 식물체를 열 충격 및 산화 스트레스로부터 보호하기 위한 필수적 역할을 함을 확인하였다.
- 발명의 내용**
- 해결하려는 과제**
- [0010] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 AtUSP를 과발현하는 형질전환 식물을 분석함으로써 AtUSP(At3g53990)의 생화

학적 및 분자적 기능을 측정하고 또한 Atusp의 녀아웃 변이체와 AtUSP의 재조합 형질전환체의 기능 역시 측정코자 한 것이다. 즉 AtUSP를 과발현하는 식물체는 열충격 및 산화 스트레스에 대한 강한 저항성을 나타냄을 측정하고 AtUSP가 분자 샤페론 기능을 나타내고 샤페론 활성은 산화환원과 열 충격-의존적으로 조절되고 단백질의 구조적 변화를 동반함을 확인코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 아라비돕시스 보편적 스트레스 단백질(AtUSP)을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 AtUSP 단백질은 식물체 내에서 외부 열 충격 및 산화 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 열 충격 및 산화 스트레스에 응답하여 저분자량(LMW)의 중 물질로부터 고분자량(HMW)의 복합체로 전환되고 열 충격 및 산화 스트레스 조건하에서 강한 샤페론 기능을 나타냄을 특징으로 하는 AtUSP 단백질을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 이때 상기 AtUSP의 저분자량(LMW)의 중 물질로부터 고분자량(HMW)의 복합체로 전환은 산화환원 의존적으로 가역적으로 전환되며 AtUSP 아미노산 서열 내의 AtUSP의 올리고머화 또는 소수성 상호작용에 관련된 극성 아미노산 그룹과 ATP-결합 모티프 사이의 수소결합 형성으로 분자 구조가 전환되는 것임을 특징으로 한다.

[0013] 또한 상기 ATP-결합 모티프는 G-2X-G-9X-G-(S/T)(상기 식에서 2X는 임의의 2개의 아미노산, 9X는 임의의 9개의 아미노산을 의미함)임을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 아라비돕시스 보편적 스트레스 단백질(AtUSP)을 과발현하는 열 충격 및 산화 스트레스 저항성 형질전환 식물체에 있어서, 상기 AtUSP 단백질은 식물체 내에서 외부 열 충격 및 산화 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 열 충격 및 산화 스트레스에 응답하여 저분자량(LMW)의 중 물질로부터 고분자량(HMW)의 복합체로 전환되고 열 충격 및 산화 스트레스 조건하에서 강한 샤페론 기능을 나타냄을 특징으로 하는 AtUSP를 과발현하는 열 충격 및 산화 스트레스 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 효과는 AtUSP를 과발현하는 열충격 및 산화 스트레스에 대한 강한 저항성을 나타내는 식물체를 제공하는 것이다. 또한 과발현된 AtUSP가 분자 샤페론 기능을 나타내고 샤페론 활성은 산화환원과 열 충격-의존적으로 조절되고 단백질의 구조적 변화를 동반하는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 열 충격 및 산화 스트레스에 응답하여 다양한 조직 내에서 AtUSP mRNA의 발현을 나타낸 도면이다.

도 1a는 아라비돕시스의 다양한 조직 내의 AtUSP 발현을 나타낸 것이다. 도 1b는 5mM H₂O₂ 또는 37°C 열충격 처리 후 AtUSP의 발현이다. 시간은 H₂O₂ 및 열충격 처리 후 경과된 시간을 나타낸다. 튜블린을 대조군으로 사용하였다.

도 2는 아라비돕시스의 야생형, AtUSP 과발현형 및 Atusp 녀아웃 변이체에 대한 산화 스트레스 저항성을 비교한 것이다. (A) 3주령의 야생형, AtUSP 과발현형 및 Atusp 녀아웃 변이체 각각 9개의 잎 디스크를 진공으로 물 침투시키거나 1분간 10mM H₂O₂를 침윤시킨 후 22°C에 성장 챔버에 이송하였다. (B) 시료를 5일 후에 수집하여 엽록소 함량을 측정하였다. (C) 전해액 누출을 시험하였다.

도 3은 아라비돕시스의 야생형, AtUSP 과발현형 및 Atusp 녀아웃 변이체에 대한 열 충격 저항성을 비교한 것이

다. (A) 10일령의 아라비도시스 묘목에 열 충격을 가한 후 지시한 대로 22℃의 최적 성장 조건으로 이송하였다. 식물체의 열 저항성을 4일간의 회복기간 후 최적 조건하에서 측정하였다. 10일령의 아라비도시스 묘목을 22℃에서 4일간 성장시킨 것을 대조군으로 사용하였다. (B) 엽록소, (C) 전해액 누출, (D) 신선 중량을 측정하였다.

도 4는 시험관 내에서 AtUSP의 산화환원 의존적 구조 변화를 나타낸 것이다. 재조합 AtUSP의 산화환원 의존적 구조 변화를 (A) 12% 비환원 SDS-PAGE, (B) 환원 SDS-PAGE 겔에 은 염색을 통해 측정하였다. 도 4a, 도 4b는 정제 AtUSP(레인 1)와 50mM DTT로 처리한 AtUSP(레인 2)를 PAGE 겔에 로딩시킨 것이다. 레인 3의 시료는 레인 2에 사용된 샘플로부터 투석을 통해 DTT를 제거시킨 후 AtUSP를 50mM H₂O₂로 처리시켜 SDS-PAGE 겔에 로딩시킨 것이다. 도 4c는 (A)와 동일한 방법으로 처리한 AtUSP의 산화환원 의존적 구조 변화를 SEC를 사용하여 분석한 것이다. 도 4d는 AtUSP(10 μM)에 10 μM의 bis-ANS와의 결합 친화력을 비교한 것이다. bis-ANS의 형광 강도를 390nm 여기 파장과 400nm 내지 600nm 발광 파장을 사용하여 측정하였다. (◆) bis-ANS 단독, (■) 비처리 AtUSP, (▲) DTT로 처리한 AtUSP 및 (●) H₂O₂로 처리한 AtUSP를 나타낸다.

도 5는 생체 내에서 AtUSP의 산화환원 의존적 구조 변화를 나타낸 것이다. FLAG와 융합시킨 AtUSP를 과발현하는 2주령 형질전환 식물체 샘플을 10mM H₂O₂와 DTT로 처리하여 준비하였다. 단백질을 비환원성(좌측) 및 환원성(우측) SDS-PAGE 겔에 로딩시킨다. 단백질 구조를 FLAG-태그 항체를 이용한 웨스턴 블로팅에 의해 측정하였다. 레인 1: AtUSP를 과발현하는 전환체로부터 수득된 총 단백질(30 μg). 레인 2: AtUSP를 과발현하는 전환체를 10mM DTT로 처리한 단백질 샘플. 레인 3: 레인 2의 AtUSP 과발현 전환체로부터 투석에 의해 DTT를 제거하고 10mM H₂O₂로 처리한 단백질 샘플.

도 6은 AtUSP의 산화환원 의존적 샤페론 기능을 나타낸 것이다. 도 6a는 AtUSP 존재하에 1.5 μM MDH의 열 응집을 45℃에서 20분간 측정하였다. AtUSP와 MDH의 몰 비율은 (■) 1:0.5, (▲) 1:1 및 (●) 1:3이었으며 (◆) 음성 대조군(MDH 단독), (○) 양성 대조군(AtTrx-h3)을 나타낸다. 도 6b는 MDH를 통한 AtUSP의 산화환원 의존적 샤페론 활성을 나타낸 것이다. (◆) MDH 단독, (■) AtUSP, (▲) DTT-처리된 AtUSP 및 (●) H₂O₂-처리된 AtUSP를 MDH로부터 열 응집을 보호하기 위한 수준을 측정하는데 사용하였다.

도 7은 AtUSP의 구조적 변화에 대한 열 충격의 효과를 나타낸 것이다. 도 7a는 재조합 AtUSP에 다양한 온도에서 20분간 열 충격을 가한 후 얻어진 단백질을 천연-PAGE(상단)와 SDS-PAGE 겔(하단)을 사용하여 분리한 것이다. 도 7b는 열 충격 처리된 AtUSP의 구조 변화를 측정하기 위해 SEC로 분석한 것이다. 도 7c는 열 충격 매개된 AtUSP의 소수성 형질변화를 bis-ANS 결합에 의해 측정한 것이다. AtUSP는 (■) 30℃, (▲) 40℃ 또는 (●) 50℃에서 30분간 인큐베이션시켰다. (◆) 대조군(bis-ANS 단독)을 나타낸다. 도 7d는 열 충격 관련된 AtUSP의 샤페론 기능 증진을 나타낸 것이다. MDH의 열 응집을 열 충격 처리 AtUSP 단백질 존재하에 45℃에서 20분간 측정하였다. (■) 30℃, (▲) 40℃ 또는 (●) 50℃에서 20분간 열 충격. (◆) 대조군(MDH)을 나타낸다.

도 8은 T-DNA Nick-out의 선별과 AtUSP를 과발현하는 변이주의 개략적 도면이다. 도 8a는 T-DNA 삽입을 나타내는 AtUSP(At3g53990) 유전자의 구조이다. 또한 제노타입과 SALK_146059 주로부터 AtUSP 전사체의 RT-PCR 분석을 나타낸 것이다. 도 8b는 AtUSP를 과발현하는 변이주의 구조 및 선별이다. AtUSP의 발현은 FLAG-태그 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅 법으로 감지한다. 형질전환주 #12 및 #15(별표로 마킹하였음)는 추가 실험을 위해 선별되었다. 도 8c는 AtUSP와 융합시킨 3xFlag의 구조를 나타낸 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열이다. 붉은색과 푸른색은 Flag와 AtUSP의 전체 길이에 대한 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 각각 나타낸다. 검은색 밑줄은 다중 클로닝 사이트(MCS) 영역을 나타낸다.

도 9는 AtUSP의 소수성 측정을 나타낸 것이다. AtUSP의 소수성 플롯은 Kyte-Doolittle 분석법으로 생성되었다. 붉은색 줄은 AtUSP의 중요한 소수성 잔기의 분리 스코어를 나타낸다. y-축은 소수성 스코어를 나타낸다. y-축상의 양성 스코어는 소수성 영역을 나타낸다.

도 10은 AtUSP의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열과 여러 종으로부터 USP의 다중 서열 정렬(MSA)를 나타낸다. 도 10a는 AtUSP의 뉴클레오타이드 서열은 삽입된 첫 번째 뉴클레오타이드로부터 시작하여 번호를 부여하였다. 아미노산 번호 시작은 첫 번째 메티오닌 잔기부터이다. 스톱 코돈은 별표로 마킹하였다. AtUSP의 두 개의 시스템인 잔기를 붉은색 박스로 표시하였다. 추정되는 ATP-결합 잔기를 포함하는 G2XG9XG(S/T) 모티프를 밑줄 쳤다. 도 10b는 아라비도시스로부터의 USP(AtUSP, NP_566991.1), 벼(OsUSP1, AAR87267), 토마토(SpUSP, SGN-U214690), 대장균(EcUspA, U00039) 및 M.jannaschii(MJ0577, NP_247556)로부터의 USP의 MSA를 나타낸 것이다. MSA는 ClustalW를 사용하여 생성하였다. 서열 정렬 내의 보존된 아미노산 영역을 음영으로 표시하였다. 75% 이상의 아미노산이 보존된 경우 검은색 음영으로 표시하였다. 아미노산 보존이 65% 내지 75%인 영역은 회색으로

음영 표시하였다. 서열 밑의 검은색 바는 ATP의 아데닌(A), 인산(P) 또는 리보스(R)를 마주보고 있는 kwsr1를 나타낸 것이다. M.jannaschii MJ0577의 결정 구조로부터 유래된 것과 같이 그 밖의 것은 이중체 도메인(D)에 위치한다. AtUSP의 2차 구조 엘레먼트를 Jpred 프로그램을 사용하여 예측하였다. 결정 구조에 기반한 MJ0577 단백질의 2차 구조는 도면에 나타난 것과 같이 정렬되어 있다[E, 연장된 변형(β -가닥); H, α -helix]. 정렬 사이의 간격은 대쉬에 의해 표시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 보편적 스트레스 단백질(USPs)의 다양한 영역의 생리적 정보가 대다수의 생물체에서 이용 가능하지만 그의 생화학적 기능, 분자적 기능은 아직 규명되지 않고 있다. 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 분리된 AtUSP 단백질 (At3g53990)(서열번호: 1)의 생화학적 기능은 현재 조사중에 있다.
- [0018] AtUSP를 과발현하는 식물체는 야생형 및 AtUSP 녹-아웃형 식물체에 비해 높은 열 충격 및 산화 스트레스 저항성을 나타낸다. 이는 AtUSP가 스트레스 저항성에 결정적 역할을 함을 확인시켜 주는 것이다.
- [0019] AtUSP는 단량체, 이량체, 삼량체 및 올리고머 복합체를 포함하는 다양한 구조로 존재하고 있으며 외부 스트레스에 응답하여 저분자량(LMW) 중 물질로부터 고분자량(HMW) 복합체로 전환될 수 있다. AtUSP는 특히 스트레스 조건하에서 강한 샤페론 기능을 나타내고 이러한 샤페론 활성은 열 충격에 의해 유의미하게 증가된다.
- [0020] AtUSP 샤페론 활성은 세포의 산화환원 상태에 의해 결정적으로 조절되고 단백질 구조 변화를 동반한다. AtUSP 과발현은 샤페론 기능을 통해 일차적으로 아라비돕시스에 열 충격 및 산화 스트레스에 대한 강한 저항성을 부여한다.
- [0021] 이하 본 발명을 첨부된 도면에 의거 더욱 상세히 설명한다.
- [0022] (1) 아라비돕시스 내의 AtUSP의 열 충격 및 산화 스트레스 의존적 발현
- [0023] 다수의 USP가 다양한 생물체 내에서 스트레스-저항성 분자로 확인되었지만 USP 작동의 분자적 메커니즘은 아직 규명되지 않고 있다.
- [0024] 아라비돕시스 내의 44개 USP 단백질 중 특히 AtUSP(At3g53990) 단백질이 아라비돕시스에 대한 다양한 비생물학적 스트레스를 유발하는 것으로 eFP 브라우저(<http://www.bar.utoronto.ca/>)와 간행된 논문에서 알려져 있다. 본 발명자들은 아라비돕시스의 스트레스 저항성과 관련된 USP의 생화학적 및 분자적 기능을 규명하기 위해 AtUSP(At3g53990)를 선택하였다. 식물체 내에서 AtUSP의 발현 수준을 측정하기 위해 RT-PCR을 사용하였으며 AtUSP는 뿌리, 줄기, 잎 및 꽃을 포함하는 아라비돕시스의 대다수 조직에서 광범위하게 발현되었다(도 1a). 유사한 단백질을 암호화시킨 mRNA가 다른 생물체 내에서 다양한 생물학적 및 비생물학적 스트레스 조건 하에서 발현되기 때문에 본 발명자들은 H_2O_2 처리 및 열 충격 후에 아라비돕시스 내의 AtUSP mRNA 발현을 분석하였다. 10 일령 아라비돕시스 묘목 내의 AtUSP 전사 수준은 산화적 스트레스 후 뿐만 아니라 열 충격 조건하에서도 점증적으로 증가하였다(도 1b). 이는 AtUSP가 식물 조직 내의 방어 시스템에서 중요한 역할을 수행함을 암시하는 것이다.
- [0025] (2) AtUSP는 식물체에 열 충격 및 산화 스트레스 저항성을 증진시킨다.
- [0026] AtUSP의 발현이 열 충격 또는 산화 스트레스에 의해 유의미하게 증가(도 1)하기 때문에 본 발명자들은 T-DNA 삽

입을 통한 다양한 전환체 내에서 이들의 생리학적 기능을 조사하였다. 이는 Atusp 넉아웃 형질체(SALK_146059: 도 8a) 및 스트레스 조건하에서 CaMV35S 프로모터에 의해 AtUSP를 과발현하는 형질전환 식물체이다(도 8b).

- [0027] 계놈의 PCR 분석과 cDNA 발현 수준은 Atusp가 아라비도시스의 동형접합(homozygous) 기능 손실 변이체임을 확인하였다(도 8a). 또한 AtUSP를 과발현하는 식물체의 20개 이상 독립적인 형질전환체를 생성하였다. AtUSP를 과발현하는 아라비도시스 동형접합 T3 전환체 내에서 본 발명자들은 FLAG-태그 항체를 사용하여 분석하였을 때 AtUSP를 강력하게 발현하는 것으로 나타난 전환체 #12와 #15를 선별하여 연구를 계속하였다(도 8b).
- [0028] 산화 스트레스 조건 하에서 AtUSP의 생체 내 역할을 측정하기 위해 잎 디스크를 야생형(WT) 식물체, Atusp 변이체 및 AtUSP 과발현 전환체의 3주령 아라비도시스 묘목으로부터 채취하고 10mM H₂O₂로 처리하였다. AtUSP를 과발현하는 전환체 및 Atusp 변이체로부터 디스크는 10mM H₂O₂의 처리 5일 이내에 야생형(WT) 식물체와 비교하여 저항성 및 민감한 표현형을 각각 나타내었다(도 2a). 과발현 전환체의 스트레스 저항성과 AtUSP의 민감성은 스트레스 조건하에서 총 엽록소 함량과 전해액 누출을 측정함으로써 확인되었다.
- [0029] 그 결과는 표현형 차이에 상응하는 것이었다(도 2a). AtUSP를 과발현하는 식물체로부터의 디스크는 3배 이상의 엽록소 함량을 나타내고 야생형(WT) 식물체의 디스크보다 낮은 전해액 누출을 나타내었다. 또한 Atusp 식물체로부터의 디스크는 동일한 조건 하에서 야생형(WT) 식물체의 디스크보다 2배 낮은 엽록소 함량과 높은 전해액 누출을 나타내었다(도 2b, 2c).
- [0030] 산화적 스트레스뿐만 아니라 열 충격 조건 하에 아라비도시스 내의 AtUSP의 생물학적 중요성이 측정되었다. 야생형(WT), 넉아웃형(Atusp) 및 AtUSP 과발현 형질전환체로부터 수득된 10일령 아라비도시스 묘목을 43℃ 열 충격 처리를 2시간 적용하였다. 열 충격 처리 후, 모든 식물체를 22℃의 최적 성장 조건으로 이송시키고 회복시킨다(도 3a 상부). 과발현 형질전환체의 대부분은 야생형(WT) 식물체 및 Atusp 넉아웃 변이체에 비해 열 충격으로부터 회복되었다. 이에 따라 녹색 엽료의 성장과 발달이 회복되었다. 또한 Atusp 변이체는 희고 창백한 잎을 나타내어 야생형(WT) 식물체에 비해 사멸된 것으로 보였으며 이는 Atusp 변이체가 열 충격으로부터 회복되지 못함을 의미하는 것이다(도 3a).
- [0031] 전해액 누출, 엽록소 함량 및 신선(fresh) 중량의 측정을 통해 AtUSP를 과발현하는 식물체 및 Atusp 변이체가 야생형(WT) 식물체에 비해 열 충격에 저항적이거나 민감함을 나타내는 것이다(도 3b~도 3d). 이는 AtUSP가 열 충격 및 산화 스트레스로부터 식물체의 보호에 중요한 역할을 함을 의미하는 것이다. 이는 또한 미생물체 내에서 USP의 작용을 보고한 데이터와도 일치하는 것이다.
- [0032] (3) 산화 스트레스에 응답하는 AtUSP의 산화환원-의존적 구조 및 기능의 변화
- [0033] 다수의 작은 열 충격 단백질(sHSP)은 샤페론 기능과 열 충격 및 산화 스트레스로부터 세포 보호 기능을 위해 구조적 변환을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 구조적 형질 전환은 이의 소수성 형질의 변화를 야기한다. 특히 AtTrx-h3, AtTDX 및 2-Cys 퍼옥시레독신(2-Cys Prx)을 포함하는 몇몇 산화환원 단백질은 산화적 및 열 충격 저항성에 결정적인 역할을 하며 분자 샤페론으로 작용하고 저분자량(LMW)에서 고분자량(HMW)으로 그 구조의 변화를 나타내는 것으로 알려져 있다.
- [0034] AtUSP는 열 충격 및 산화 스트레스로부터 아라비도시스를 보호하는 것으로 알려졌기 때문에 본 발명자들은 산화 스트레스에 응답하는 샤페론 기능과 구조 변화를 측정하였다. 우선 본 발명자들은 ProtScale 데이터베이스(<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>)를 통해 AtUSP의 소수성 형질을 분석하였다. 이는 AtUSP가 다양한 소수성 영역을 포함하는 구조를 지닌 것으로 분석되었으며 이는 단백질 안정성 및 고분자 구조에 기여하는

것이다(도 9). 다양한 스트레스에 의해 자극되는 USP는 티오레독신(Trx)의 목표 단백질로 알려져 있으며 이는 상호작용 파트너의 산화환원 상태를 조절하는 것이다. 본 발명자들은 AtUSP가 산화 스트레스로부터 식물체의 저항성을 증진시킨다는 관찰을 통해 AtUSP를 산화환원-조절 단백질로 추측하였다.

[0035] Trx 및 Prx와 같은 산화환원-조절 단백질 같이 AtUSP가 생체 내에서 산화환원-의존적 구조 변화를 나타내는지를 측정하기 위해 본 발명자들은 박테리아 내에 재조합 AtUSP를 발현시켰다. 재조합 AtUSP를 정제시키고 환원적 및 비환원적 SDS-PAGE 조건하에서 산화환원-의존적 구조 변화를 측정하였다. AtUSP는 순차적으로 DTT 및 H_2O_2 를 처리하고 PAGE를 사용하여 전기영동시킨 후 구조 변화를 측정하였다.

[0036] 비환원 조건하에서 AtUSP의 단백질 구조는 주요 밴드로서 단량체 단백질을 포함하는 몇몇 올리고머 단백질 복합체로 구성되어 있다(도 4a, 레인 1). 그러나 10mM DTT의 처리는 AtUSP의 올리고머 구조를 분해시켜 단량체로 전환시키도록 야기한다(도 4a, 레인 2). 이는 AtUSP의 호모-고분자 구조가 이황화 결합을 통해 몇몇 AtUSP 서브유니트의 결합으로 생성되는 것을 암시하는 것이다.

[0037] AtUSP 단백질 구조 변화가 가역적으로 산화환원-의존적인지 여부를 측정하기 위해 DTT를 투석에 의해 AtUSP로부터 완전히 제거하고 단백질을 10mM H_2O_2 로 30분간 처리한 후 AtUSP가 DTT 처리에 의해 단량체화 되어있는지 여부를 측정하였다. 또한 산화제 H_2O_2 에 의해 다시 중합되는지를 측정하였다. 처리된 샘플을 비환원 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다.

[0038] 그 결과는 AtUSP의 환원된 티올 그룹이 다시 산화되어 이황화 결합을 형성하고 고분자 구조를 형성함을 확인하였다(도 4a, 레인 3). 이와는 반대로 환원적 SDS-PAGE 조건하에서 AtUSP는 분자량 약 17.8 kDa의 단일 단백질 밴드를 나타내었다. 이는 β -머캅토에탄올 처리가 AtUSP 다량체를 그의 단량체로 완벽히 분해시킴을 나타내는 것이다(도 4b). AtUSP의 산화환원-의존적 구조 변화는 SEC를 사용하여 확인되었다. AtUSP의 단백질 구조는 DTT 또는 H_2O_2 처리로 가역적으로 LMW 종으로부터 HMW 복합체로 이동되었다(도 4c).

[0039] 이어서, AtUSP의 DTT 및 H_2O_2 처리를 통한 구조 변화의 정도를 측정하기 위해 bis-ANS 결합을 확인하였다. H_2O_2 -처리된 AtUSP의 형광 강도는 비처리 또는 DTT-처리 AtUSP에 비해 높게 나타났다(도 4d).

[0040] 시험관 내 시험에서 확인된 구조 변화를 생체 내에서 분석하기 위해 과발현 전환체 #12로부터 2주령 형질전환 아라비도시스 식물체를 사용하여 측정하였다. 식물체로부터 추출된 단백질을 DTT 또는 H_2O_2 로 처리하고 진공 칩 투시시켰다. 그 후 환원 및 비환원 조건하에서 SDS-PAGE로 전기영동시킨다. 비환원 조건하에서 생체 내 AtUSP는 과량의 SDS(1%) 존재에도 불구하고 다수의 올리고머 단백질과 단량체 밴드와 일치하는 다수의 단백질 밴드를 나타낸다(도 5, 레인 1).

[0041] 이는 올리고머화의 주요 원인이 소수성 상호작용임을 나타내는 것이다. 그러나 비환원 조건하에서 분석하기 전에 AtUSP를 DTT와 함께 인큐베이션시키면 AtUSP의 올리고머 구조는 완벽하게 모노머로 분해된다(도 5, 레인 2). 물론 모노머 형태에 H_2O_2 를 처리함으로써 원래의 폴리머 구조가 복원될 수 있다 (도 5, 레인 3). 시험관 내 시험 및 생체 내 시험 결과를 통해 AtUSP 각각의 단백질은 소수성 상호작용과 이황화 결합을 통해 폴리머 복합체를 형성할 수 있고 이러한 구조의 형성은 산화환원 의존적 방법으로 가역적으로 조절될 수 있는 것이다.

[0042] (4) AtUSP는 샤페론 기능을 나타낸다.

[0043] 분자 샤페론은 세포 내에서 인접한 단백질의 응집을 방지하고 스트레스로부터 기질 응집을 보호하기 위해 정확한 폴딩을 가능케 하는 것으로 알려져 있다. 샤페론 단백질은 이량체, 삼량체 및 더 높은 올리고머 복합체로 구성된 멀티머 형상으로 존재할 수 있다. AtUSP는 폴리머 구조를 형성하였으며 본 발명자들은 샤페론 활성을 지니고 있는지를 조사하였다. MDH를 AtUSP의 단백질 열 응집 보호 기능을 측정하기 위한 기질로 사용하고 AtTrx-h3을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0044] AtUSP 함량의 증가와 함께 MDH의 인큐베이션은 점차적으로 기질을 열 응집으로부터 보호하였다. 이는 1 MDH에 대해 3 AtUSP 서브유닛 몰비율로 블로킹되는 것을 나타낸다(도 6a). 이는 AtUSP가 다양한 외부 스트레스로부터 식물체를 보호하는 새로운 분자 샤페론 기능을 지니고 있음을 나타내는 것이다. 또한 AtUSP 단백질 구조가 그의 산화환원 상태에 의해 가역적으로 조절되기 때문에 본 발명자들은 샤페론 기능이 산화환원 의존적인지 여부를 조사하였다.

[0045] 샤페론 활성을 DTT 또는 H_2O_2 로 처리된 AtUSP를 사용하여 측정하였다. H_2O_2 로 처리된 AtUSP는 DTT로 처리된 단백질보다 MDH를 응집으로부터 보호하는 강한 샤페론 활성을 나타내었다. 이는 AtUSP가 유용한 분자 샤페론이며 이의 활성은 산화환원-의존적 방법으로 조절됨을 나타내는 것이다(도 6b).

[0046] (5) AtUSP의 단백질 구조 및 샤페론 기능에 대한 열 충격의 효과

[0047] AtUSP가 분자 샤페론 기능을 나타내기 때문에 본 발명자들은 천연-PAGE 및 SEC를 사용하여 단백질 구조의 열 충격 효과를 측정하였다. 다른 열 충격 단백질(HSP)과 마찬가지로 AtUSP는 열 충격 조건 하에서 HMW 호모-폴리머 복합체의 형성에 관련되어 있다. AtUSP의 구조적 변화가 약 40°C 부근에서 시작되고 거의 모든 단백질은 50°C의 20분간 열 충격 조건하에서 HMW 올리고머 복합체를 형성하게 된다(도 7a). 이는 열 충격이 LMW 단백질 복합체를 HMW 복합체로 전환시키게 함을 암시하는 것이다.

[0048] AtUSP의 열 충격 관련 구조 변화를 SEC를 사용하여 확인하였다. 온도가 상승함에 따라 AtUSP의 올리고머 피크가 상승하고 이의 변화는 동시에 LMW 단백질 수준의 저하로 나타난다(도 7b). 소수성 형질변화를 측정하기 위해서 bis-ANS 결합을 열 충격 처리 AtUSP 내에서 분석하였다. bis-ANS의 형광 강도는 높은 온도에서 유의미하게 증가하였으며 이는 AtUSP의 소수성 영역의 다수가 상승된 온도에 노출되어 있음을 나타내는 것이다(도 7c). 또한 본 발명자들은 MDH를 기질로 사용하여 AtUSP의 열 충격-의존 샤페론 활성을 측정하였다(도 7d). 이들 결과는 AtUSP가 열 충격 및 산화 스트레스로부터 식물체를 보호하는 결정적인 역할을 한다는 근거와 일치하였으며 분자 샤페론으로서의 기능은 가역적으로 분자 구조의 변화를 동반하는 것이다.

[0049] USP의 생리학적 특성은 많은 생물체 내에서 잘 연구되었고 예를 들면 염분, 가뭄, 추위, 열, 산화 스트레스, 영양 결핍 및 독성 화합물과 같은 다양한 환경 스트레스에 대한 대장균 내에서 USP의 발현은 잘 알려져 있다. 그러나 USP 작용의 분자적 메커니즘은 아직 규명되지 않고 있다. USP는 단일 USP 도메인을 포함하는 작은 폴리펩타이드(14-15 kDa)일 수도 있고 예를 들면 키나제, 퍼미아제(permease) 또는 전압 채널 도메인과 같은 다른 기능성 도메인을 포함하는 하나 또는 두 개의 USP 도메인으로 구성된 보다 큰 단백질일 수도 있다. 44개의 USP를 포함하는 아라비도시스 계통은 박테리아 USP 도메인과 유사성을 나타내고 다양한 스트레스에 의해 유도된다. AtUSP는 에틸렌과 같은 과일 성숙과 관련된 식물 호르몬에 응답하는 유전자와 유사하게 나타난다. 이와 같은 관찰은 USP의 생화학적 기능이 외부 스트레스로부터 식물체를 보호하는 것을 본 발명자들에게 조사하게 만드는 것이다.

- [0050] AtUSP 아미노산 서열과 다른 생물체 내의 USP 서열간의 비교는 높은 서열 상동성 및 이차 구조 유사성을 나타낸다. M. jannaschii로부터 USP는 MJ0577로 명명되었고 5개의 베타 스트랜드와 4개의 알파 헬릭스 및 보존된 ATP-결합 모티프 G-2X-G-9X-G-(S/T)(도 S3)를 포함한다. 모티프 내에는 3개의 글리신 잔기는 2개 및 9개의 아미노산 잔기를 분리시키며 세린 또는 트레오닌 잔기가 연이어진다. 이러한 모티프는 USP 패밀리(Pfam 접근 번호 PF00582)의 통상적 특성이다. 산화 스트레스가 모든 호기성 생물체에 결정적인 역할을 하기 때문에 AtUSP의 산화와 관련된 기능은 식물체 내에서 이 단백질의 생리학적 중요성을 이해하는데에 큰 도움을 줄 것이다.
- [0051] 본 발명자들은 AtUSP가 열 충격 및 산화 스트레스 조건하에서 분자 샤페론으로 작용하는 새로운 기능을 확인하였다. 또한 이러한 작용은 분자 구조의 변화를 동반하는 것이다. 샤페론 기능과 단백질 구조 변화는 산화환원 의존적으로 조절될 수 있다. 통상의 조건하에서 AtUSP 단백질은 멀티머 복합체로 존재하지만 DTT 처리는 이들 복합체를 단량체로 완전히 분해할 수 있게 한다. 중합체 구조는 H₂O₂ 처리에 의해 가역적으로 회복될 수 있다. 이와 유사하게 식물체 내의 병원균-응답 방어 조절자인 NPR1의 단백질 변형 역시 올리고머 구조로부터 산화환원 단백질(Trx) 존재하에 단량체로 변화되고 살리실산과 같은 병원균-유도 물질을 생성한다.
- [0052] 이러한 구조 변화는 NPR1의 시스톨로부터 핵으로의 트랜스로케이션을 유도하고 이에 따라 방어 관련 하부 유전자를 활성화시킨다. 2-Cys Prx는 시그널 분자와 샤페론 분자의 이중 역할을 수행하고 있으며 산화 스트레스 및 환원 스트레스에 대해 단백질 구조 및 기능의 변화를 나타내는 것이다. 2-cys Prx는 산화 스트레스 조건하에서 매우 중요한 세포간 단백질을 보호하는 것이다.
- [0053] AtTrx-h3 내의 시스테인 잔기는 2-Cys Prx와 NPR1 단백질이 산화환원 상태에서 조절될 수 있는 중요한 역할을 한다. USP가 식물체 내의 Trx 목표이기 때문에 AtUSP의 두 개의 시스테인 잔기는 산화환원 조절에 결정적인 역할을 할 것이다. 이는 추가적 연구를 필요로 한다.
- [0054] 본 발명자들은 박테리아 발현 재조합 단백질과 기질로서 MDH를 사용하여 AtUSP의 샤페론 기능을 확인하였다. AtUSP의 샤페론 기능은 스트레스 조건하에서 현저하게 증가하고 HMW 복합체의 형성을 유도한다. 이는 AtTrx-h3 및 AtNTRC와 유사하게 조절된다. 본 발명자들은 AtUSP 구조의 분자적 변화가 AtUSP의 올리고머화 또는 소수성 상호작용에 관련된 극성 아미노산 그룹과 ATP-결합 모티프 사이의 수소결합 형성으로 야기되는 것으로 간주한다.
- [0055] 식물체 내의 AtUSP 샤페론 기능의 중요성은 AtUSP를 과발현하는 형질전환 식물체를 통해 입증된다. 이러한 식물체는 열 충격 및 산화 스트레스에 향상된 저항성을 나타낸다. 반면 녹아웃 변이체인 Atusp는 낮은 엽록소 함량 및 높은 전해액 누출로 열 충격 및 산화 스트레스 하에 야생형 식물보다 스트레스에 더욱 민감한 표현형을 나타낸다. 그러나 정상 조건하에서 Atusp 녹아웃형, 야생형(WT) 식물체 및 AtUSP 과발현 식물체간에 성장상의 차이는 AtUSP가 식물의 성장 및 발달에 또 다른 역할을 함을 암시하는 것이다. 토마토 식물체에서 SpUSP 전사체는 예를 들면 앱시스산, 지베렐린 또는 에틸렌과 같은 다수의 식물 호르몬에 의해 조절된다. 또한 벼 USP의 발현은 에틸렌에 의해 조절되고 이에 따라 AtUSP의 발현은 식물 호르몬에 의해 조절되는 것으로 여겨진다.
- [0056] 본 발명은 AtUSP의 신규한 생리적 및 분자적 기능을 규명한 것으로 이는 열 충격 및 산화 스트레스로부터 식물체를 보호하는 것으로 작용한다. 본 발명자들은 AtUSP가 산화환원 의존적 샤페론 기능을 지녀 이들의 식물체 내 역할은 더욱 확장된 것이며 이에 따라 다양한 방어 역할을 하는 분자 메커니즘을 이해할 수 있게 될 것이다.
- [0057] 이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다.

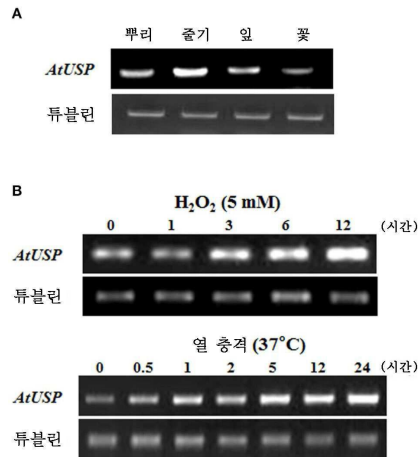
- [0058] (실시예 1) 식물 및 성장 조건
- [0059] 아라비돕시스 탈리아나(콜롬비아 에코타입) 식물체를 16/8시간 명/암 사이클 조건 하에서 70% 습도, 22℃ 온도로 성장시킨다. T-DNA 삽입 Nick-out 변이주(SALK_146059)를 Arabidopsis Biological Resource Center(미국)로부터 구입하였다. 0.25% 피타겔과 3% 설탕을 포함하는 고체 MS 배지를 페트리 디쉬 또는 토양에 넣어 표면 살균 처리된 아라비돕시스 종자를 발아시킨다. 종자는 동시 발아를 위해 4℃에서 3일간 인큐베이션 시킨다. 식물체는 $100\sim120\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 광합성 플럭스 광조건하에서 성장시킨다.
- [0060] (실시예 2) RNA 분리 및 RT-PCR 분석
- [0061] 4주령 야생형 식물체의 뿌리, 줄기, 잎으로부터 및 5주령 야생형 식물체의 꽃을 수득하였다. 5mM 과산화수소 처리 또는 비처리된 10일령 묘목 식물체를 0, 1, 3, 6 및 12시간 후에 채취하였다. 37℃에서 열 충격 처리 또는 비처리된 10일령 묘목 식물체를 0, 1, 3, 6, 12 및 24간 후에 채취하였다. 이들 채취된 샘플을 총 RNA 분리 및 cDNA 합성을 위해 액체 질소를 통해 동결시켰다. 총 RNA를 MACHEREY-NAGEL RNA 키트(Duren, 독일)를 사용하여 채취된 샘플로부터 추출하였다. RevertAid Reverse Transcriptase(Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, 리투아니아)를 사용하여 제조자 지침에 따라 역전사시킨다.
- [0062] 새로 합성된 cDNA를 ddH₂O와 함께 50 ng/ μl 로 희석시켰다. PCR 프로그램을 시작하여 95℃에서 2분간 변성시킨 후 95℃에서 20초, 60℃에서 40초, 72℃에서 1분간 24 사이클을 운행하였다. 마지막으로 72℃에서 5분간 신장(elongation) 단계를 수행하였다. AtUSP(AT3g53990)를 코드화하는 유전자에 특이적 PCR 프라이머는 정방 프라이머 5' -GAATTCATGCCTAAAGACAGGAATATCGG-3' (서열번호: 2)와 역방 프라이머 5' -ATCGATTATTCGTTATCCTTGACAACGGT-3' (서열번호: 3)을 사용하였다. AtUSP 유전자 발현 정도는 내부 대조 유전자인 Tubulin(AT5G62690)과 비교하였다. Tubulin(AT5G62690)을 코드화하는 유전자에 특이적 PCR 프라이머는 정방 프라이머 5' -CCAACAACGTGAAATCGACA-3' (서열번호: 4)와 역방 프라이머 5' -TCTTGGTATTGCTGGTACTC-3' (서열번호: 5)를 사용하였다. PCR 생성물을 에티디움 브로마이드로 염색된 1% 아가로스 겔 전기영동법으로 관찰하였다.
- [0063] (실시예 3) AtUSP의 클로닝 및 AtUSP를 과발현하는 형질전환 식물체의 제조
- [0064] AtUSP를 이전에 개시된 방법을 통해 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 아라비돕시스 cDNA 라이브러리로부터 클로닝시켰다. 전체 코딩 서열의 확인 후에 전체 길이 AtUSP cDNA를 바이너리 벡터 pCambia1300 내의 EcoRI/ClaI 사이트에 라이게이션 시켰다. 이는 N-말단 영역에 FLAG-태그를 지닌다(도 8c). 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101를 플라스미드로 형질전환 시키고 플로럴 딥 방법으로 아라비돕시스에 트랜스펙션 시켰다. 형질전환체를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 하이그로마이신(Duchefa)을 함유하는 MS 플레이트에서 선별하였다. AtUSP 발현을 FLAG-태그 항체(Sigma)를 통해 웨스턴 블롯 분석법으로 분석하였다.
- [0065] (실시예 4) 소수성 분석
- [0066] ProtScale 데이터베이스(<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>)를 AtUSP 소수성 분석을 위해 사용하였다. AtUSP의 소수성 플롯을 Kyte-Doolittle 분석법으로 생성시켰다.
- [0067] (실시예 5) AtUSP 재조합 단백질의 정제

- [0068] AtUSP의 전체 길이 cDNA를 아라비도시스 cDNA 라이브러리로부터 분리한 후 pET28a 발현 벡터(NEB)의 BamHI/XhoI 사이트 내로 라이게이션 시켰다. 얻어진 DNA 컨스트럭트로 E. Coli BL.21(DE3) 균주를 형질전환 시켰다. 형질전환체를 암피실린($50\mu\text{g/ml}$)과 클로람페니콜($12.5\mu\text{g/ml}$)을 포함한 LB 배지 상에서 37°C 로 배양하여 OD_{600} 이 0.6~0.8 되도록 37°C 에서 성장시켰다. 재조합 단백질의 발현을 0.5mM 이소프로필- β -D-티오갈락토-피라노사이드(IPTG)를 첨가하여 유도하고 균주를 4시간 더 성장시킨다. 균주를 5000g로 10분간 원심분리시킨 후 채취하고 펠렛을 PBS 완충액(140mM NaCl , 2.7mM KCl , $10\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$ 및 $1.8\text{mM KH}_2\text{PO}_4$, pH7.6)과 1mM PMSF에 재현탁 시켰다. 균주를 사용시까지 -80°C 에서 보관하였다. 동결된 균주를 초음파에 의해 파쇄시킨 후 용해성 추출물을 Ni-NTA 아가로스 컬럼에 로딩시킨다. 재조합 AtUSP를 트롬빈에 의해 컬럼으로부터 용출시키고 4°C 에서 50mM Hepes-KOH(pH 8.0)로 투석시킨다. 재조합 단백질을 Superdex 200 HR 10/30 컬럼을 사용하여 FPLC로 더욱 정제시킨다. AtUSP의 순도를 SDS-PAGE를 사용하여 측정하였다.
- [0069] (실시예 6) 크기 배체 크로마토그래피(SEC)
- [0070] SEC 또는 FPLC(AKTA; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 50mM Hepes-KOH(pH 8.0) 완충액으로 25°C 에서 0.5ml/분의 유속으로 평형화시킨 GE Healthcare사의 Superdex 200 HR 10/30 컬럼을 통해 수행하였다. 단백질 피크(A_{280})에 상응하는 분획을 분리하고 Centricon YM-30 필터(Millipore Co., Santa Clara, USA)를 사용하여 4°C 에서 농축시켰다.
- [0071] (실시예 7) 분자 샤페론 활성 분석
- [0072] AtUSP의 샤페론 활성을 Sigma-Aldrich(Missouri, USA)로부터 구입한 말레이트 탈수소효소(MDH)를 기질로 사용하여 측정하였다. 다양한 농도의 AtUSP를 50mM Hepes-KOH(pH 8.0) 완충액 내의 MDH와 함께 45°C 에서 인큐베이션시켰다. 20분간 인큐베이션시키고 MDH의 열 응집을 자동온도조절 셀 홀더가 부착된 DU800 스펙트로포토미터를 사용하여 A_{340} 에서 탁도를 모니터링함으로써 측정하였다.
- [0073] (실시예 8) 형광 측정
- [0074] 형광을 SFM 25 스펙트로플루오로미터(Kontrom, Zurich, Switzerland)를 사용하여 측정하고 Sigma-Aldrich(Missouri, USA)로부터 구입한 bis-ANS[1,1-bis(4-아닐리노나프탈렌-5-술포산)]의 형광을 측정하기 위해 사용하였다. bis-ANS 형광의 여기 파장은 380nm에 고정시켰고 발광 스펙트럼을 400nm 내지 600nm 사이에서 스캐닝하였다. 50mM Hepes(pH 8.0)에 녹인 $10\mu\text{M}$ AtUSP를 포함하는 반응 혼합물을 25°C 에서 30분간 $1010\mu\text{M}$ bis-ANS와 함께 인큐베이션 시켰다.
- [0075] (실시예 9) 스트레스 처리와 엽록소 함량 및 전해액 누출의 측정
- [0076] 산화 스트레스 처리를 위해 7mm의 직경을 지닌 잎 디스크를 야생형(WT) 식물체와 AtUSP-과발현 식물체 및 Atusp-넉아웃 변이 식물체의 잎으로부터 동일한 스테이지 및 위치에서 채취하였다. 디스크를 10mM H_2O_2 를 함유하는 3ml의 0.1% Tween 20 용액에 침지시켰다. 잎 디스크를 1분간 진공 침투에 놓이게 하고 밝기 조건($300\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 실온 하에서 18 내지 24시간 인큐베이션 시킨다. 얻어진 손실분을 측정하였다. 열 충격 처리를 위해 아라비도시스 묘목을 3% 설탕을 포함하는 MS 배지를 지닌 페트리 디쉬 내에서 성장시킨다. 10일령 아라비도시스 묘목을 지닌 플레이트를 43°C 의 수욕상으로 놓이게 함으로써 열 충격을 가한다. 80%(v/v) 아세톤을 사용하여 추출된 엽록소의 함량을 측정한다. 전해액 누출을 이미 보고된 방법으로 분석하였다. 이온 전도성을 측정하기 위

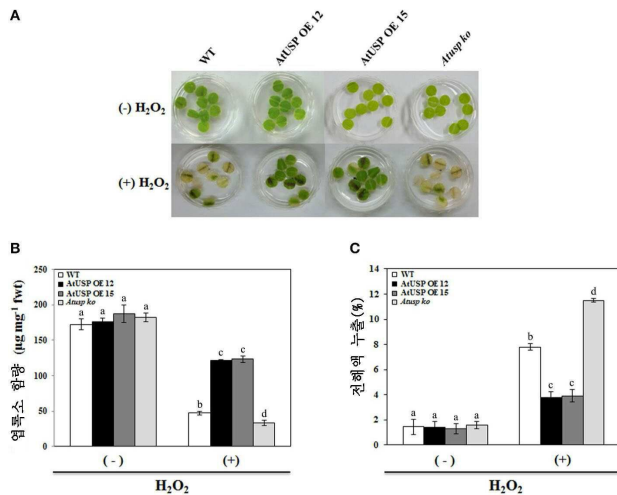
해 9개의 잎 디스크(직경 10mm)를 25ml의 탈이온수를 지닌 시험관 내에 배치시키고 하룻밤 흔들면서 열 충격 또는 산화적 스트레스를 가한다. 오토클레이빙 후에 잎을 포함하는 시험관을 실온으로 냉각하고 전도도를 다시 측정하였다. 전해액 누출을 오토클레이빙 전 후의 전도도의 퍼센트에 의해 계산하였다. 3개의 전사체 각각에 대한 전해액 누출 에세이를 적어도 세 번 시행하였다.

도면

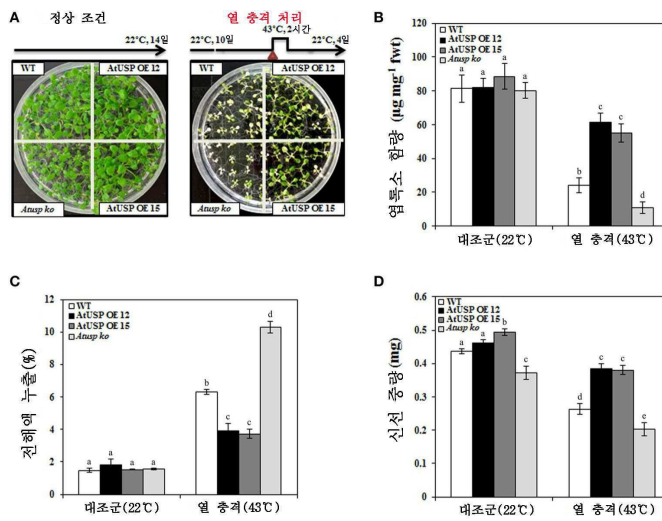
도면1



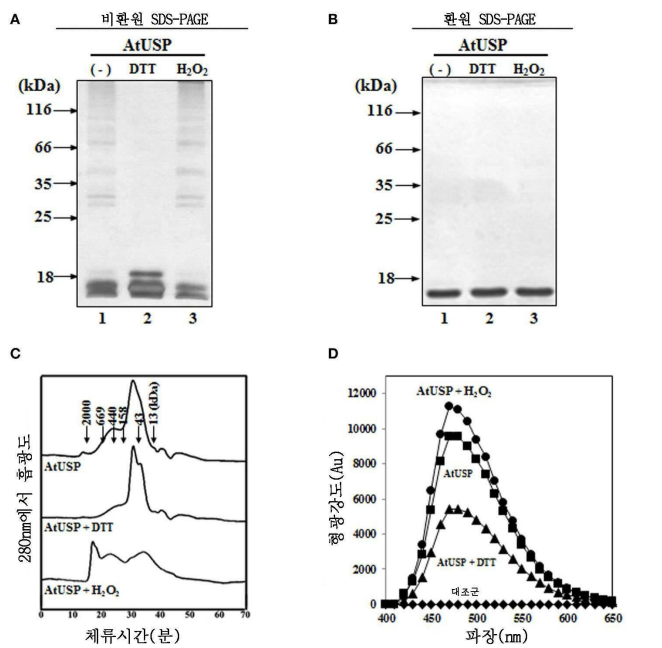
도면2



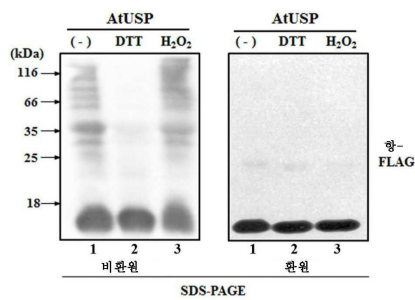
도면3



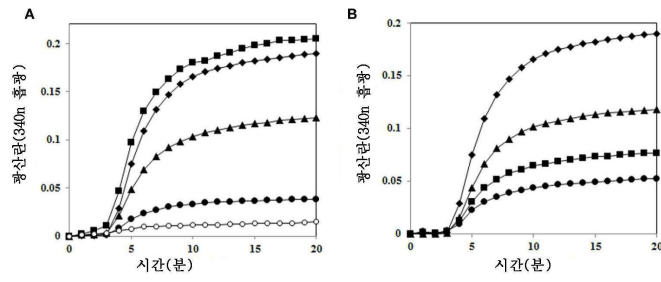
도면4



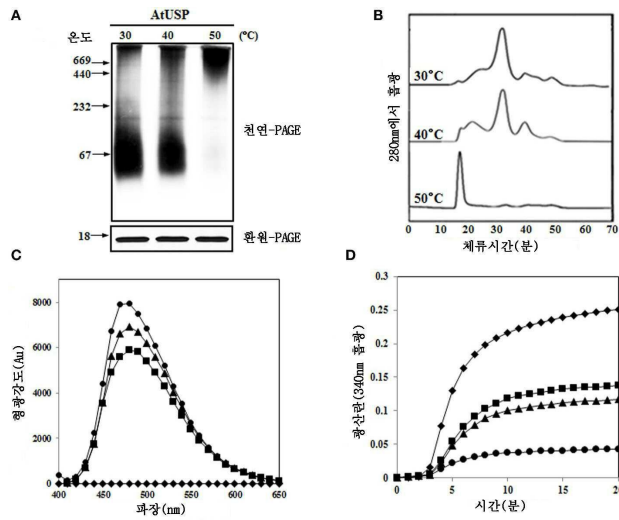
도면5



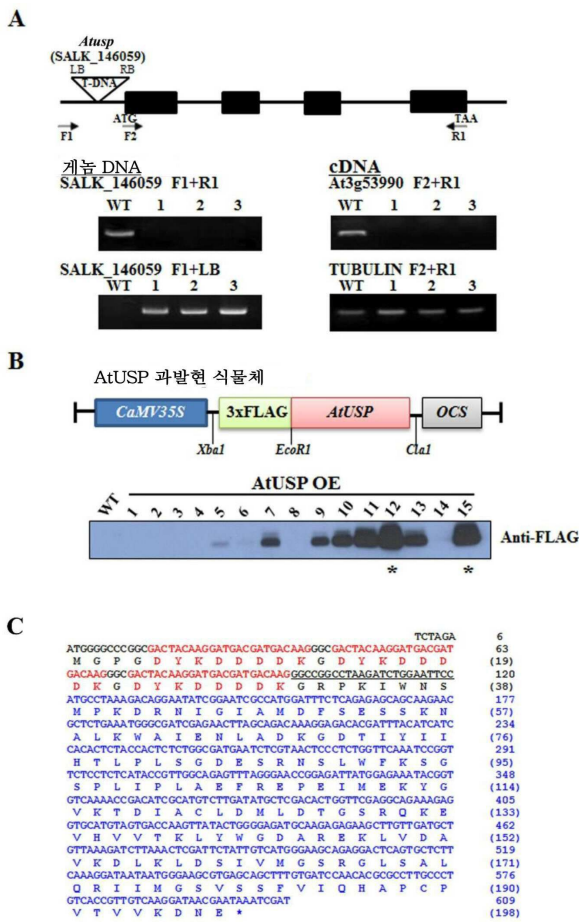
도면6



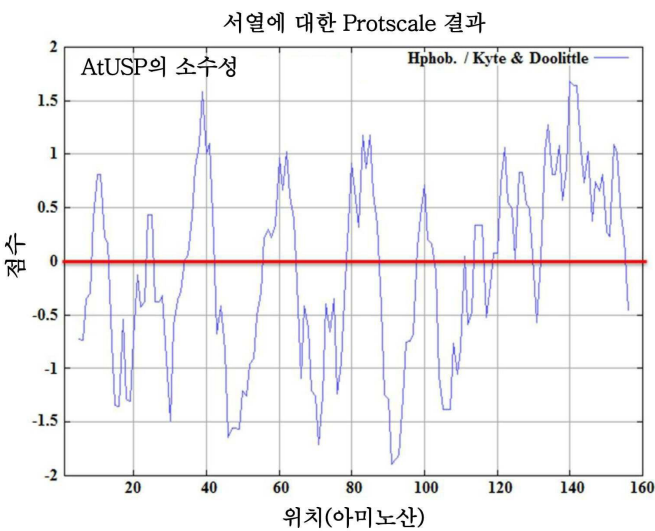
도면7



도면8



도면9



Glu Phe Arg Glu Pro Glu Ile Met Glu Lys Tyr Gly Val Lys Thr Asp
 65 70 75 80
 Ile Ala Cys Leu Asp Met Leu Asp Thr Gly Ser Arg Gln Lys Glu Val
 85 90 95

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

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 2

gaattccatg cctaaagaca ggaatatcgg 30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

atcgatttat tcgttatacct tgacaacggt 30

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

ccaacaacgt gaaatcgaca

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

tcttggtatt gctggtactc

20