



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0011474
(43) 공개일자 2017년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 9/0071 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0104155
(22) 출원일자 2015년07월23일
심사청구일자 2015년07월23일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자
이호정
서울특별시 서대문구 연희로 38-20, 102동 1203호 (연희동, 대우아파트)

(74) 대리인
김순웅

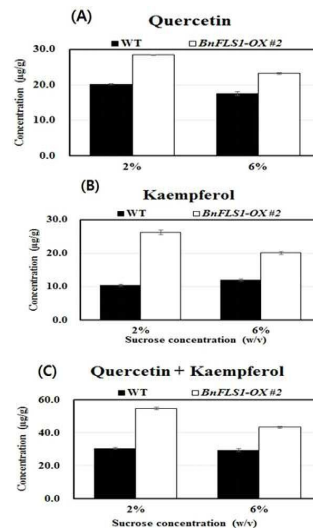
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 플라보놀 합성 유전자 및 이로 형질전환된 형질전환 식물

(57) 요약

본 발명은 플라보놀 합성 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 형질전환 식물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 유체에서 유래한 신규한 플라보놀 합성 유전자를 이용하여 제조한 형질전환 식물은 플라보놀이 과발현됨에 따라, 식물 내 항산화능이 증가하고 환경 스트레스에 저항성을 갖는 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 플라보놀 합성 유전자를 식품 또는 의약 산업 등 다양한 분야에서 활용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12N 15/8273 (2013.01)
C12N 15/8274 (2013.01)
C12N 15/8279 (2013.01)
C12Y 114/11023 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 112068033SB010

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 폴리페놀 대사조절 유채품종 개발을 통한 유채유 향산화능 향상에 관한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.08.08 ~ 2015.08.07

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 플라보놀 합성 유전자(Flavonol synthase gene).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 플라보놀 합성 유전자는 유채(*Brassica napus*)에서 유래된 것을 특징으로 하는 플라보놀 합성 유전자.

청구항 3

제1항의 플라보놀 합성 유전자에 의해 암호화되는 플라보놀 합성 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 플라보놀 합성 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 플라보놀 합성 단백질.

청구항 5

제1항의 플라보놀 합성 유전자를 포함하는 플라보놀 과발현용 재조합 벡터.

청구항 6

제5항의 재조합 벡터로 형질전환된 플라보놀을 과발현하는 형질전환 식물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 플라보놀은 퀘세틴(quercetin) 또는 캠페롤(kaempferol)인 것을 특징으로 하는 플라보놀을 과발현하는 형질전환 식물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 형질전환 식물은 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 플라보놀을 과발현하는 형질전환 식물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 형질전환 식물은 항산화능 및 환경 스트레스 저항성을 갖는 것을 특징으로 하는 플라보놀을 과발현하는 형질전환 식물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 환경 스트레스는 고온, 염해, 건조, 공해, 병원균, 상처, 저온, 과다한 광조건, 오존, 제초제, UV 과노출 및 삼투압 충격(osmotic shock)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 플라보놀을 과발현하는 형질전환 식물.

청구항 11

제1항의 플라보놀 합성 유전자를 포함하는 식물의 항산화능 및 환경 스트레스 저항성 증진용 조성물.

청구항 12

제1항의 플라보놀 합성 유전자를 식물체에 도입하여 식물체 내 플라보놀 수준을 증가시키는 단계;를 포함하는 식물 내 플라보놀 생산량 증진 방법.

청구항 13

제1항의 플라보놀 합성 유전자를 식물체에 도입하여 식물체 내 플라보놀 수준을 증가시키는 단계;를 포함하는 식물의 항산화능 및 환경 스트레스 저항성 증진 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 플라보놀 합성 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 형질전환 식물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유채(*Brassica napus*)는 겨자과(Cruciferae)에 속하는 1년 또는 2년생 초본이다. 식물성 유지생산량의 10%를 차지하여 대두유, 해바라기유 및 팜유 다음으로 많이 생산되고 있으며, 식용유로서 콩기름 다음으로 많이 소비되고 있다. 종자에서 분리한 지방유를 유채기름 또는 채종유라 하며, 엔진 윤활유, 바이오디젤, 연고기체 유성주사의 용제 및 식용으로 널리 쓰인다. 유채기름에는 글루코시노레이트 성분 때문에 불쾌한 쓴 맛과 독성이 있고 지방의 상당 부분이 인체에 유해할 수 있는 에루시산(erucic acid)으로 이루어져 있으므로 바로 식용으로 사용할 수가 없어 과거에는 주로 공업용으로 한정해서 사용해 왔다. 이런 유해 성분을 일정 수준으로 제거하거나 처음부터 유전자 조작을 통해서 유해 성분의 함량을 줄인 유채로부터 얻은 유채기름은 식용이 가능하고 이런 식용 유채기름은 카놀라 기름이라고도 한다.

[0003] 한편, 식물의 이차대사산물(secondary metabolites)은 식물세포에 존재하지 않고, 기본적으로 세포기능, 세포분열 및 생장유지 등과 같은 역할과는 관련이 없으나, 식물체가 주위 환경에서 생존하기 위해 외부로부터 병해충 침입 및 공격에 대항하기 위해 생성하는 방어물질이다. 이러한 이차대사산물 중 하나인 플라보놀(flavonol)은 플라보노이드(Flavonoid)의 일종으로, 안토시아닌과 공존하고, 식물에 널리 분포하고 있으며, 대표적으로 갈랑긴(galangin), 캄페롤(Kaempferol), 피세틴(fisetin), 퀘세틴(quercetin) 및 미리세틴(myricetin) 등이 있다. 그러나, 상기와 같이 유용한 플라보놀을 생명공학적인 방법으로 조절할 수 있는 유전자는 현재까지 많이 보고되어 있지 않은 실정이다.

[0004] 이에 본 발명자들은 플라보놀을 생산할 수 있는 방법을 연구하던 중, 유채에서 유래한 신규 플라보놀 합성 유전자를 분리하고, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환시킨 형질전환 식물이 플라보놀을 과발현하고 이에 따라 항산화능이 증진되어 환경 스트레스에 저항성이 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 신규한 플라보놀 합성 유전자 및 상기 플라보놀 합성 유전자에 의해 암호화되는 플라보놀 합성 단백질을 제공하는 것이다.

[0006] 또한 본 발명의 목적은 상기 플라보놀 합성 유전자를 포함하는 플라보놀 과발현용 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0007] 또한 본 발명의 목적은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 플라보놀을 과발현하는 형질전환 식물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한 본 발명의 목적은 상기 플라보놀 합성 유전자를 포함하는 식물의 항산화능 및 환경 스트레스 저항성 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 목적은 상기 플라보놀 합성 유전자를 식물체에 도입하여 식물체 내 플라보놀 수준을 증가시키는 단계;를 포함하는 식물 내 플라보놀 생산량 증진 방법 또는 식물의 항산화능 및 환경 스트레스 저항성 증진 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 플라보놀 합성 유전자 및 상기 유전자에 의해 암호화되는 플라보놀 합성 단백질을 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 상기 플라보놀 합성 유전자를 포함하는 플라보놀 과발현용 재조합 벡터를 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 플라보놀을 과발현하는 형질전환 식물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 상기 플라보놀 합성 유전자를 포함하는 식물의 항산화능 및 환경 스트레스 저항성 증진용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 플라보놀 합성 유전자를 식물체에 도입하여 식물체 내 플라보놀 수준을 증가시키는 단계;를 포함하는 식물 내 플라보놀 생산량 증진 방법 또는 식물의 항산화능 및 환경 스트레스 저항성 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 유채에서 유래한 신규한 플라보놀 합성 유전자를 이용하여 제조한 형질전환 식물은 플라보놀이 과발현됨에 따라, 식물 내 항산화능이 증가하고 환경 스트레스에 저항성을 갖는 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 플라보놀 합성 유전자를 식품 또는 의약 산업 등 다양한 분야에서 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 신규한 플라보놀 합성 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 개략도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 형질전환 유채 및 애기장대 유채 플라보놀 합성 유전자의 아미노산 서열을 비교한 도이다.

도 3은 본 발명의 형질전환 식물(BnFLS1-OX)에서의 BnFLS 과발현 여부를 RT-PCR 수행하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 형질전환 식물(BnFLS1-OX)에서의 BnFLS 과발현 여부를 바스타 제초제 저항성 여부로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 페닐알라닌에서 안토시아닌의 생합성 대사회로 중 플라보놀의 생합성 과정을 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 형질전환 식물(BnFLS1-OX) 및 야생형 식물(Wild-type)에서 1주 또는 3주 동안의 성장 정도를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 형질전환 식물(BnFLS1-OX #1 또는 #2) 및 야생형 식물(Wild-type)에서 안토시아닌 수준을 수크로즈 농도(2% 또는 6%)에 따라 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 형질전환 식물(BnFLS1-OX #2) 및 야생형 식물(Wild-type)에서 퀘세틴 증가(A), 캠페롤 증가(B), 퀘세틴 및 캠페롤 동시 증가(C) 수준을 수크로즈 농도(2% 또는 6%)에 따라 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 형질전환 식물(BnFLS1-OX #1) 및 야생형 식물(Wild-type)의 잎에 DAB 시약을 처리하여 항산화능 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

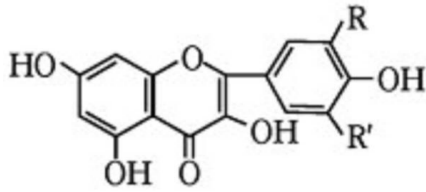
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 플라보놀 합성 유전자를 제공한다.

[0018] 본 발명에 있어서, "플라보놀"은 플라보노이드(Flavonoid)의 일종으로, 안토시아닌과 공존하고, 식물에 널리 분포하고 있으며, 대표적으로 갈랑긴(galangin), 캠페롤(Kaempferol), 피세틴(fisetin), 퀘세틴(quercetin) 및 미리세틴(myricetin) 등이 있으며, 안토시아닌과 공존하는 경우가 많아 조색소(copigment)로서 작용할 수 있고,

하기와 같은 화학식 1로 나타낸다(캬페롤: $R=R'=H$, 케세틴: $R=OH$, $R'=H$, 미리세틴: $R=R'=OH$).

[화학식 1]



상기 플라보놀 합성 유전자는 유채(*Brassica napus*)에서 유래된 것이나, 이에 제한되지 않는다.

본 발명에 있어서, 플라보놀 합성 유전자는 당해 유전자의 염기서열을 참조하여 핵산 합성기 등을 이용하여 인공적으로 합성하거나, 상기 유전자가 유래한 생물, 바람직하게는 유채의 mRNA를 추출하여 이를 주형으로 목적인 플라보놀 합성 유전자의 양 말단에 상보적인 서열을 가지는 올리고 뉴클레오타이드를 프라이머로 이용하여 RT-PCR을 실시함으로써 이의 cDNA를 합성 및 제조할 수 있다.

상기 염기서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 플라보놀 합성 유전자로서 사용될 수 있는 플라보놀 핵산분자는 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, 플라보놀 핵산 분자의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 플라보놀 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열 번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 겹)를 포함할 수 있다.

또한 본 발명은 상기 플라보놀 합성 유전자에 의해 암호화되는 플라보놀 합성 단백질을 제공한다.

상기 플라보놀 합성 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지나, 이에 제한되지 않는다.

본 발명에 따른 암호화되는 플라보놀 합성 단백질의 범위는 유채로부터 분리된 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

본 발명의 플라보놀 합성 단백질은 이의 천연형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체가 또한 본 발명의 범위에 포함된다.

플라보놀 합성 단백질의 변이체란 플라보놀 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979).

상기 플라보놀 합성 단백질 또는 이의 변이체는 천연에서 추출하거나 합성 (Merrifield, J. Amer. chem. Soc. 85:2149-2156, 1963) 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 유전자 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다 (Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2판, 1989).

또한 본 발명은 상기 플라보놀 합성 유전자를 포함하는 플라보놀 과발현용 재조합 벡터를 제공한다.

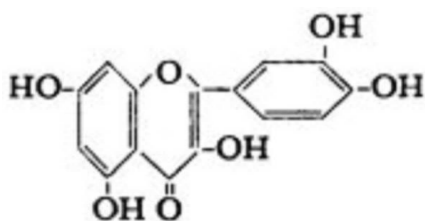
본 발명에 있어서, "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 함유하는 유전자 적체물을 의미하는 것으로, 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다.

- [0032] 본 발명에서 상기 "작동가능하게 연결된 (operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0033] 본 발명에서 상기 "목적 유전자의 발현"은 상기 목적 유전자를 발현시켜 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 생산하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서 목적 유전자를 발현하는 방법은 상기 목적 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체(숙주세포)를 배양하여 상기 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 발현시키는 방법일 수 있으며, 이를 통해 상기 단백질이 관여되는 생합성 경로의 최종산물을 제조할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 벡터는 또한 선택마커, 프로모터 및 터미네이터를 포함한다.
- [0035] 본 발명에서 사용 가능한 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), 포스포노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 Basta 저항성 (BAR) 유전자가 사용된다.
- [0036] 본 발명에서 사용가능한 프로모터는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터로서, CaMV35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, 히스톤 프로모터 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 CaMV35S 프로모터가 사용된다.
- [0037] 본 발명에서 사용가능한 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(agrobacterium tumefaciens)의 옥토판인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 옥토판인 신타아제(OCS) 터미네이터가 사용된다.
- [0038] 본 발명의 벡터는 세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않고 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명에 사용될 수 있는 벡터로 다양한 클로닝 부위를 가지고 있는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5 등), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50 등) 및 Ti 플라스미드 등의 플라스미드가 있고, 식물 바이러스 벡터가 있으며, pCHF3, pPZP, pGA 및 pCambia 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 그러나 당업자라면 본 발명의 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 pEarleyGate202 벡터(Earley et al., 2006)를 이용하여 35S CaMV promoter::BnFLS 발현벡터를 제조하였으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 또한 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 플라보놀을 과발현하는 형질전환 식물을 제공한다.

[0040] 상기 플라보놀은 퀘세틴(quercetin) 또는 캠페롤(kaempferol)일 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 "퀘세틴(quercetin)"은 플라보놀 일종으로, 자연계에 매우 많이 존재하며, 대부분이 배당체로서 존재한다. 당의 종류에 의해 퀘르시트린, 이소퀘르시트린, 퀘르시메리트린, 아비쿨라린, 히페린, 레이노우트린, 퀘르시투론 및 루틴 등의 배당체가 있다. 분석용 시약 등에 사용되며, 하기와 같은 화학식 2로 나타낸다.

[0042] [화학식 2]

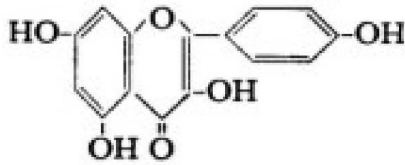


[0043]

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 "캠페롤(kaempferol)"은 플라보놀의 일종으로, 지방과 DNA의 산화위험을 막고 강한 항

산화 작용을 한다. 또한, 혈액 안에서 혈소판을 만들고 LDL(low density lipoprotein)의 산화를 막아 동맥경화증을 예방하며, 암세포 형성을 방해하는 화학적 예방 작용제로 사용 가능 하고, 하기와 같은 화학식 3으로 나타낸다.

[화학식 3]



상기 형질전환 식물은 쌍자엽 식물일 수 있으며, 그 예로는 유채, 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근 및 샐러리일 수 있으나, 바람직하게는 유채 및 애기장대이나, 이에 제한되지 않는다.

상기 형질전환 식물은 항산화능 및 환경 스트레스 저항성을 갖을 수 있고, 상기 환경 스트레스는 상기 환경 스트레스는 고온, 염해, 건조, 공해, 병원균, 상처, 저온, 과도한 광조건, 오존, 제초제, UV 과노출 및 삼투압 충격(osmotic shock)일 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 "형질전환"은 DNA의 세포내로의 도입을 말한다. 세포는 "숙주 세포"로 명명되며, 이는 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 대표적인 원핵 숙주 세포는 E. coli의 각종 균주를 포함한다. 대표적인 진핵 숙주 세포는 식물 세포(예: 캐놀라, 면화, 카멜리나, 알팔파, 대두, 벼, 귀리, 밀, 보리 또는 옥수수 세포 등), 효모 세포, 곤충 세포 또는 동물 세포이다. 도입된 DNA는 일반적으로 DNA가 삽입된 조각을 함유하는 벡터의 형태이다. 도입된 DNA 서열은 숙주 세포와 동일한 종, 또는 숙주 세포와는 상이한 종으로부터 기원할 수 있거나, 또는 이는 숙주 종으로부터 기원한 일부 DNA 및 일부 외부 DNA를 함유하는 하이브리드 DNA 서열일 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 "식물"은 전체 식물, 식물 기관(예: 잎, 줄기, 꽃, 뿌리 등), 종자 및 식물 세포(조직 배양 세포 포함) 및 이의 자손을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 식물의 부류는 일반적으로 형질전환 기술에 적용 가능한 고등 식물의 부류, 및 조류와 같은 특정의 하등 식물과 같이 광범위하다. 이는 배수체, 이배체 및 반수체를 포함하는 각종의 배수성 수준의 식물을 포함한다.

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-코딩된) 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) 등 으로부터 적당하게 선택될 수 있다.

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. 본 발명에서 사용 가능한 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 이용되는 어떠한 균주라도 사용이 가능하다.

또한 본 발명은 (a) 식물 또는 식물 세포 내로 상기 재조합 벡터를 도입시키는 단계; 및 (b) 상기 재조합 벡터를 포함하는 식물 또는 식물 세포를 배양하는 단계;를 포함하는 플라보놀을 과발현하는 형질전환 식물 제조 방법을 제공한다.

본 발명에 있어서, "배양"은 식물 또는 식물 세포를 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다.

상기 식물 세포는 통상의 배지에서 생육 가능하다. 배지는 특정 식물 세포를 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양

체가 되는 식물 세포가 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.

[0056] 또한 본 발명은 상기 플라보놀 합성 유전자를 포함하는 식물의 항산화능 및 환경 스트레스 저항성 증진용 조성물을 제공한다.

[0057] 또한 본 발명은 상기 플라보놀 합성 유전자를 식물체에 도입하여 식물체 내 플라보놀 수준을 증가시키는 단계; 를 포함하는 식물 내 플라보놀 생산량 증진 방법 또는 식물의 항산화능 및 환경 스트레스 저항성 증진 방법을 제공한다.

[0058] 본 발명에 따른 유체에서 유래한 신규한 플라보놀 합성 유전자를 이용하여 제조한 형질전환 식물은 플라보놀이 과발현됨에 따라, 식물 내 항산화능이 증가하고 환경 스트레스에 저항성을 갖는 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 플라보놀 합성 유전자를 식품 또는 의약 산업 등 다양한 분야에서 활용될 수 있다.

[0059] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 자세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0060] 실시예 1. BnFLS(*Brassica napus* Flavonol synthase gene)의 cDNA의 클로닝

[0061] 유체 플라보놀 합성 유전자(BnFLS)의 cDNA를 분리한 후, 이를 이용하여 cDNA의 클로닝을 수행하였다.

[0062] 보다 구체적으로, 발아 후 2주일된 유체의 mRNA를 추출한 다음 역전사효소(Reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 그 후, BnFLS의 유전자 염기서열을 이용하여 프라이머를 제작하고(BnFLS-F: 5'-ATGGAGATCGAGAGAGTCC-3'(서열번호 3), BnFLS-R: 5'-GTCCAGAGGAAGCTTATTG-3'(서열번호 4)), 이를 이용하여 종래 공지된 방법에 따라 PCR을 수행하였다(어닐링 온도 57도, 총량 40 μ L). 그 후 증폭된 BnFLS의 cDNA를 전기영동하여 확인한 뒤, 겔에서 용출하였다. 상기 용출된 cDNA 조각(786 bp)을 topo vector(pCR®/GW/TOPO, invitrogen)에 삽입하고 이를 식물체 과발현용 벡터인 pEarleyGate202 벡터에 LR reaction(LR Clonase® invitrogen)으로 삽입하였다. 그 후, 상기 벡터를 이용하여 *E.coli* 세포(TOP10 cell, invitrogen)에 열-충격 형질전환(heat-shock transformation) 방법으로 형질전환시킨 후, 콜로니가 생성될 때까지 배양하였다(37도, 12시간). 생성된 콜로니를 다시 LB 배지에 배양한 후 플라스미드 벡터를 추출하였다.

[0063] 실시예 2. BnFLS 과발현 형질전환 식물체 제작 및 이의 BnFLS 과발현 확인

[0064] BnFLS을 과발현하는 형질전환 식물체를 제작하고 상기 형질전환 식물체의 BnFLS 과발현 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0065] 상기 실시예 1에 준비된 pEarleyGate202 벡터를 기본으로, 선택마커로서 바스타(Basta) 저항성 (BAR) 유전자, 프로모터로서 35S CaMV, 터미네이터로서 옥토파인 신타제(OCS)을 이용하고, attR1 및 attR2 사이에 BnFLS를 삽입한 35S CaMV promoter::BnFLS 발현벡터를 제조하였다(도 1). 이를 아그로박테리아(*Agrobacterium*)에 전기 충격 형질전환(electric shock transformation) 방법으로 형질전환한 후 배양하였다. 상기 형질전환된 아그로박테리아를 플로럴 디핑 형질전환(floral dipping transformation) 방법을 통해 준비된 유체에 형질전환시켰다. 상기 형질전환된 식물체로부터 씨를 수확하고 3세대까지 자가 교배시켜 상동주(homologous line)를 확보하였다. 상기 형질전환된 유체의 cDNA의 서열을 분석하고, 이에 대한 아미노산 서열을 도 2에 나타내었다. 발아 후 3주된 형질전환 유체에서 같은 방식으로 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하여(BnFLS-F(서열번호 3), BnFLS-R(서열번호 4), BnACTIN-F: 5'-GGAAGTGAATGGTGAAGGCTG-3'(서열번호 5), BnACTIN-R: 5'-GTCTTTTGTACCCATCCCAAC-3'(서열번호 6), 어닐링 온도 57도, 총량 10 μ L) 형질전환된 식물체에서

BnFLS 과발현을 확인하였다(도 3).

[0066] 또한, 형질전환된 유체가 바스타 제초제에 대한 저항성 여부를 확인하였다. 보다 구체적으로, 발아 후 3주 된 형질전환 유체의 잎을 으갠 후 바스타 확인 스틱(SeedChek, Romer Labs)을 묻혔을 때 보라색 밴드가 두 개 뜨면 바스타 저항성을 가지고 있다는 뜻이므로, 이를 이용하여 바스타 제초제에 대한 저항성 여부를 확인하였다(도 4). 그 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0067] 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 형질전환된 식물 내에서 BnFLS의 RNA가 발현되었음을 확인하였다.

[0068] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 형질전환된 식물에서 바스타 산물을 확인함으로써 바스타 제초제에 대한 저항성이 있음을 확인하였다.

[0069] 이상의 실험 결과를 통하여, 본 발명의 형질전환된 식물에 pEarleyGate202 벡터가 삽입되어 목적 유전자가 올바르게 작용함을 확인하였다.

[0070] 실시예 3. BnFLS 과발현 형질전환 식물체의 형질 분석

[0071] 상기 실시예 2에서 제작된 BnFLS 과발현 형질전환 식물체의 변환된 형질인 안토시아닌, 플라보놀 함량 및 향산 화능 증진 효과를 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0072] 3-1. 안토시아닌 함량 확인

[0073] 도 5에 나타난 바와 같이, 과발현된 FLS에 의해 플라보놀이 다량 생산되면, 안토시아닌의 함량이 감소하기 때문에, 본 발명의 형질전환 식물체에서 BnFLS의 과발현에 의해 안토시아닌 함량이 감소하는지 확인하였다. 구체적으로, 발아 후 5일 된 식물을 수크로즈 2% 및 수크로즈 6% 농도의 MS 고체 배지에 키우고, 각 50 mg씩 시료를 채취하여 동결시켰다. 이를 곱게 분쇄한 후, 1% HCl를 포함한 메탄올 250 μ l에 분쇄된 샘플을 각각 처리하고, 4도의 암조건 상에 12시간 이상 반응시켰다. 그 후, 250 μ l의 D.W와 250 μ l의 클로로포름을 반응시킨 시료에 첨가한 후 10,000 rpm 으로 5분간 원심분리를 수행하였다. 원심분리된 시료의 상등액을 96 웰 플레이트에 옮긴 후, 535-650 nm의 빛 파장에 대한 흡광도를 측정하였다(Multi-Detection Microplate Reader, HIDEEX). 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.

[0074] 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 BnFLS의 과발현 형질전환 식물은 1주차 및 3주차에 야생 식물과 유사한 성장을 나타냄을 확인하였다.

[0075] 또한, 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 BnFLS의 과발현 형질전환 식물은 야생형에 비하여 안토시아닌 수준이 유의적으로 낮음을 확인하여, 플라보놀을 생합성하는 경로가 야생형에 비해 경쟁적으로 강하게 작용하고 있음을 확인하였다.

[0076] 3-2. 플라보놀 함량 증가 확인

[0077] 본 발명의 BnFLS 과발현 형질전환 식물에서 플라보놀 함량의 증가 여부를 HPLC로 수행하여 확인하였다.

[0078] 각 시료의 플라보놀 함량 측정을 위해 high-performance liquid chromatography(HPLC)를 진행하였고 Ultimate 3000 HPLC system(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하였다. 더 구체적으로, 각 시료를 YMC-Triart C18+ column(4.6 mm x 250 mm, 5 μ m)를 이용하여 측정하였고, 유속은 분당 0.6 ml로 하였다. UV detector는 퀘세틴 및 캠페롤의 측정을 위하여 360 nm로 세팅하여 측정하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0079] 도 8에 나타난 바와 같이, 플라보놀의 일종인 퀘세틴(quercetin)은 야생형에 비해 BnFLS 과발현 형질전환 식물체에서 더 증가됨을 확인하였다(A). 또한, 플라보놀의 일종인 캠페롤(kaempferol)은 야생형에 비해 BnFLS 과발현 형질전환 식물체에서 약 3배 이상 증가됨을 확인하였다(B). 또한, 퀘세틴 및 캠페롤의 증가를 동시에 조사한 결과, BnFLS 과발현 형질전환 식물체는 야생형에 비해 현저하게 퀘세틴 및 캠페롤을 생성함을 확인하였다.

[0080] 3-3. 향산화능 증진 효과 확인

[0081] 본 발명의 BnFLS 과발현 형질전환 식물체에서, 플라보놀의 생산 증가에 따라 식물의 항산화능에 효과가 있는지 확인하였다.

[0082] 식물체의 산화 여부를 테스트할 수 있는 DAB(dimethylaminoazobenzene, Sigma-Aldrich)시약으로 야생형 및 BnFLS 과발현 형질전환 식물체의 잎에 염색하여, 상기 시약에 의한 각 잎의 갈색 변성 여부를 확인하였다. 구체적으로, 각 잎을 Tween-20(0.05% v/v) 및 10 mM의 sodium phosphate buffer(pH7)가 함유된 DAB 용액에 담그고 4-6시간 동안 흔들었다. 그 후 에탄올, 글리세롤 및 아세트산의 비율을 3:1:1로 혼합한 용액을 사용하여 탈색시키고 야생형 또는 본 발명의 형질전환 식물체 잎의 산화 여부를 관찰하였다.

[0083] 도 9에 나타낸 바와 같이, 야생형에 비해 BnFLS 과발현 형질전환 식물체 잎이 갈색으로의 변성이 적음을 확인하였다.

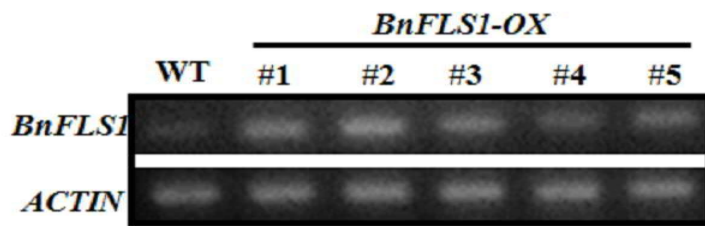
[0084] 따라서, 본 발명의 BnFLS 과발현 형질전환 식물체는 플라보놀의 합성이 촉진되어 안토시아닌의 합성이 줄고, 플라보놀의 종류인 케세틴 및 캠페롤이 증가되어 이에 따라 식물의 항산화능에 효과가 있음을 확인하였다.

도면

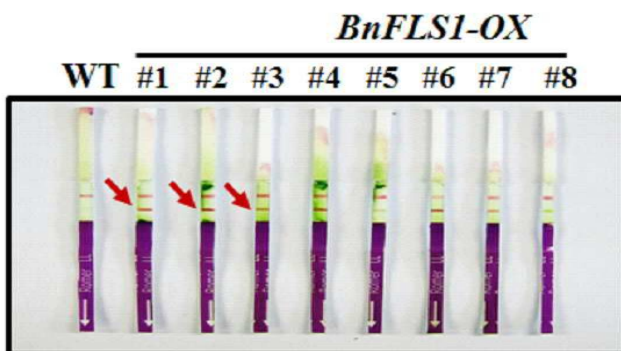
도면1

[illegible]

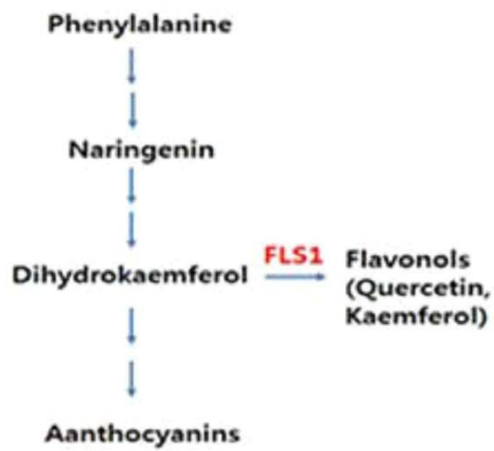
도면3



도면4



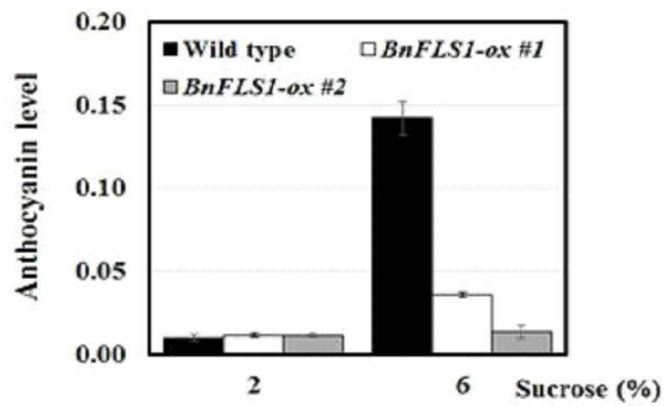
도면5



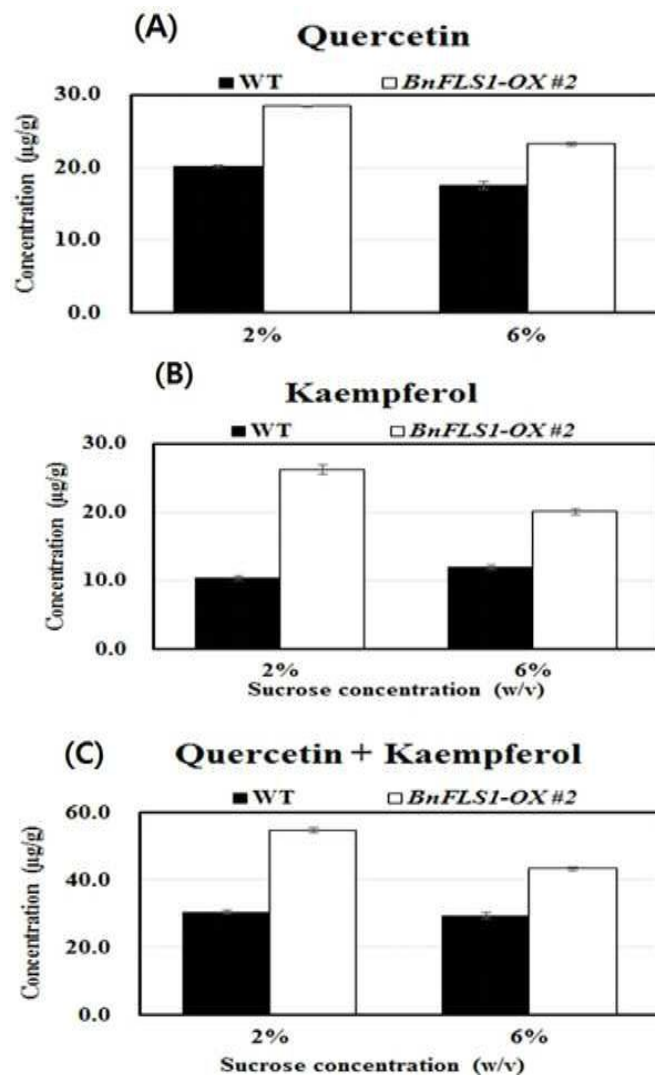
도면6



도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> A flavonol synthase gene and a transgenic plant with the same

<130> 1-52

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1011

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> BnFLS(Brassica napus Flavonol synthase gene) cDNA sequence

<400> 1

```

atggagatcg agagagtcca agacatttca tcatcttccc tccacaccga ggttatccct      60
ctggagttca tcagatcgga gaaagaacag ccggcgatca ccactttccg aggtccggtg      120
ccggcgatcc ccgtcgtcga tctgagcgac cccgacgaag agagcgtggc gcgtgcggtg      180

gtgaaggcga gtgaagaatg ggggattttc caggttggtta accacgggat cccacggag      240
ctgataaaac ggttgcagga agtggggaga acgttcttcg agcttccttc gtcggagaaa      300
gagtcgctcg cgaagcccg cgaagcccg tcatgctaaa gacatcgaag ggtacggaac gaagctacag      360
aaagaagtag aaggtaaaga agcatgggtt gatcatctct tccacaggat ctggccaccg      420
tcgtgctgta actacagttt ctggccaaag aatccacctg agtacaggga ggtgaacgaa      480
gagtacgctg tgcatgtgaa gaagctgtcg gagacattat taggcatact ctccgaaggg      540
ttaggccttac gtcgtgagcg gttgagagaa ggactcggcg gagatctggt tgagtatatg      600

atgaagatta actattatcc gccgtgtcct cggccggact tagccttggg agtaccggca      660
catactgata taagtggaa cactctgctt gtacctaatg aagttcctgg acttcaagtc      720
ttcaaagacg atcactgggt cgacgccgag tatattcctt ctgccgtcat tgttcacatc      780

```

ggcgatcaga ttctgaggct aagtaatggg aggtataaga atgtgttgca taggacgacg 840
 gttgataagg acaggacgag gatgtcgtgg ccagtgttct tggagccaca ccgtgaaatg 900
 atagtcgggc cattaccgga gcttataagc gatggtaatc ccccaaaata caagcctttt 960
 gctttcaagg actacagtta ccgtaagctc aataagcttc ctcgggacta a 1011

<210> 2

<211> 336

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> BnFLS(Brassica napus Flavonol synthase gene) amino acid

<400> 2

Met Glu Ile Glu Arg Val Gln Asp Ile Ser Ser Ser Ser Leu His Thr

1 5 10 15

Glu Val Ile Pro Leu Glu Phe Ile Arg Ser Glu Lys Glu Gln Pro Ala

20 25 30

Ile Thr Thr Phe Arg Gly Pro Val Pro Ala Ile Pro Val Val Asp Leu

35 40 45

Ser Asp Pro Asp Glu Glu Ser Val Ala Arg Ala Val Val Lys Ala Ser

50 55 60

Glu Glu Trp Gly Ile Phe Gln Val Val Asn His Gly Ile Pro Thr Glu

65 70 75 80

Leu Ile Lys Arg Leu Gln Glu Val Gly Arg Thr Phe Phe Glu Leu Pro

85 90 95

Ser Ser Glu Lys Glu Ser Val Ala Lys Pro Ala Asp Ala Lys Asp Ile

100 105 110

Glu Gly Tyr Gly Thr Lys Leu Gln Lys Glu Val Glu Gly Lys Lys Ala

115 120 125

Trp Val Asp His Leu Phe His Arg Ile Trp Pro Pro Ser Cys Val Asn

130 135 140

Tyr Ser Phe Trp Pro Lys Asn Pro Pro Glu Tyr Arg Glu Val Asn Glu

145 150 155 160

Glu Tyr Ala Leu His Val Lys Lys Leu Ser Glu Thr Leu Leu Gly Ile

165 170 175

Leu Ser Glu Gly Leu Gly Leu Arg Arg Glu Ala Leu Arg Glu Gly Leu
180 185 190

Gly Gly Asp Leu Val Glu Tyr Met Met Lys Ile Asn Tyr Tyr Pro Pro
195 200 205

Cys Pro Arg Pro Asp Leu Ala Leu Gly Val Pro Ala His Thr Asp Leu
210 215 220

Ser Gly Ile Thr Leu Leu Val Pro Asn Glu Val Pro Gly Leu Gln Val
225 230 235 240

Phe Lys Asp Asp His Trp Phe Asp Ala Glu Tyr Ile Pro Ser Ala Val
245 250 255

Ile Val His Ile Gly Asp Gln Ile Leu Arg Leu Ser Asn Gly Arg Tyr

260 265 270

Lys Asn Val Leu His Arg Thr Thr Val Asp Lys Asp Arg Thr Arg Met
275 280 285

Ser Trp Pro Val Phe Leu Glu Pro His Arg Glu Met Ile Val Gly Pro
290 295 300

Leu Pro Glu Leu Ile Ser Asp Gly Asn Pro Pro Lys Tyr Lys Pro Phe
305 310 315 320

Ala Phe Lys Asp Tyr Ser Tyr Arg Lys Leu Asn Lys Leu Pro Leu Asp
325 330 335

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BnFLS-F primer

<400> 3

atggagatcg agagagtcc

19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BnFLS-R primer

<400>	4	
gtccagagga agcttattg		19
<210>	5	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	BnACTIN-F primer	
<400>	5	
ggaactggaa tgggaagc tg		22
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	BnACTIN-R primer	
<400>	6	
gtctttttga cccatccaa c		21