



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월11일
 (11) 등록번호 10-1847974
 (24) 등록일자 2018년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2018.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 15/8222 (2013.01)
A01H 5/00 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2017-0006302
 (22) 출원일자 2017년01월13일
 심사청구일자 2017년01월13일
 (65) 공개번호 10-2017-0101773
 (43) 공개일자 2017년09월06일
 (30) 우선권주장
 1020160023883 2016년02월29일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020100067852 A
 GenBank Accession Number AP014965
 (2015.10.10.)

(73) 특허권자
명지대학교산학협력단
 경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)
 (72) 발명자
김연기
 경기도 화성시 동탄반석로 277, 111동 1801호 (석우동, 예당마을우미린제일풍경채아파트)
채송화
 경기도 용인시 처인구 경안천로 378, 2001동 202호 (유방동, 인정프린스아파트)
남백희
 경기도 성남시 분당구 금곡로 39, 108동 205호(구미동, 화이트빌)
 (74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 9 항

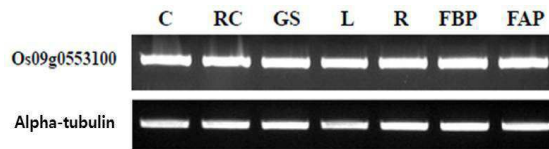
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **단자엽 식물 형질전환을 위한 벼 Os09g0553100 유전자 유래의 항시 발현용 프로모터 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명의 벼(*Oryza sativa*) Os09g0553100 유전자 유래의 단자엽 식물 형질전환을 위한 항시 발현용 프로모터는 식물체 전 기관 또는 조직에서 항시적으로 발현을 유도하기 때문에, 식물의 생장 발달 시기와 조직에 관계없이 상기 프로모터를 이용하여 유용 유전자를 항시적으로 발현시킴으로써 작물의 형질을 효과적으로 개량시킬 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12N 15/8241 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011074012015

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 시스템합성농생명공학사업

연구사업명 차세대바이오그린21 사업단

연구과제명 벼의 어린 꽃 발달 특이적 전사인자 탐색과 기관 특이적 발현 증가를 이용한 발현네트워크 연구

기여율 7/10

주관기관 명지대학교

연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ0110572015

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농생물게놈활용사업단

연구사업명 차세대바이오그린21 사업

연구과제명 벼의 단일유전자변이체 대량 개발 및 종자 발달 관련 전사인자 기능 연구

기여율 3/10

주관기관 명지대학교

연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 벼(*Oryza sativa*) Os09g0553100 유전자 유래의 단자엽 식물 형질전환을 위한 항시 발현용 프로모터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 식물체 전 기관 또는 조직에서 균등하게 유전자를 발현시키는 것을 특징으로 하는 프로모터.

청구항 3

제1항의 항시 발현용 프로모터를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 암호화하는 외래 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 재조합 식물 발현 벡터.

청구항 5

제4항의 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체.

청구항 6

제3항의 식물 발현 벡터에 외래 유전자를 재조합하는 단계; 및 상기 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 외래 유전자가 항시적으로 발현되는 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식물체는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 8

제6항의 방법에 의해 제조된 외래 유전자가 식물체에서 항시적으로 발현되는 형질전환 식물체.

청구항 9

제8항의 식물체의 형질전환된 종자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단자엽 식물 형질전환을 위한 벼 Os09g0553100 유전자 유래의 항시 발현용 프로모터 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 분자 생물학이 발전하면서 유전자의 발현을 조절하는 여러 가지 기작이 밝혀져 왔다. 유전자의 발현이라 함은 세포 내에서 일어나는 전사(transcription) 및 번역(translation)을 통해 유전자에 입력되어 있는 코드에 따라 단백질을 합성하는 일련의 과정을 일컫는다. 특히, 전사 과정은 유전자 발현의 초기 단계로서, RNA 중합 효소가 여러 보조 인자들의 도움을 받아서 유전자의 상위에 존재하는 프로모터(promoter) 서열에 결합함으로써 개시가 되고, 전사인자(TF, transcription factor)는 그러한 보조 인자들 가운데 하나로서, 프로모터 서열에 직접 결합을 하는 것으로 알려져 있다. 진핵생물에서는 대표적으로 TFIIA, TFIIIB 및 TFIID와 같은 전사인자가

밝혀졌으며, TATA box 및 E-box와 같은 여러 종류의 프로모터 서열이 알려져 있고, 연구자들에 의해 계속 새로운 전사인자 및 프로모터 서열이 밝혀지고 있다. 외래 유전자의 발현을 식물체의 특별한 조직에만 국한시켜 형질전환 목적을 달성하는데 이용되는 공지된 프로모터들은 그 기능에 따라서 다음과 같이 분류할 수 있다.

[0003] 첫째로, 뿌리 조직 특이 발현 프로모터이다. 아직 상용화된 사례는 없으나 애기장대 퍼옥시다제(peroxidase, prxEa)가 분리되어 뿌리 조직 특이적 발현을 확인하였고, 최근 고구마 유래의 맵스 유전자(ibMADS)와 당 유도성 ADP-글루코오스 파이로포스파타제(ADP-glucose pyrophosphatase, AGPase) 유전자가 분리되어 해당 프로모터가 뿌리에서 특이 발현을 유도하며 당근 및 무에서 뿌리 특이적 일시적 발현을 유도함을 확인한 바가 있다(한국특허등록 제0018771호 및 제0604191호). 이들 프로모터는 식량이나 식품, 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 뿌리 작물에서 농업적 형질 개량이나 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 주로 사용이 기대될 수 있다.

[0004] 둘째로, 종자 특이적 프로모터를 들 수 있다. 대표적인 예로서 벼 주요 저장 단백질 유전자의 프로모터들로서 황금쌀(golden rice) 개발에 사용된 벼 글루텔린(glutelins) 프로모터가 현재까지 외떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는 경우에 많이 사용되고 있고, 쌍떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는데 주로 사용되는 프로모터로는 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 및 애기장대의 종자에서 감마 토코페롤 메틸기 전이효소(γ -tocopherol methyl transferase: γ -TMT) 유전자 발현을 유도함으로써 비타민 E 생성을 증진시킨 연구에 사용된 당근 유래 DC-3 프로모터 등을 들 수 있으며, 들깨 유래 올레오신(oleosin) 프로모터의 종자 특이발현 유도를 확인한 사례가 있다. 상기 종자 특이적 프로모터들은 주로 종자 자체가 식량이나 식품 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 작물에서 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 주로 사용되고 있다.

[0005] 셋째로, 전신발현 유도 프로모터를 들 수 있다. 식물 전신발현 유도 프로모터로는 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 쌍떡잎식물용 프로모터로 사용되고 있으며, 벼 등의 외떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자 프로모터들이 주로 이용되어 왔으며, 최근 벼 시토크롬 C 유전자(OsOcl)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다(한국등록특허 제0429335호). 이들은 식물 형질전환 기본 운반체 내에 선발마커로 이용되는 항생제나 제초제 저항성 유전자 및 리포터 유전자의 발현을 유도하기 위해 이미 내재되어 있으며, 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체 내 기능을 밝히고자 시도할 때 우선적으로 고려되는 프로모터들이다.

[0006] 넷째로, 잎 등의 기타 조직 특이 프로모터를 들 수 있다. 잎 등의 광합성 조직에서만 강력한 유전자의 발현을 유도하는 벼와 옥수수 유래의 rbcS(ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 프로모터, 아그로박테리움 유래의 식물 뿌리 발현을 유도하는 RoID 프로모터, 감자 유래 괴경 특이 발현 유도 파타틴(patatin) 프로모터, 토마토 유래의 과일 성숙 특이 발현 유도 PDS(phytoene synthase) 프로모터 및 그 기능이 배추꽃의 화분 특이적임이 확인된 배추 유래 올레오신(oleosin) 프로모터 등이 포함된다. 그 외에도 다양한 목적에 따른 다양한 식물 유래의 식물체 각 조직에 대하여 많은 수의 프로모터들이 보고되었고 현재에도 계속 개발이 진행 중이지만, 상용화되었거나 식물 연구자들 사이에 범용되는 프로모터의 종류는 이상에서 언급된 경우에 대부분이 속하며, 개발자의 의도에 따라서 보다 정밀하게 유전자 발현의 부위를 조절할 수 있는 새로운 프로모터들이 앞으로도 계속 개발될 필요성이 있다.

[0007] 또한, DNA 마이크로어레이는 유전자의 발현 정도를 비교 및 분석할 수 있는 도구로서, 유리 슬라이드 위에 각 유전자를 대표하는 특정 DNA 단편이 부착되어 있으며, 생물체에서 발현되는 유전자가 여기에 상보적인 결합을 하여 그 발현 정도를 측정할 수 있다.

[0008] 한편, 한국등록특허 제0996667호에는 벼의 캘러스 또는 분화중인 캘러스에서 특이적으로 발현하는 유전자의 프로모터 및 전사인자에 대해 개시하고 있으며, 한국등록특허 제1441916호에는 벼 Os08g0560700 유전자 유래 소포자 또는 화분 특이적 발현 프로모터 및 이의 용도에 대해 개시하고 있다. 하지만 본 발명의 단자엽 식물 형질전환을 위한 벼 Os09g0553100 유전자 유래의 항시 발현용 프로모터 및 이의 용도에 대해 아직 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 마이크로어레이(microarray) 측정값에 대

한 변동계수(coefficient of variation) 분석을 통해 벼(*Oryza sativa*)의 전 기관 또는 조직에서 항시적으로 발현되는 Os09g0553100 유전자를 선발하였으며, 상기 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 반-정량적(semi-quantitative) RT-PCR을 수행한 결과, Os09g0553100 유전자가 벼의 전 기관 또는 조직에서 균등하게 발현되는 것을 확인하였다. 또한, 상기 프로모터에 GUS 유전자를 융합시킨 재조합 벡터로 벼를 형질전환시킨 결과, 형질전환 식물체에서 GUS 유전자가 벼의 전 기관 또는 조직에서 항시적으로 발현되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 벼(*Oryza sativa*) Os09g0553100 유전자 유래의 단자엽 식물 형질전환을 위한 항시 발현용 프로모터를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 항시 발현용 프로모터를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 식물 발현 벡터에 외래 유전자를 재조합하는 단계; 및 상기 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 외래 유전자가 항시적으로 발현되는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 외래 유전자가 항시적으로 발현되는 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 벼(*Oryza sativa*) Os09g0553100 유전자 유래의 단자엽 식물 형질전환을 위한 항시 발현용 프로모터는 식물체 전 기관 또는 조직에서 항시적으로 발현을 유도하기 때문에, 식물의 성장 발달 시기와 조직에 관계없이 상기 프로모터를 이용하여 유용 유전자를 항시적으로 발현시킴으로써 작물의 형질을 효과적으로 개량시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 벼의 7개 기관 또는 조직에서 발현되는 유전자들에 대한 마이크로어레이(microarray) 측정값에 대한 변동계수(coefficient of variation) 분석 결과이다.
- 도 2는 본 발명의 벼 전 기관 또는 조직 항시적 유전자인 Os09g0553100의 발현양상을 분석한 반-정량적(semi-quantitative) RT-PCR 결과이다. C는 캘러스, RC는 재분화 캘러스, GS는 발아 종자, L은 잎, R은 뿌리, FBP는 수분 전의 꽃 및 FAP는 수분 후의 꽃을 나타낸 것이며, Alpha-tubulin은 로딩 컨트롤이다.
- 도 3은 본 발명의 벼 Os09g0553100 유전자 유래의 식물체 전 기관 또는 조직 항시적 프로모터에 GUS 유전자를 융합시킨 재조합 벡터를 이용하여 형질전환시킨 벼 형질전환체의 캘러스, 뿌리, 발아 종자, 잎, 수분 전의 꽃, 수분 후의 꽃 및 암술이 있는 배주(ovule) 조직에서의 GUS 유전자 발현 양상을 나타낸 결과이다. a는 캘러스, b는 뿌리, c는 발아 종자, d는 잎 및 뿌리, e는 수분 전의 꽃, f는 수분 후의 꽃 및 g는 암술이 있는 배주(ovule)를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼(*Oryza sativa*) Os09g0553100 유전자 유래의 단자엽 식물 형질전환을 위한 항시 발현용 프로모터를 제공한다.
- [0018] 상기 프로모터 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상동체는 염기 서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기 서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기 서열이다. 구체적으로, 상기 프로모터 서열은 서열번호 1의 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 프로모터는 식물체 전 기관 또는 조직에서 균등하게 유전자를 발현시키는

것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0020] 또한, 본 발명은 상기 항시 발현용 프로모터를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.
- [0021] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 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)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 계놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 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 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 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.
- [0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 상기 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) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α -아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 식물 발현 벡터에서, 상기 식물 발현 벡터는 본 발명의 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 암호화하는 목적 유전자를 작동가능하게 연결시켜 제조된 것일 수 있다. 본 발명에서, "작동가능하게 연결된"은 이중 단백질을 발현하기 위한 단위로서 기능한 발현 카세트의 성분을 말한다. 예를 들면, 단백질을 코딩하는 이중 DNA에 작동가능하게 연결된 프로모터는 이중 DNA에 해당하는 기능적 mRNA의 생산을 촉진한다.
- [0026] 상기 목적 단백질은, 모든 종류의 단백질일 수 있으며, 예컨대 효소, 호르몬, 항체, 사이토카인 등의 의학적 활용성이 있거나, 사람을 포함한 동물의 건강을 증진시킬 수 있는 영양성분을 다량 축적할 수 있는 단백질이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 목적 단백질의 일 예로는, 인터루킨, 인터페론, 혈소판 유도 성장 인자, 헤모글로빈, 엘라스틴, 콜라겐, 인슐린, 섬유아세포 성장 인자, 인간 성장 인자, 인간 혈청 알부민, 에리스로포이에틴 등이 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0028] 본 발명의 일 구현 예에 따른 형질전환된 식물체에서, 상기 식물체는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양과 등의 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 억새, 갈대, 강아지풀, 기장, 귀리, 수수, 벨러스그래스, 대나무, 돌피, 호밀, 레몬그래스, 밀, 벼, 보리, 사탕수수, 울무, 잔디, 조, 귀리 등의 화본과(Gramineae) 식물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 벼일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 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 튜머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성)바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다. 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 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 된다.

[0030] "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 열매, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 식물 발현 벡터에 외래 유전자를 재조합하는 단계; 및 상기 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 외래 유전자가 항시적으로 발현되는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0032] 상기 외래 유전자는 식물체 전 기관 또는 조직에서 발현을 원하는 어떤 유전자도 될 수 있으며, 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터에서 상기 프로모터의 뒤에 위치하며 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다. 상기 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같이 실시할 수 있다. 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 식물체는 전술한 바와 같다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 외래 유전자가 식물체 전 기관 또는 조직에서 항시적으로 발현되는 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다. 상기 형질전환 식물체는 식물체 전 기관 또는 조직 항시적 발현 프로모터에 의해 외래 유전자를 식물체 전 기관 또는 조직 항시적으로 발현시킬 수 있다.

[0034] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0035] **재료 및 방법**

[0036] **1. 벼 기관별 RNA 분리**

[0037] 본 발명에 사용된 벼의 조직들의 RNA는 동진벼(*Oryza sativa* L. cv.)로부터 분리하였다. 캘러스(callus)는 동진벼(*Oryza sativa* L. cv.)의 종자를 2N6 배지에 37°C의 조건으로 4주 동안 치상하여 유도하였으며, 재분화 캘러스(regenerating callus)는 상기 캘러스를 MS16 배지에 옮긴 후 2주 동안 치상하여 유도한 후, 녹색을 띠었을 때 수집하였다. 발아 종자(germinating seed)는 물을 포함한 여과지에서 4일 동안 암배양하여 얻었으며, 잎 및 뿌리는 종자를 토양에 파종한 후 14일 동안 키운 뒤 수확하였다. 수분 전의 꽃(FBP, flower before pollination)은 작은 이삭(spikelet)이 열리기 직전에 수집하였으며, 수분 후의 꽃(FAP, flower after pollination)은 개화 후에 수집하였다. 특히, 수분 전의 꽃은 암술의 길이가 0.5~1.5mm일 때 수집하였으며, 수분 후의 꽃은 개화하고 소화(floret)가 최대 열린 후에 수집하였다. 총 RNA는 식물 RNA 정제시약(Plant RNA Purification Reagent, Invitrogen)을 이용하여 추출하였으며, 제조사의 지시에 따라 RNeasy 키트(Qiagen)를 이용하여 정제하였다. 실험의 재현성을 위해 모든 시료는 별개의 식물에서 2번 반복하여 수집하였으며 액체 질소에 냉동하여 보관하였다.

[0038] **2. 마이크로어레이(microarray) 측정값에 대한 변동계수(coefficient of variation) 분석**

[0039] 마이크로어레이 분석은 민-투 등(Minh-Thu PT et al., 2013., Rice., 6:38)의 실험을 참고하여 실시하였다. 식물체 기관별 특이적 또는 모든 기관에서 발현하는 유전자에 대한 발현 분석은 마이크로어레이에서 얻은 신호 강도의 변동계수(coefficient of variation, CV)를 계산하여 수행하였다. 변동계수는 평균에 대한 표준편차의 비

율로 계산되며, 이 값을 순서적으로 나열하여 그 값이 클수록 식물체 기관별로 편차가 많음을 의미한다. 따라서 그 값에 따라 CV I, CV II 및 CV III로 분류하였으며, CV 값이 0.7 이상인 유전자들을 CV I, 0.3-0.7인 유전자들을 CV II 및 0.3 미만인 유전자들을 CV III로 분류하였다.

[0040] **3. 반-정량적 RT-PCR(semi-quantitative RT-PCR)**

[0041] RT-PCR의 분석을 위해, 총 RNA(5 μ g)은 올리고(dT) 프라이머 및 SuperScript III(Invitrogen)를 사용하여 역전사 하였다. PCR 반응은 cDNA 혼합물의 1/100의 양을 첫 주형으로, 이에 대한 유전자-특이적 프라이머를 사용하였으며, 94 $^{\circ}$ C에서 10분, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초 및 72 $^{\circ}$ C에서 1분의 반응을 25회 수행하였다. PCR 산물은 전 기영동 후 2% 아가로스 겔로부터 추출하여 벡터 제작에 사용하였다.

[0042] **4. 벼 형질전환용 벡터 제작 및 아그로박테리움을 이용한 벼의 형질전환**

[0043] 분리하고자 하는 유전자의 프로모터는 특이적 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 게놈 DNA로부터 분리하였다. Gateway 시스템(Invitrogen)을 이용하여 약 2kb의 프로모터 서열을 위치-특이적 재조합(site-specific recombination)을 이용하여 벼 형질전환용 벡터에 옮겼으며, 제조제 저항성을 가진 식물체를 선별하기 위해 상 기 벡터는 항시 발현 CaMV 35S 프로모터 조절하에 바(bar) 유전자를 포함하게 하였다. 형질전환 아그로박테리움을 제작하기 위해 tri-parental mating 방법으로 상 기 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스 LBA4404(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404)에 도입하였다. 동진벼의 성숙종자에서 얻어진 배아 캘러스 (Embryonic calli)와 아그로박테리움 tri-parental mating 방법으로 얻은 아그로박테리움과 공동배양(co-cultivation)하였으며, 형질전환된 캘러스는 제조제인 포스포노트리신(phosphinothricin)이 함유된 선택배지에서 선별하였다. 선별된 캘러스는 재분화 배지에서 배양한 후 재분화된 식물체를 선별하여 후대검정을 하였다.

[0044] **5. GUS 발현 관찰 및 벼 기관별 프로모터 활성 분석**

[0045] GUS 염색분석은 형질전환 벼에 대해서 이전의 방법을 약간 변형하여 실시하였다(Jefferson et al. 1987., Plant Mol Biol Rep., 5:387-405). 조직을 먼저 차가운 90%(v/v) 아세톤에 넣은 후 소듐 포스페이트 버퍼(50mM 및 pH 7.0)로 씻어낸 후 염색용액(50mM sodium phosphate, 0.5mM K₄[Fe(CN)₆], 0.5mM K₃[Fe(CN)₆], 0.1%(v/v) Triton X-100, 0.5mg X-gluc/ml 및 pH 7.0)에서 30분 동안 압력을 낮춰 투과시킨 후 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 고정하였다. 염색 후에 70%(v/v) 에탄올 용액에 가라앉혀 클로로필을 제거하였으며, GUS 염색은 디지털 카메라(sony DSLR-A350, Japan)로 촬영하였다.

[0046] **실시예 1. 벼 기관별 유전자 분석**

[0047] 벼 기관별 조직의 유전자를 분석하기 위해, 동진벼(*Oryza sativa* L. cv. Dongjin) 품종으로부터 7개의 조직기관인 캘러스(C), 재분화 캘러스(regenerating callus, RC), 발아 종자(germinating seed, GS), 잎(leave, L), 뿌리(root, R), 수분 전의 꽃(flower before pollination, FBP) 및 수분 후의 꽃(flower after pollination, FAP)을 준비하였다. 변동계수(CV, Coefficient of variation) 분석은 벼의 7개 기관 또는 조직 중 공통 또는 특이적인 유전자들을 밝혀준다. 각 기관의 공통 또는 특이적인 유전자 분석을 위해, 마이크로어레이(microarray)의 측정값에 대해서 변동계수 값을 구하였다. 변동계수는 표준편차값에 대한 평균의 비로서 CV값이 높을수록 벼 기관별 내의 변이값이 큰 것을 의미한다. 본 발명에서는 CV값이 0.7 이상인 유전자들을 CV I, 0.7~0.3의 유전자들을 CV II, 0.3 미만인 유전자들을 CV III으로 분류하였다(도 1). 이 분류에 의해 CV I 및 CV II는 각각 1,802개 및 8,167개의 유전자가 있었으며, CV III의 경우 17,646개 정도의 유전자가 포함되어 있었다. 또한, CV III의 경우 2,540개 유전자의 발현강도가 20,000 내지 64,000 정도로 강한 발현양상을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해, 변동계수(CV) 분석은 벼 전 기관 공통 또는 특이적인 유전자를 선별하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

[0048] **실시예 2. 반-정량적(Semi-quantitative) RT-PCR에 의한 벼 Os09g0553100 유전자 발현 분석**

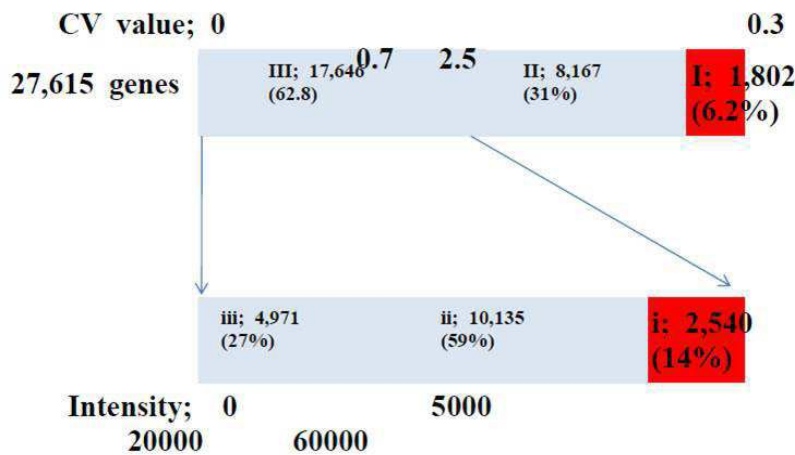
[0049] 상기 실시예 1의 마이크로어레이 및 변동계수(CV) 분석 결과를 기반으로, 벼의 전 기관 또는 조직에서 항시적으로 발현하는 Os09g0553100 유전자의 발현 양상을 분석하였다. CVIII 그룹에서 선발된 Os09g0553100 유전자에 대한 특이적 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 Os09g0553100 유전자가 벼의 전 기관 또는 조직에서 항시적으로 발현되는 양상을 확인할 수 있었다.

[0050] 실시예 3. 형질전환 식물체에서 벼 Os09g0553100 유전자 유래의 단자엽 식물 형질전환을 위한 프로모터 활성 분석

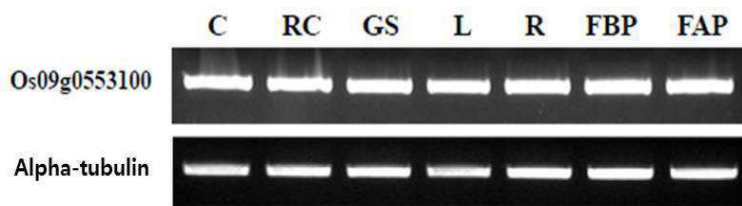
[0051] 상기 실시예 2에서 선발된 Os09g0553100 유전자가 벼의 전 기관 또는 조직에서 발현되는지 확인하기 위해, Os09g0553100 유전자의 약 2kb의 프로모터를 벼 게놈 DNA로부터 분리하여 PCR을 통해 증폭한 후 프로모터:GUS 리포터(Promoter:GUS reporter)를 제작하였으며, 아그로박테리움을 이용하여 벼에 형질전환한 후 GUS 유전자 발현 양상을 분석하였다. 그 결과, 도 3에 개시된 바와 같이 벼 형질전환체의 전 기관 또는 조직에서 상기 GUS 유전자가 강하게 발현하는 것을 관찰할 수 있었다.

도면

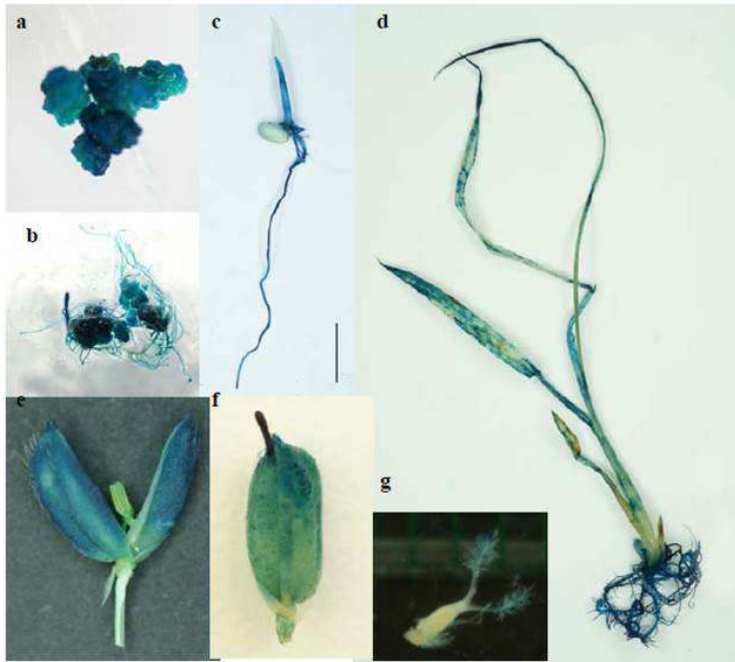
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Myongji University Industry and Academia Cooperation Foundation
- <120> Constitutive promoter from *Oryza sativa* Os09g0553100 gene for transforming monocot plant and uses thereof
- <130> PN17011
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 2013
- <212> DNA
- <213> *Oryza sativa*
- <400> 1

```

acatggcatt ttggccaag ttgagaatt tgttggcct gataatgttt ctttctggg      60
ccacgtggcc tgaggcctaa gtccgtccct gatggcattt tgctgtggg acgaaggag      120
tactcatag gaagcatgtg cattaaggcc ctgttcgaga taaaagtttt agttttcat      180

ggcacgtatt ttaaactgct aaacgggtg tttcgtgcaa aaatTTTcta tatgaaaatt      240
attctaaaat atcagattaa tccatTTTT ttaattttg taataattaa aattcagtta      300
atcacaagtt attatcacat catttcaaac atagcctaat tctccaacat tctattcctt      360
gtaaaaggaa gcggtttgca ctagaccacc tgatgtgaac catcctttgc ctaggaataa      420
ggtcacgttt ttttttctt atgggttatc gtagatatgc ttccaggct cttaaacatt      480
    
```

atattttggtt gacctcatcg gttcgtcatg cttggttaac cctgtttaaa tctgatgaaa 540
 atagatatta agtgatgcca cacaacgag aaaaccatta gcacagggtt agttaagttt 600

 tatttttttt aacttaaaaa tatgttcatt tgatatttta aagcaattta tatgtagaaa 660
 gtttttacac ggaatacaac gtttagcattt cgaaagtcac gctaacgaaa accaagttaa 720
 aatccatatac ttaatcaagt tagaatattt aaactacata tgcaaagtct gtatcttagt 780
 gcatcagcac gtaccaactg gactagcctc gcatttataa tttttatttt ttaaaaaatc 840
 aacgtacttt ataatttggc ctatttaatc cctgcatttt ccatacatga aataccatac 900
 aaaaataata ttaccgctat ctccgactat agtcgtttga gaagggtcct aaccatttgc 960
 tcccatgtat aatttagccg ctataacttc atttaaccgg ctatagttgt ttgggaaggt 1020

 caactactaa atatcttatac tcgttattta aaacaccgat tataagtagg agtgacaatg 1080
 atacacctag ggctgttca ttttgatgct attttaaac ttatcaaatt ttggtaaagt 1140
 tgccaaaaaa gttgctacat ttattttgta gctaattttt gacaactata taagaaatca 1200
 tactaaaatt ttgacatagt gtagatgtcg ggcatgaaag tgaacaggcc cctagcgtag 1260
 atgtcgggtg ggatggtttc aggaaaagaa acatgatgag tagagctacg ctcatttggc 1320
 atatgcaaat tattctttcg tgccgtcctt ttacaatttt atactgtct tattacctgt 1380
 aaccttttgt cagagaagag aacacgattg tttacagtca caaatgcatt gtgaagcttt 1440

 tgcaagtctt cagaaattta atttggttga cttacatagt taaataggag tacctaacat 1500
 ggccagctta attcactca caaataattt tggtcaaag ccttttacgc cttcaacta 1560
 cagaaacgta ttttactaac ctcatggcac ccaactatgg gcccacttgt catagataga 1620
 acctatccga aatttctaga ccgctgcgag acccgccacc caaaaaccg gggcccacct 1680
 gccatccacc caacacgagc ccaactcccc ctgcaattcc cgcacccccg ccacatcctc 1740
 acaaaagaaa cacacctccc gctcaccacc agcccagtc accgatccgc gcaaccceca 1800
 cctccccac tccccgctt ccatctcca tccaacggcg gaaaaccagc agcacgcgga 1860

 tcgtgecccc catcgcttcc cctaaacca cgcctctata aagccccgcc cccacagcc 1920
 tcctctccc cactcatca ccaccgccg caaccactcc tcaccaagtc aaagtttctt 1980
 cctcgcgacc ggcggcagcg gcggcggcgg cga 2013