



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월18일

(11) 등록번호 10-1520912

(24) 등록일자 2015년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0106886

(22) 출원일자 2012년09월26일

심사청구일자 2013년08월27일

(65) 공개번호 10-2014-0040372

(43) 공개일자 2014년04월03일

(56) 선행기술조사문헌

Plant Physiol. 2009 Aug; 150(4): 2057-2070

Plant Biotechnology Journal, Volume 10, Issue 3, pages 269-283

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자

김차영

대전광역시 유성구 과학로 125

정유정

대전광역시 유성구 과학로 125

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 7 항

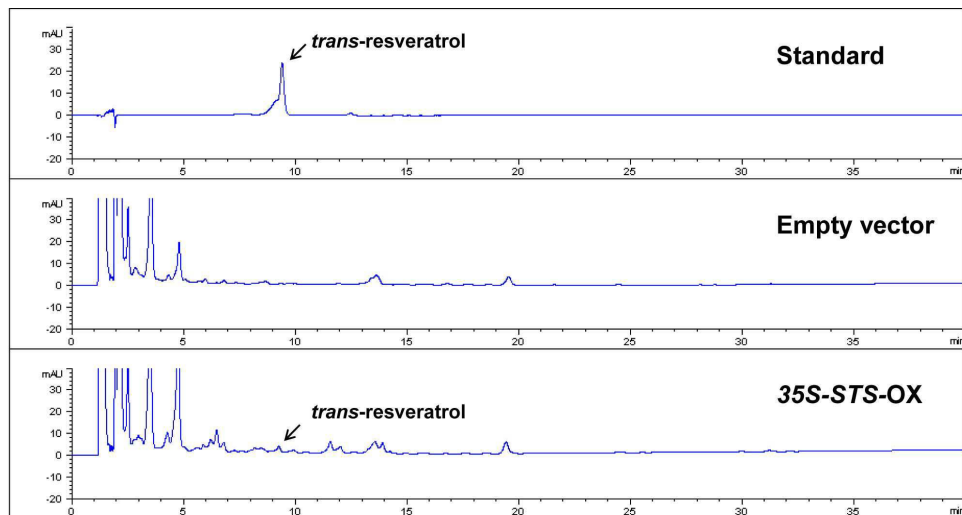
심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 ROMT 및 STS 유전자를 이용한 식물의 스틸벤 함량을 증가시키고 화색을 변화시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 식물 유래의 ROMT 및 STS 융합 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환시켜 스틸벤 함량이 증가되고 화색이 변화된 형질전환 식물체를 제조하는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 스틸벤 함량이 증가되고 화색이 변화된 형질전환 식물체에 관한 것으로, 향암, 항바이러스, 항염증, 항노화, 항산화 등의 여러 생리활성으로 인하여 건강 기능성 식품, 화장품, 의약품, 염료 및 기능성 가축 사료 등에 활용되고 있는 스틸벤을 대량 생산하는 새로운 식물을 제공하는데 매우 유용한 방법인 것으로 판단된다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

김옥진

대전광역시 유성구 과학로 125

정형재

대전광역시 유성구 과학로 125

안철한

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395026908

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대 바이오그린21사업

연구과제명 식물 대사재설계를 통한 기능성 폴리페놀 바이오소재 생산기술 개발

기여율 7/10

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0001911

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단(대전)

연구사업명 기초연구사업(일반)

연구과제명 분자대사공학기술이용 바이러스 감염, 염증 제어용 스틸벤 화합물 생산시스템 구축

기여율 3/10

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 포도(*Vitis riparia*) 유래의 레스베라트롤 0-메틸전달효소(ROMT, resveratrol 0-methyltransferase) 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 장엽대황(*Rheum Palmatum*) 유래의 스틸벤 생합성 효소(STS, stilbene synthase) 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 재조합 벡터를 식물세포에 형질 전환시키는 단계를 포함하는 식물의 안토시아닌 함량을 감소시키는 방법.

청구항 2

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 포도(*Vitis riparia*) 유래의 레스베라트롤 0-메틸전달효소(ROMT, resveratrol 0-methyltransferase) 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 장엽대황(*Rheum Palmatum*) 유래의 스틸벤 생합성 효소(STS, stilbene synthase) 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 재조합 벡터로 식물세포를 형질 전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 안토시아닌 함량이 감소된 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 식물은 쌍자엽인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 식물은 담배인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제2항의 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 안토시아닌 함량이 감소된 형질전환 식물체.

청구항 7

제6항에 따른 식물체의 종자.

청구항 8

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 포도(*Vitis riparia*) 유래의 레스베라트롤 0-메틸전달효소(ROMT, resveratrol 0-methyltransferase) 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 장엽대황(*Rheum Palmatum*) 유래의 스틸벤 생합성 효소(STS, stilbene synthase) 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물의 안토시아닌 함량 감소용 조성물.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 ROMT 및 STS 유전자를 이용한 식물의 스틸벤 함량을 증가시키고 화색을 변화시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 포도(*Vitis riparia*) 유래의 레스베라트롤 0-메틸전달효소(ROMT, resveratrol 0-methyltransferase) 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 수수(*Sorghum bicolor*) 유래의 레스베라트롤 0-메틸전달효소(ROMT); 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 장엽대황(*Rheum Palmatum*) 유래의 스틸벤 생합성 효소(STS, stilbene synthase); 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 스틸벤 함량을 증가시키고 화색을 변화시키는 방법, 상기 벡터

[0001]

로 식물세포를 형질전환시켜 야생형에 비해 스틸벤 함량이 증가되고 화색이 변화된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 스틸벤 함량이 증가되고 화색이 변화된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 상기 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물의 스틸벤 함량 증가용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 레스베라트롤은 강한 항산화성으로 결장암, 구강포진, 케양치료에 이용되고 있으며, 또한 항암, 항혈전, 항고지혈증, 항염증, 발작질환, 심혈관 질병의 예방 등 인간의 건강 증진을 위한 약리 효과가 있음이 밝혀졌는데, 이러한 생리활성을 갖는 레스베라트롤은 72종 이상의 식물체에서 합성되며, 소나무 등 목본류에서는 항상 생산되지만, 초본류에서는 피토알렉신 활성화에 의해 상처, 오존에 의한 손상, UV, 병해충 감염 등 외부 스트레스에 의한 자기방어 물질로 생합성되며, 레스베라트롤의 생합성이 가장 우수한 식물은 포도와 땅콩이다.

[0003] 적포도주에는 레스베라트롤이 함유되어 있어 '프렌치 패러독스' (French Paradox)라 하여 적포도주의 섭취와 심혈관질환의 발병률은 부의 상관관계가 있다는 사실은 적포도주가 전 세계적으로 관심을 끌게 된 계기가 되었는데, 하지만, 레스베라트롤의 함량을 인위적으로 증진시키기 위하여 재배시 포도에 인위적으로 균주를 접종하거나, 수확 후 포도와 땅콩 종자에 초음파 세척 처리나, UV 조사 등을 통하여 레스베라트롤의 함량을 증진시키는 연구들이 시도되고 있다.

[0004] 또한, 포도와 땅콩으로부터 분리한 레스베라트롤 합성 유전자를 생명공학기법을 이용하여 레스베라트롤 생합성 작물을 개발하려는 연구가 시도되고 있는데, 포도의 레스베라트롤 합성 유전자를 이용한 형질전환 키위 식물체 잎에서 182 μ g/g의 레스베라트롤이 생산되었으며, 땅콩의 레스베라트롤 합성 유전자를 이용한 형질전환 담배의 현탁배양 세포에서 50ng/g의 레스베라트롤이 생산되었음을 보고하였다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2008-0012483호에서는 레스베라트롤을 함유한 쌀이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2003-0067689호에서는 형질전환 식물에서의 스틸벤의 생산 및 그것의 생산 방법이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 ROMT 및 STS 유전자를 이용한 식물의 스틸벤 함량을 증가시키고 화색을 변화시키는 방법에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 포도 유래의 ROMT 및 장엽대황 유래의 STS 코딩 유전자; 또는 수수 유래의 ROMT 및 장엽대황 유래의 STS 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 재조합 벡터를 애기장대, 담배 및 알팔파 식물세포에 형질전환시킨 결과, 식물의 스틸벤 함량을 증가시키고 화색이 변화되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 포도(*Vitis riparia*) 유래의 레스베라트롤 0-메틸전달효소(ROMT, resveratrol 0-methyltransferase) 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 수수(*Sorghum bicolor*) 유래의 레스베라트롤 0-메틸전달효소(ROMT); 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 장엽대황(*Rheum Palmatum*) 유래의 스틸벤 생합성 효소(STS, stilbene synthase); 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 스틸벤 함량을 증가시키고 화색을 변화시키는 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 야생형에 비해 스틸벤 함량이 증가되고 화색이 변화된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 스틸벤 함량이 증가되고 화색이 변화된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물의 스틸벤 함량 증가용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 식물 유래의 ROMT 및 STS 유전자를 이용한 스틸벤 함량을 증가시키고 화색을 변화시키는 식물체의 제조방법은 항암, 항바이러스, 항염증, 항노화, 항산화 등의 여러 생리활성으로 인하여 건강 기능성 식품,

화장품, 의약품, 염료 및 기능성 가축 사료 등에 활용되고 있는 스틸벤을 대량생산하는 새로운 식물을 제공하는 데 매우 유용한 방법인 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 스틸벤(레스베라트롤 및 테로스틸벤) 화합물의 구조 및 식물에서의 스틸벤 합성 경로를 나타낸다. 타이로신, 페닐알라닌과 같은 아미노산으로부터 p-쿠마르산이 생성되고 4CL(4-coumarate:CoA ligase)에 의해 p-쿠마로일-CoA가 생성된다. 이를 다시 STS 효소가 레스베라트롤로 변환시키고 이렇게 생성된 레스베라트롤은 ROST에 의해 테로스틸벤으로 전환된다.
- 도 2는 스틸벤 생합성 유전자 STS 및 ROMT의 식물 형질전환용 과발현 벡터의 모식도이다.
- 도 3은 Flag-tag 및 HA-tag 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석으로 RpSTS 및 VrROMT 유전자 과발현 형질전환 애기장대 식물체(T2)의 선발을 나타낸다(Flag-STs: 44kDa, HA-ROMT: 41kDa).
- 도 4는 Flag-tag 및 HA-tag 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석으로 RpSTS 및 VrROMT 유전자 과발현 형질전환 담배 식물체(T1)의 선발을 나타낸다(Flag-STs: 44kDa, HA-ROMT: 41kDa).
- 도 5는 STS 과발현 형질전환 담배 식물체(35S-STs-OX 및 35S-ROST-OX: T1)의 화색 변이를 나타낸다. 35S-ROST-OX에서 ROST는 STS-ROMT의 줄임말로, 두 유전자가 삽입된 형태를 의미한다.
- 도 6은 STS 과발현 형질전환 담배 식물체(35S-STs-OX: T1)의 웅성불임 표현형을 나타낸다.
- 도 7은 STS 과발현 형질전환 담배 식물체(35S-STs-OX 및 35S-ROST-OX: T1)의 꽃에서 안토시아닌 색소량 변화를 나타낸다. 35S-ROST-OX에서 ROST는 STS-ROMT의 줄임말로, 두 유전자가 삽입된 형태를 의미한다.
- 도 8은 STS 과발현 형질전환 담배 식물체(35S-STs-OX: T1)의 잎에서 트랜스-레스베라트롤 물질 생산을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 포도(*Vitis riparia*) 유래의 레스베라트롤 O-메틸전달효소(ROMT, resveratrol O-methyltransferase) 또는 수수(*Sorghum bicolor*) 유래의 레스베라트롤 O-메틸전달효소(ROMT); 및 장엽대황(*Rheum Palmatum*) 유래의 스틸벤 생합성 효소(STS, stilbene synthase); 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 스틸벤 함량을 증가시키고 화색을 변화시키는 방법을 제공한다.
- [0014] 상기 포도 유래의 ROMT, 수수 유래의 ROMT 및 장엽대황 유래의 STS 유전자는 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열, 서열번호 2의 염기서열 및 서열번호 3의 염기서열로 각각 이루어질 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열, 서열번호 2의 염기서열 또는 서열번호 3의 염기 서열과 각각 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 최적으로 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.
- [0015] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단(예를 들어, 세포내 재도입된 것)에 의해 세포내 재도입된 것이다.
- [0016] 본 발명에서, 상기 ROMT 또는 STS 유전자 서열은 재조합 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다.
- [0017] ROMT 또는 STS 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의

해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 재조합 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 DNA를 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.

[0019] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 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 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자, aadA 유전자 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 재조합 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS, 히스톤 프로모터, Clp 프로모터 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0021] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAm1 A 터미네이터, phaseolin(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0022] 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포(예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다.

[0023] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 포도(*Vitis riparia*) 유래의 레스베라트롤 O-메틸전달효소(ROMT, resveratrol O-methyltransferase) 또는 수수(*Sorghum bicolor*) 유래의 레스베라트롤 O-메틸전달효소(ROMT); 및 장엽대황(*Rheum Palmatum*) 유래의 스틸벤 생합성 효소(STS, stilbene synthase); 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

[0025] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 스틸벤(stilbenes) 생산이 증가되고 화색이 변화된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 포도 유래의 ROMT, 수수 유래의 ROMT 및 장엽대황 유래의 STS 유전자는 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열, 서열번호 2의 염기서열 및 서열번호 3의 염기서열로 각각 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 식물체는 바람직하게는 쌍자엽 식물일 수 있고, 가장 바람직하게

는 담배 또는 애기장대일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0028] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 의해 매개될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.
- [0029] 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지되어 있다(*Handbook of Plant Cell Culture*, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).
- [0030] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 스틸벤은 레스베라트롤(resveratrol) 또는 테로스틸벤(pterostilbene)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 스틸벤(stilbenes) 생산이 증가되고 화색이 변화된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 식물은 바람직하게는 쌍자엽 식물일 수 있고, 더욱 바람직하게는 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 알팔파, 강낭콩 및 완두일 수 있고, 가장 바람직하게는 담배 또는 애기장대일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 포도(*Vitis riparia*) 유래의 레스베라트롤 0-메틸전달효소(ROMT, resveratrol 0-methyltransferase) 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 수수(*Sorghum bicolor*) 유래의 레스베라트롤 0-메틸전달효소(ROMT); 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 장엽대황(*Rheum Palmatum*) 유래의 스틸벤 생합성 효소(STS, stilbene synthase); 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물의 스틸벤(stilbenes) 생산 증가 및 화색 변화용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 포도 유래의 ROMT 또는 수수 유래의 ROMT 및 장엽대황 유래의 STS 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 재조합 벡터를 포함하며, 상기 유전자를 식물체에서 과발현시킴으로써 식물의 스틸벤 생산을 증가시키거나 화색을 변화시킬 수 있는 것이다.
- [0034] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0035] **실시예 1. 레스베라트롤 합성 전사인자 RpSTS 유전자의 클로닝**

[0036] 레스베라트롤 생산시스템을 개발하기 위해 사용된 유전자는 장엽대황(*Rheum palmatum*)으로부터 레스베라트롤 생합성 관련 전사인자 유전자 *RpSTS*(1,176bp)를 분리하여 이용하였다. 장엽대황 시료는 농업진흥청 강원도 농업기술원 북부농업시험장(www.ares.gangwon.kr)에서 확보 하였으며, 이 시료로부터 총 RNA를 분리하였다. 상동성 기반 프라이머(homology-based primer)를 이용하여 RT-PCR 및 오버랩 확장 PCR 방법으로 분리하였다. 분리된 총 RNA는 First-Strand cDNA Synthesis Kit (Fermantas, Canada)를 이용하여 설명서대로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 Advantage 2 polymerase mix (Clontech, Tokyo, Japan)를 이용하여 장엽대황 *RpSTS* 전사인자를 PCR을 통하여 증폭하였다. 본 발명에 사용한 프라이머 염기서열은 다음과 같다: RpSTS_F(Nde): 5'-CATATGGCACCGGAGGAGT-3' (서열번호 4), RpSTS_R(Spe): 5'-ACTAGTTCAGGTAATTAGCGGC-3' (서열번호 5). PCR 증폭은 95℃에서 2분간 변성, 95℃에서 15초, 55℃에서 30초, 72℃에서 2분을 1 사이클로 하여 30 사이클 및 72℃에서 10분간 최종 연장반응에 의해 수행되었다. 증폭된 PCR 산물은 pT-Blunt 벡터(solgent)에 클로닝한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열분석 결과 클로닝된 *RpSTS* 유전자는 총 1,176bp로 구성되었다.

[0037] **실시예 2. 테로스틸벤 합성 전사인자 VrROMT 및 SbROMT 유전자의 클로닝**

[0038] 테로스틸벤 생산시스템을 개발하기 위해 사용된 유전자는 포도(*Vitis riparia*)와 수수(*Sorghum bicolor*)로부터 테로스틸벤 생합성 관련 전사인자 유전자 *VrROMT*(1,074bp)와 *SbROMT*(1,125bp)를 분리하여 이용하였다. 포도(*Vitis riparia*) 시료는 충청북도농업기술원 포도연구소(www.ares.chungbuk.kr)에서 확보하였으며, 수수

(*Sorghum bicolor*) 시료는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원정보센터(<http://www.genebank.go.kr/>)에서 확보하였다. 이 유전자를 상동성 기반 프라이머를 이용하여 RT-PCR 및 오버랩 확장 PCR 방법으로 분리하였다. 분리된 총 RNA는 First-Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Canada)를 이용하여 설명서대로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 Adavantage 2 polymerase mix (Clontech, Tokyo, Japan)를 이용하여 포도 *VrROMT* 전사인자를 PCR을 통하여 증폭하였다. 본 실험에 사용한 프라이머 염기서열은 다음과 같다: *VrROMT_F*(Nde): 5'-CATATGGATTGGCAAACG-3' (서열번호 6), *VrROMT_R*(Spe): 5'-ACTAGTCAAGGATAAACCTCAA-3' (서열번호 7), *SbROMT3-F1*: 5'-CATATGGTACTCATCAGCGAGGACAGT-3' (서열번호 8), *SbROMT3-R1*: 5'-ACTAGTCATGGATATAGCTCAATGATCGATC-3' (서열번호 9). *VrROMT* 유전자의 PCR 증폭은 95°C에서 2분간 변성, 95°C에서 15초, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분을 1 사이클로 하여 30 사이클 및 72°C에서 10분간 최종 연장반응에 의해 수행되었다. 증폭된 PCR 산물은 pT-Blunt 벡터(solgent)에 클로닝한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열분석 결과 클로닝된 *VrROMT* 유전자는 총 1,074bp로 구성되었다. *SbROMT* 유전자의 PCR 증폭은 94°C에서 2분간 변성, 94°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초를 1 사이클로 하여 30 사이클 및 72°C에서 5분간 최종 연장반응에 의해 수행되었다. 증폭된 PCR 산물은 pT-Blunt 벡터(solgent)에 클로닝한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열분석 결과 클로닝된 *SbROMT* 유전자는 총 1,125bp로 구성되었다.

[0039] **실시에 3. 스틸벤류 생합성 유전자 식물체 과발현용 운반체 제작**

[0040] 상기 실시예 1 및 2에서 클로닝된 *RpSTS*, *VrROMT* 및 *SbROMT3* 유전자를 식물체에서 과발현시켰을 때 레스베라트롤과 테로스틸벤의 합성을 증대시킬 수 있는지를 알아보기 위하여, 카나마이신 저항성을 지니는 pGR0229의 식물 발현 벡터 (Center for Application of Molecular Biology to International Agriculture, Australia)의 duplicated 35S 프로모터와 35S 터미네이터 사이에 *RpSTS*가 삽입된 벡터, duplicated 35S 프로모터와 35S 터미네이터 사이에 *RpSTS*, *VrROMT*가 삽입된 벡터, duplicated 35S 프로모터와 35S 터미네이터 사이에 *SbROMT3*가 알파파의 RbcS 프로모터와 nos 터미네이터 사이에 *RpSTS*가 삽입된 벡터를 각각 제작하였다. 상기 제작된 과발현 운반체는 1)pGR-Flag::*RpSTS*(pGR-STs), 2)pGR-HA::*VrROMT*-Flag::*RpSTS*(pGR-ROST), 3)pGR-RbcS-Flag::*RpSTS*-35S-HA::*SbROMT3*(pGR-STRO) 로 각각 명명하였다(도 2).

[0041] **실시에 4. 스틸벤류 합성 애기장대 형질전환체의 제조**

[0042] 상기 실시예 3에서 제작된 1)pGR-Flag::*RpSTS*(pGR-STs), 2)pGR-HA::*VrROMT*-Flag::*RpSTS*(pGR-ROST) 식물발현 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스 Gv310에 동결-해동 (freeze-thaw) 방법을 이용하여 형질전환 하였다. 아그로박테리움을 50mg/L의 Km(Kanamycin), 100 mg/L의 Rif(Rifampicin) 5ml LB 액체배지에서 28°C로 배양한 후 50mg/L의 Km(Kanamycin), 100 mg/L의 Rif(Rifampicin) 100~200ml LB 액체배지에 옮겨 OD 2.0까지 배양하였다. 배양액을 5k(GSA), 10분 원심분리하여 얻은 침전물을 50g/L 수크로스, 2.2g/L MS 염, 0.5g/L MES, 200 μ l/L 실웨트(silwet), 0.44 μ M BAP(benzylaminopurine)에 KOH를 이용하여 pH5.7을 맞춘 침윤 배지로 OD 0.8~1.0이 되도록 재부유시켰다. 비커에 아그로박테리움 배양액을 붓고 꽃이 핀 애기장대 식물체를 뒤집어 비커에 담가 5분간 충분히 적셔주었다. 애기장대를 꺼내어 트레이에 눕혀 커버를 씌운 후 24시간 동안 습도가 유지된 상태로 두었다. 다음날 커버를 벗기고 식물을 세워 종자생성이 잘 되도록 25°C 배양실에서 생육시켰다.

[0043] **실시에 5. 스틸벤류 합성 담배 형질전환체의 제조**

[0044] 상기 실시예 3에서 제작된 1)pGR-HA::*VrROMT*-Flag::*RpSTS*(pGR-ROST) 식물발현 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스 LBA4404 (H, R. and Willmitzer L. (1988) Nucleic Acids Res 16:9877)에 동결-해동 (freeze-thaw) 방법을 이용하여 형질전환하였다. 형질전환된 아그로박테리움과 담배 (*Nicotiana tabacum* cv SR-1) 잎 절편을 공동 배양하여 담배를 형질전환하였다. 형질전환을 위해 대조군인 야생형 담배를 1mg/L의 NAA (a-naphthalene acetic acid), 1mg/L의 BA (6-benzyladenine), 10g/L의 수크로스, 8g/L의 한천 (agar)이 첨가된 MS 배지에서 3일간 공동배양한 후, 형질전환된 재분화 식물체를 얻기 위하여 1mg/L의 NAA, 1mg/L의 BA, 300mg/L의 카르베니실린, 100mg/L의 Km (Kanamycin), 10g/L의 수크로스, 8 g/L 한천이 첨가된 MS 배지에서 배양한 다음, 3주마다 계대배양 하였다. 재분화된 신토는 300 mg/L의 카르베니실린, 100mg/L의 Km, 10 g/L의 수크로스, 8g /L의 한천이 첨가된 MS 배지로 옮겨 발근을 유도하였다. 배양은 26°C, 16시간 광주기/8시간 암주기의 조건에서 배양하였고, 발근된 개체는 순화 후 화분으로 이식하여 온실에서 평균 기온 26°C 이상의 조건에서 생육시켰다.

[0045] **실시에 6. 형질전환 애기장대의 레스베라트롤 합성 단백질의 발현 분석**

[0046] 상기 실시예 4에서 선발된 각각의 형질전환 애기장대에서 *RpSTS*와 *VrROMT* 유전자가 안정적으로 번역되는지 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 카나마이신이 포함된 배지에서 선발된 형질전환 애기장대 식물체를 대상으로 분석한 결과, 레스베라트롤의 전사인자인 *RpSTS* 유전자가 안정적으로 발현되어 번역되는 것을 확인하였다. 그렇지만 *VrROMT* 유전자의 단백질 발현은 확인하지 못하였다(도 3).

[0047] **실시에 7. 형질전환 담배의 레스베라트롤 합성 단백질의 발현 분석**

[0048] 상기 실시예 5에서 선발된 각각의 형질전환 담배에서 *RpSTS*와 *VrROMT* 유전자가 안정적으로 번역되는지 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 카나마이신이 포함된 배지에서 선발된 형질전환 담배 식물체를 대상으로 분석한 결과, 레스베라트롤과 테로스틸벤의 전사인자인 *RpSTS*와 *VrROMT* 유전자가 안정적으로 발현되어 번역되는 것을 확인하였다(도 4).

[0049] **실시에 8. 형질전환 담배의 표현형 관찰**

[0050] 상기 실시예 7에서 선발된 각각의 형질전환된 담배 식물체는 비형질전환 대조구와 비교하여 유식물체에서 외형적인 표현형의 차이가 나타났다. *RpSTS*와 *VrROMT* 유전자가 도입된 형질전환 담배 식물체의 경우 꽃잎에서는 안토시아닌 색소의 감소를 확인할 수 있었다(도 5). 안토시아닌 색소가 꽃잎의 전신조직에서 균일하게 감소되는 계통과 안토시아닌 색소가 꽃잎의 전신에서 얼룩덜룩하게 감소되는 계통을 획득하였다(도 5). 그리고 *RpSTS*와 *VrROMT* 유전자가 도입된 형질전환 담배 식물체에서 웅성불임을 확인하였다(도 6). 이들에서 꽃 밥이 생성되지 않는 경우, 수술머리의 발달이 되지 않는 경우, 수술의 길이가 짧아 암술과의 수분이 이루어지지 않는 경우 3가지의 불임현상을 관찰할 수 있었다(도 6).

[0051] **실시에 9. 꽃잎에서의 안토시아닌색소 소실 담배의 안토시아닌 함량 분석**

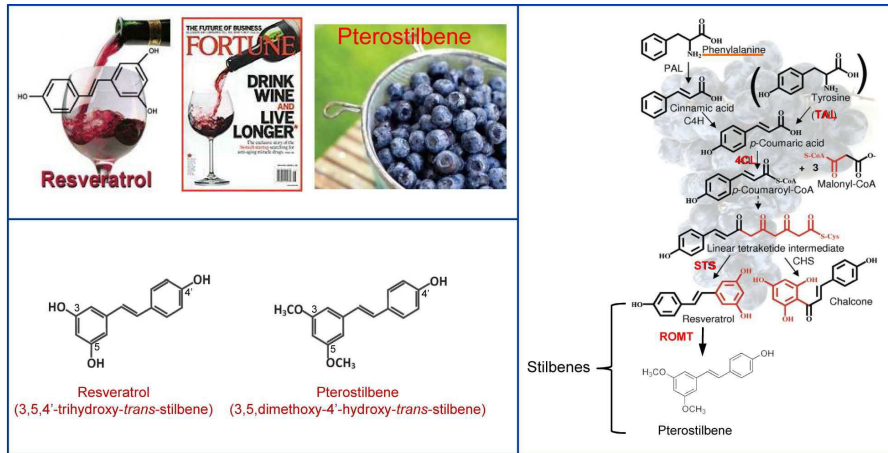
[0052] 비형질전환 대조구 및 형질전환 담배 식물체 ((1)pGR-HA::VrROMT-Flag::RpSTS 발현 벡터로 형질전환된 담배)의 꽃잎을 대상으로 Mehrtens F 등 (Mehrtens F et al. (2005) Plant Physiol. 138: 1083-1096)이 기재한 방법으로 총 안토시아닌의 함량을 분석하였다. 비형질전환 대조구 및 각각의 형질전환 담배 식물체 3개씩의 꽃잎을 각각 샘플링하여 안토시아닌을 추출하였고, 안토시아닌 함량을 흡광광도계를 이용하여 530nm와 657 nm에서 흡광도 값을 읽고 아래의 공식을 대입하여 각 시료의 전체 안토시아닌 함량을 측정 후 평균값으로 나타내었다 : $(Q_{\text{Anthocyanins}} = (A_{530} - 0.25 \times A_{657}) \times M^{-1})$, M은 사용된 시료의 g 무게). 그 결과, 도 7에서 보는 바와 같이, 대조구에 비해 레스베라트롤 및 테로스틸벤 합성 유전자 *RpSTS*와 *VrROMT*가 도입된 담배 개체의 잎에서 pGR-STs-OX 라인, pGR-ROST-OX 라인은 각각 6.97배, 3.51배 안토시아닌이 감소하였다. 이로써 레스베라트롤 및 테로스틸벤 합성 유전자가 도입된 담배 식물체가 꽃잎에서의 안토시아닌 색소를 감소시키는 것을 확인하였다.

[0053] **실시에 10. 레스베라트롤 생성 담배에서의 레스베라트롤 함량 분석**

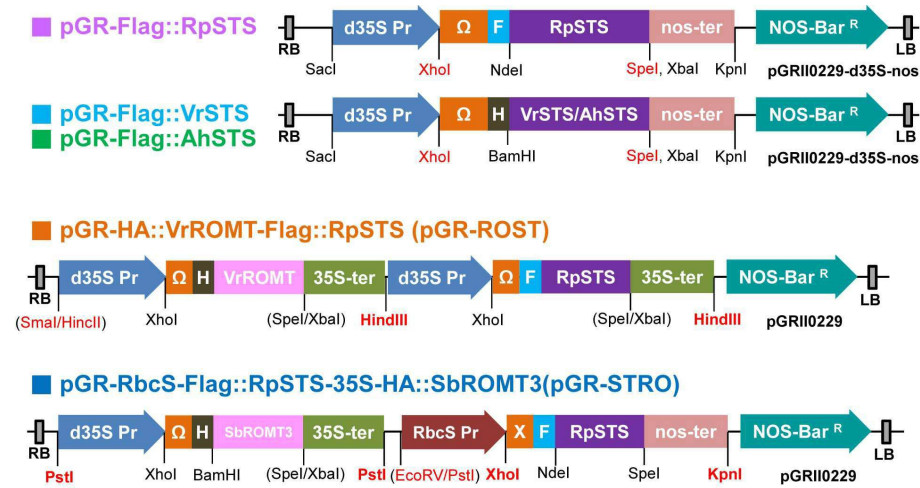
[0054] 상기 실시예 7에서 선발된 각각의 형질전환된 담배 식물체의 잎 디스크를 채취하여 메탄올에 넣고 60℃에서 45분간 끓여 추출물을 얻었다. 잎 시료와 메탄올의 비율은 잎의 건조 중량 25~30mg/mL이 되도록 하였다. 추출한 여액은 공기를 주입하여 건조시키고 건조물을 10mg/ml이 되도록 다시 메탄올에 녹이고 0.2um PTFE 필터 (hydrophilic, ADVANTEC, 일본)하여 HPLC(High-performance liquid chromatography) 분석에 이용하였다. HPLC는 agilent technology 1200 series를 사용하여 분석하였다. 펌프 시스템은 quaternary pump를 사용하였으며 컬럼은 agilent사의 ZORBAX SB-18 (5mm, 4.6 X 150mm)을 사용하였으며 이동상은 물 (A, 0.05% trifluoroacetic acid)과 아세트니트릴(B 0.05% trifluoroacetic acid)을 이용하여 기울기 용리를 이용하여 분석하였다. 분석결과 형질전환된 담배 식물체 추출액에서 미량의 레스베라트롤이 검출되었다(도 8).

도면

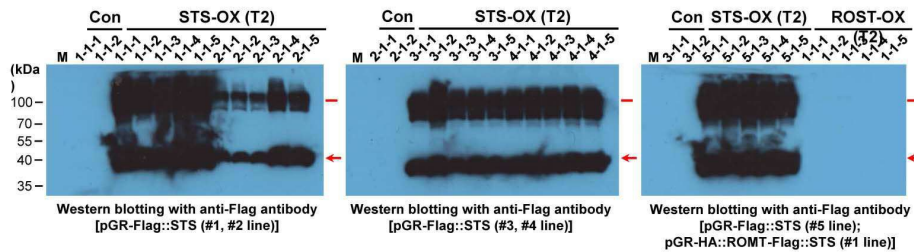
도면1



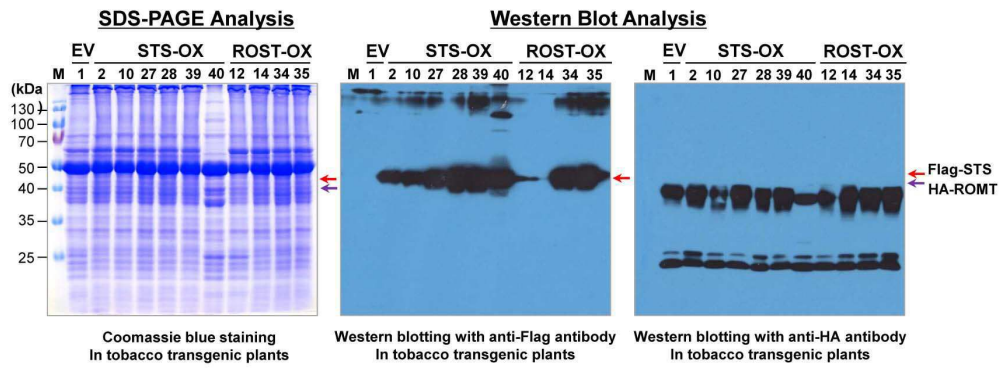
도면2



도면3



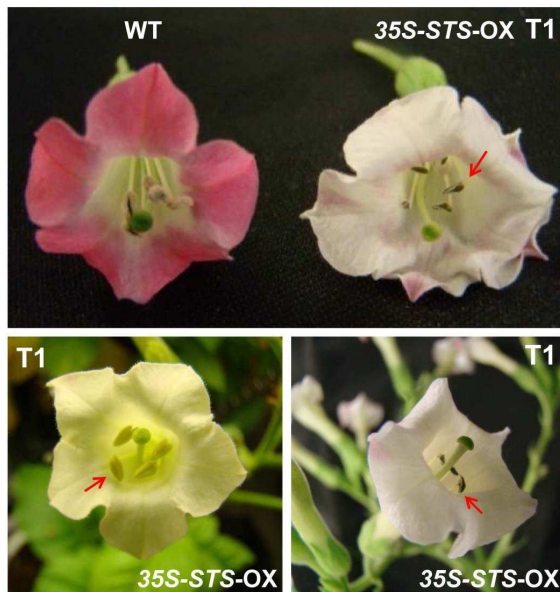
도면4



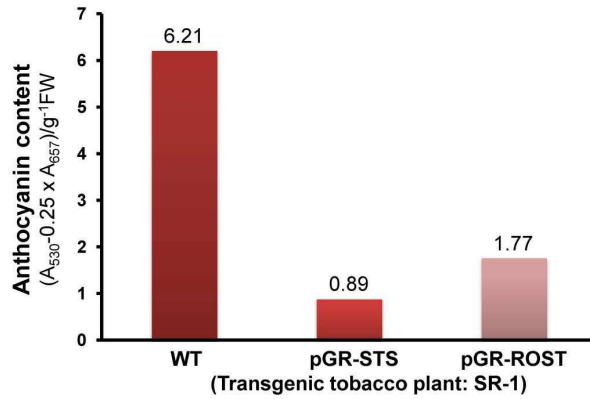
도면5



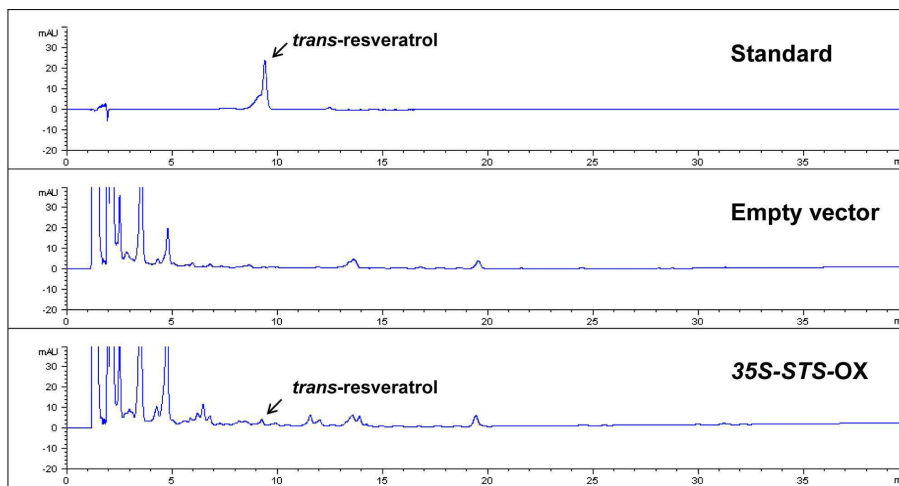
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Method for increasing stilbene content and changing flower color
in plant using ROMT and STS gene
- <130> PN12219
- <160> 9
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1074
- <212> DNA
- <213> Vitis riparia
- <400> 1

atggatttgg caaacggtgt gatatcagct gagctgcttc atgctcaagc tcatgtctgg

60

aaccatata tcaacttcat caagtctatg tcaactaaat gtgctactca actaggcatc 120
ccagacatca tccacaacca tggcaagccc atgactcttc ctgagctggt cgctaagctc 180

ccagtccacc ctaaaaggag tcagtgcgtg taccgtctca tgcgcattct tgttcattct 240
ggcttccttg ctgcgcaaaag agttcaaca ggtgaggaag aagaggggta tgtgcttaca 300
gatgcctcta ggctccttct aatggatgac tccttgagca taaggcctt ggtgcttgcc 360
atgctcgacc caattttaac taaacatgg cattatctga gtgcttggt tcaaatgat 420
gatcccactc cgttccacac tgcttatgag cggccatttt gggattatgc cggccatgaa 480
cctcagctca acaattcctt caatgaagcc atggctagcg atgctcgctt actcaccage 540
gtgctgatta aggagggcaa gggcgtattt gcggggttga actcattagt tgatgtaggg 600

ggtggcaccg gaaaagtggc caaggccatt gctaacgctt tcccacattt gaactgcacc 660
gtgttagatc tccccacgt ggttgctggc ttgcaaggga gcaagaactt gaactacttt 720
gcaggtgata tgtttgaggc aattcctcct gcagatgcaa ttttactcaa gtggatactg 780
cacgactgga gcgatgaaga atgctgaag atactaaagc gatgcaggga agcaattccg 840
agcaaggaaa acggaggaaa ggtgattatc atagacatga tcatgatgaa gaatcaagga 900
gactacaagt ccatagaaac acagctgttc tttgatatga cgatgacgat tttcgccccg 960
ggtagagaga gggacgagaa cgaatgggag aagctattct tggatgctgg tttcagtcac 1020

tacaagataa ctcccatttt gggtttgagg tccctcattg aggtttatcc ttga 1074

<210> 2
<211> 1125
<212> DNA
<213> Sorghum bicolor
<400> 2

atggtactca tcagcgagga cagtaggag ttgctccaag cccacgtcga gctatggaac 60
cagacctaca gctttatgaa gtcggtggcg ctgcccgttg ctttagacct ccgcatcgt 120
gatgccatcc accgctgagg tggcgccc accctctccc agatactcgg agagattggt 180
gtccgccc atgaaactcc cgccctccac cgccaatgc gtgttctgac cgtctcagga 240
accttcacca tegtccagcc atcagcggca accatgtcat tgggtgcgga cgggaatgag 300

cttgtctata agctgacaac agcgtcccgc ctctctgca gcagcgaaag ctcgcgacg 360
gcgagcttgt ctctatgct gaaccacgtg cttagcccct tccgtgactc gccctcagc 420
atggggctca ctgctggtt ccggcacgat gaagatgaac aggcgctgg cccatgcccg 480
ttcaccctga tgtacggcac aaccttggg gaggtgtgca gtcgtgacga cgcaatcaac 540

gcgttggtca acaacgccat ggccgcagac agcaacttcc tgatgcagat tgtgttgagg 600
gagttcggca aggtcttcca cgggatagac tcgctggctg acgtcggcgg tggggttggg 660
ggagccacca tggccattgc cacggcgttc ccgtcttga agtgtaccgt actagacctc 720

cctcacgttg tcgccaaggc tccgtccagt tctattggca acgtgcagtt tgttgggggt 780
gacatgtttg agagcattcc accagcgaat gttgtcttcc tcaagtggat tttgcatgac 840
tggagcaatg acgagtgtat caagatatta aagaactgca agcaagctat cccttctaga 900
gatgcaggag gaaagataat aatcattgat gttgtggttg ggtctgagtc atcagacacc 960
aagcttctgg agacacaagt aatgtatgat ctccatctca tgaaaattgg tggggtttaa 1020
cgagatgagc aagagtggaa gaaaatatc ctccaagctg gatttaagga ctacaatatt 1080
ataccagttt taggcctccg atcgatcatt gagctatatac catga 1125

<210> 3
<211> 1176
<212> DNA
<213> Rheum palmatum
<400> 3

atggcaccgg aggagtcgaa gcatgctgaa actgctaaca gagccactgc caccgctctg 60
gccatcggca ctgccaaccc tccaaactgc tactaccagg ccgactttcc cgacttctac 120
ttccgtgtca ccaacagcga ccacctcag cacctcaaga ataaattcaa gagcatttgt 180
gagaggtcga agattgagaa acgttacctc cacttgacgg aagaaattct caaggagaat 240
ccgaatatg cttctacga ggcgccatca ttagatgtaa gacaaaacat tcaagtgaaa 300
gaagtgggta agctcgggaa agaggcagct ttgaaggcca tcaatgagtg gggccaaccc 360

aagicaaaga tcacgcacct cattgtgtgt tgtattgcag gcgttgacat gcccggcgca 420
gaciatcaac ttactaaagt tcttggctta caactctctg ttaagcggtt tatgttttac 480
cacctaggat gctatgccgg tggcaccgtc ctttgccttg caaaggacat agcagagAAC 540
aacaaggag ctcgtgttct catcgtttgc tctgagatga cgccaatctg tttccgtggg 600
ccatccgaaa cccacataga ctccatggta gggcaagcaa tatttgggta cgggtgctcg 660
gctgtcatag ttggtgcaca tccggacctc tccatcgaaa ggecgatttt cgagttgatt 720
tcaacatccc aaactatcat acctgaatcc gacggtgcga ttgagggaca tttgcttgaa 780

gttggactca gtttccatct ccaccagacc gtteccat taatctctaa ttctatccaa 840
acttgtcttt caaaggcttt cacacctctt aacattagtg attggaactc gctattctgg 900
attgcacacc ctggtggcgg tgctatcctt gacgatattg aggctactgt aggtctcaag 960

aaggagaac ttatggcaac aagacaagtt ttgaacgatt atgggaacat gtcaagtgt 1020
 tgcgtatfff tcatcatgga tgagatgagg aagaagtcga ttgcaaacgg tcaagtaacc 1080
 actggagaag gactcaagtg ggggtttctt tttgggttcg gcccaggtgt tactgtggaa 1140
 actgtggttc tacacagtgt gccgctaatt acctga 1176

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

catatggcac cggaggagt 19

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

actagttcag gtaattagcg gc 22

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

catatggatt tggcaaacg 19

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

actagttcaa ggataaacct caa 23

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

catatggtac tcatcagcga ggacagt

27

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

actagtcatg gatatagctc aatgatgat c

31