



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월20일

(11) 등록번호 10-1521434

(24) 등록일자 2015년05월13일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A01H 5/00</i> (2006.01) <i>C12N 15/31</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/82</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-0108982</p> <p>(22) 출원일자 2012년09월28일
 심사청구일자 2013년07월22일</p> <p>(65) 공개번호 10-2014-0042339</p> <p>(43) 공개일자 2014년04월07일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
 JP2006505279 A
 Plant Physiology February, 131권, 2호,
 516-524쪽(2003년)
 Trends in plant science, 8권, 8호, 355-357
 쪽(2003년)</p> | <p>(73) 특허권자
 한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)</p> <p>(72) 발명자
 유장렬
 대전광역시 유성구 과학로 125</p> <p>민성란
 대전광역시 유성구 과학로 125
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 최규환</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 2 항

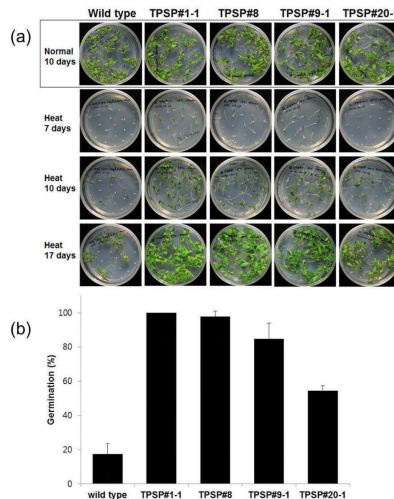
심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 **대장균 유래 TPSP 유전자를 이용한 고온 스트레스 내성 형질전환 식물체의 제조방법 및 그에 따른 식물체**

(57) 요약

본 발명은 대장균 유래 TPSP (trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 고온 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조 방법 및 상기 제조 방법에 의해 제조된 생육저해 현상이나 형태적 변형없이 고온 스트레스에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체에 관한 것으로, 본 발명의 TPSP 과발현 형질전환 식물체는 고온 스트레스 환경에서 생산성 향상과 수확량 증대에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

유재일

대전광역시 유성구 과학로 125

박지현

대전광역시 유성구 과학로 125

오광훈

대전광역시 유성구 과학로 125

정원중

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 D10401212H3200001E0

부처명 국토해양부(해양수산부)

연구관리전문기관 해양극한생물분자유전체연구단

연구사업명 해양생명공학사업

연구과제명 해양성 남세균 유전체정보 기반 식물분자육종 실용화 연구

기여율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 대장균 유래 TPSP (trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 토마토 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 토마토 식물의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 대장균 유래 TPSP (trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는, 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 토마토 식물의 고온 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 대장균 유래 TPSP 유전자를 이용한 고온 스트레스 내성 형질전환 식물체의 제조방법 및 그에 따른 식물체에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 대장균 유래 TPSP (trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 식물의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 방법, 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 고온 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 제조 방법에 의해 제조된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 대장균 유래 TPSP 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는, 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 식물의 고온 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 트레할로스(Trehalose)는 수분결핍조건에서 세포에 건조 내성을 부여하여 세포막과 단백질을 보호하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 이런 기능이 최초로 보고된 식물은 미로탐너스 플라벨리폴리우스(*Myrothamnus flabellifolius*), 셀라기넬라 레피도필라(*Selaginella lepidophylla*)와 같은 사막에서 자생하는 식물에서 확인되었고, 일반적인 고등식물에서는 함유량이 매우 미량으로 존재한다.
- [0003] 미생물에서 트레할로스 생합성은 먼저 UDP-글루코스와 글루코스-6-포스페이트로부터 트레할로스-6-포스페이트 생합성 효소(TPS)에 의해 트레할로스-6-포스페이트가 합성되고, 다시 이 트레할로스-6-포스페이트는 트레할로스-6-포스페이트 포스파타아제(TPP)에 의해 트레할로스로 합성된다. 이 트레할로스 합성에 관여하는 TPS 및 TPP 2개의 유전자를 각각 담배, 애기장대, 토마토 등 식물체에 도입하여 비생물학적 스트레스 내성에 관한 연구가 그동안 여러 차례 보고 되었으며(Ge et al. 2008 Planta 228:191-201), TPS 또는 TPP 유전자를 각각 도입한 형질 전환체의 경우 건조 저항성을 나타내었지만 형질전환체의 생육 저해나 형태적인 변형을 초래하여 정상적인 생장이 이루어지지 않았다(Cortina and Culianez-Macia 2005 Plant Sci 169: 5-82).
- [0004] 현재까지 식물에서 보고된 트레할로스 관련 연구는 유전자 도입에 의한 식물 형질전환체의 염 또는 건조 스트레스에 관한 내용이 대부분이며, 온도 스트레스에 관한 보고는 최근 벼 형질전환체에서 저온 스트레스 저항성이 보고되었다(Li et al. 2011 Planta 234: 1007-1018). 하지만 트레할로스 관련 유전자 도입 식물 형질전환체의 고온 저항성에 대한 연구는 미비한 실정이다. 반면, 미생물에서는 고온 스트레스 상태에서의 트레할로스의 기능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Salmer et al. 2011 Arch Microbiol 193:701-709).
- [0005] 쌍떡잎 식물인 오이에 TPSP 융합 유전자를 도입하여 식물체 특성을 관찰한 결과 트레할로스 축적은 3.8배 증가하였으나 형태적인 변형에 의해 세대 진전에 실패하였다(Kim et al. 2010 J Plant Biotechnol 37:72-76).
- [0006] 한편, 한국등록특허 제0440725호에서는 '비생물성 스트레스에 대한 단자엽 식물의 내성을 증가시키는 방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2009-0053454호에서는 'TPSP 단백질을 생산하는 딸기 식물체의 제조 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 딸기 식물체'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 대장균 유래 TPSP 유전자를 이용한 고온 스트레스 내성 형질전환 식물체의 제조방법 및 그에 따른 식물체에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 트레할로스 합성에 관여하는 대장균 유래의 TPSP 융합 유전자를 토마토에 핵 형질전환하여 T2 세대의 형질전환 토마토 종자에 수침상태에서 55℃ 고온처리 후 25℃ 생육조건에서 발아율을 관찰한 결과, 야생형 토마토(17%)에 비해 형질전환 토마토 종자(54% - 100%)의 발아율이 월등히 향상됨을 확인하였고, 고온처리시 열(heat) 관련 유전자의 발현 패턴 변화를 관찰한 결과, 열 충격 전사인자(HsfA1 및 HsfA2)의 발현량 증대와 열 충격 단백질의 발현이 증대됨을 확인하였다. 이를 통해 트레할로스가 열 관련 유전자의 발현에 관여하는 신호 전달 물질로서 작용하여 고온에 대한 내열성 증대를 가져왔을 것으로 판단되며, 본 발명의 트레할로스 합성 관련 유전자 TPSP 과발현체는 고온 스트레스에 매우 강한 저항성을 나타내어 신규 내재해성 유용 유전자로서의 활용성을 입증함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 대장균 유래 TPSP (trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 식물의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 고온 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 의해 제조된 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 고온 스트레스에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 대장균 유래 TPSP 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는, 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 식물의 고온 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에서는 짙은 식물이며, 주요작물 중 하나인 토마토에 TPSP 융합 유전자를 핵 형질전환을 통해 토마토에 도입하였을 때 생육저해 현상이나 형태적 변형없이 정상적으로 성장, 결실하는 것을 확인하였고, 형질전환 토마토 종자에 고온 처리하였을 때 종자 활력 및 발아율이 향상됨을 확인하였다. 이들 통해, 본 발명의 TPSP 과 발현 형질전환 토마토는 고온 스트레스 환경에서 생산성 향상과 수확량 증대에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 TPSP 형질전환 토마토 식물체에서의 TPSP 유전자의 삽입 및 발현을 조사한 결과이다. (a) pHc21::TPSP 형질전환 토마토 식물체의 서던블롯 분석, (B) pHc21::TPSP 형질전환 토마토 식물체의 TPSP 유전자의 전사체 레벨

도 2는 야생형 종자 및 pHc21::TPSP 형질전환 토마토 식물체 종자의 수침상태에서 고온 처리 후 발아율을 나타낸다. 마른 종자를 55℃에서 150분 침수시킨 후, 멸균하여 25℃, MS 염 고체 배지에서 발아시켰다. (a) 55℃에서 150분 침수시킨 후, 25℃에서 17일 후 사진, (b) 야생형 및 pHc21::TPSP 형질전환 식물체의 10일째 발아율. 종자 발아는 유근 끝이 완전히 종자피를 관통했을 때 계수되었다.

도 3은 고온처리 시 트레할로스 첨가에 따른 야생형 종자의 발아율 변화를 나타낸다. 야생형 종자는 25℃, 1시간 동안 트레할로스 용액(0.1 mM, 1 mM 및 10 mM)에 담귀 수침 동안 고온 처리하였다. (a) 55℃에서 150분 침수시킨 후, 25℃에서 17일 후 사진, (b) 야생형 및 트레할로스를 첨가한 야생형 종자의 10일째 발아율. 종자 발아는 유근 끝이 완전히 종자피를 관통했을 때 계수되었다.

도 4는 야생형 및 pHc21::TPSP 형질전환 토마토 식물체에 55℃, 30분 고온 처리시 Hsf(heat shock transcription factor), Hsp(heat shock protein) 및 스트레스 관련 유전자의 전사체 발현 레벨을 나타낸다. (a) Hsf (HsfA1, HsfA2, HsfA3, 및 HsfB1) 유전자의 상대적 발현 레벨 (b) Hsp [Hsp17.8, Hsp21, Hsp70, Hsp100, 소포체 작은 Hsp (er-sHsp), 및 미토콘드리아 작은 Hsp (MTsHp)]의 상대적 발현 레벨, (c) 스트레스 유도 유전자(bZIP, DREB2, TAS14)의 상대적 발현 레벨.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 대장균 유래 TPSP (trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 식물의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0015] 상기 TPSP 유전자는 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 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 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0016] 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 수단에 의해 세포내 재도입된 것이다.

[0017] 본 발명에서, 상기 TPSP 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.

[0018] TPSP 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 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.

[0019] 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.

[0020] 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.

[0021] 본 발명의 재조합 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS, 히스톤 프로모터, Clp 프로모터일 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.

[0022] 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 옥토판인(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.

[0023] 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.

[0024] 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.

[0025] 또한, 본 발명은 대장균 유래 TPSP (trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 고온 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 TPSP 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 식물체는 바람직하게는 쌍자엽 식물일 수 있고, 가장 바람직하게는 토마토일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 의해 매개될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세

포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에서 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 당업계에서 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0030] 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 의해 제조된 생육저해 현상이나 형태적 변형없이 고온 스트레스에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0031] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 식물은 바람직하게는 쌍자엽 식물일 수 있고, 더욱 바람직하게는 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 썩갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갓무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두일 수 있고, 가장 바람직하게는 토마토일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 대장균 유래 TPSP (trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는, 생육저해 현상이나 형태적 변형 없이 식물의 고온 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 대장균 유래 TPSP 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 포함하며, 상기 유전자를 식물체에서 과발현시킴으로써 식물의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시킬 수 있는 것이다.

[0033] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0034] **재료 및 방법**

[0035] **식물재료**

[0036] 본 발명에서는 핵 형질전환을 통해 획득된 TPSP 형질전환 방울토마토 (*Solanum lycopersicum* cv. Joyful) T2 세대 종자를 가지고 실험을 수행하였다.

[0037] **핵 형질전환체 분석**

[0038] 핵 형질전환체의 유전자 도입, 발현 분석을 위한 서던 및 노던블롯 분석을 수행하였다. 토양 순화된 식물체의 잎에서 Dellaporta 등(Dellaporta et al. 1983 Plant Mol Biol Rep 1:19-22)의 방법에 따라 게놈 DNA를 추출하였고, 추출된 DNA 50 ug을 *Xba*I 제한효소로 절단하여 서던블롯 분석을 수행하였다. TPSP 특이 프라이머(정방향: 5'-gaa aat att ccg cta ctc tga c-3' : 서열번호 2), 역방향: 5'-gat act gag cga tga ctg tat g-3' : 서열번호 3)를 가지고 PCR을 수행한 후 약 700 bp 크기의 PCR 산물을 Random Primed DNA Labeling kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용하여 [α -³²P]dCTP로 라벨링하여 프로브로 사용하였다. TRIZOL 용액 (MRC, USA)을 이용하여 추출된 30 ug 총 RNA를 TPSP 프로브로 노던블롯으로 분석하였다.

[0039] **수침상태의 종자에 고온 처리 실험**

[0040] 고온처리 방법은 Li 등(2011 Planta 234: 1007-1018)의 방법으로 수행하였다. 야생종 토마토 종자와 TPSP 형질전환 토마토 종자를 페트리디쉬에 넣고, 수분을 유지한 상태에서 55℃에서 2시간 30분간 고온 처리를 하였다. 이때 수분 유지를 위해 Miracloth (CALBIOCHEM, USA)에 멸균수 3mL씩 첨가하고 종자를 감싸서 수침(imbibition) 상태를 유지하였다. 고온처리된 종자는 4% 차아염소산나트륨 용액에 10분간 처리한 후 멸균수에 4~5회 씻어 종자소독을 하였다. 종자소독이 완료된 야생종과 형질전환 토마토 종자를 MS 배지 (MS 기본염 + 3% 수크로스, 0.6% 피이토아가, pH 5.75)에 23립씩 치상하여 25℃ 배양실 (16 명/8 암)에서 발아율을 관찰하였다. 고온처리 실험은 각 형질전환체 라인별 5회 반복하여 수행하였다.

[0041] **수침상태의 야생종 종자에 트레할로스 물질 첨가 후 고온 처리 실험**

[0042] 고온처리 방법은 위 언급된 방법과 동일하게 수행하였고, 수침시 트레할로스 물질 처리구에는 멸균수 대신 트레할로스 0.1 mM, 1 mM, 그리고 10 mM이 첨가된 용액을 각각 3 mL씩 야생형 토마토 종자에 첨가하여 고온처리 실험을 수행하였다. 고온처리 후 실험과정 역시 위와 동일하게 하여 발아율 변화를 관찰하였다.

[0043] **발아율 조사**

[0044] 발아율 조사는 고온 처리 후 3일부터 17일까지의 기간 동안 관찰하여 유근이 정상적으로 3 mm 이상 발달한 경우만 발아된 것으로 간주하였다.

[0045] **실시간 PCR(real-time PCR) 분석**

[0046] RNA 추출은 트리졸 용액 (MRC, USA)을 이용하여 55°C 고온처리 후 야생종 토마토 종자와 형질전환 토마토 종자에서 추출하였다. 추출된 RNA에 *DNase I* (TaKaRa, Japan) 처리 후 cDNA 합성 키트 (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA를 1/4로 희석하여 실시간 PCR에 사용하였다. 분석에 이용된 프라이머 조합 및 유전자 정보는 표 1에 나타내었다.

표 1

본 발명에 사용된 실시간-PCR 프라이머

Primers	Sequence(5'-3'): 서열번호	Accession No.
HsfA1(LpHsf8)	F: TCAGACAACAGCAGCAATCC (4) R: CTCGTTTCTTGCTGCCTTC (5)	X67600
HsfA2(LpHsf30)	F: CTCTGCTGCAATGGACAATG (6) R: CCCATTTCAGGTGTTTTAC (7)	X67601
HsfA3	F: GCTCGTGTTCGGCAGATGAA (8) R: GCTGTCAAAGCATCCTGCAA (9)	NM_001247925
HsfB1(LpHsf24)	F: GTCCCAGTTCACGGACTTGT (10) R: GGGTTCCTTGGCTCATGATA (11)	X55347
Hsp17.8	F: GACTTCCGGAGAATGCAAAG (12) R: GCCCAAGCCATGACAGAAAA (13)	AF123256
Hsp21	F: AGGAAACAACCAAGGCACTG (14) R: CGTATTTCCCTGTTCTCTGA (15)	U66300
Hsp70	F: AACTGCAGCAGATGGGCAAAC (16) R: TACCGTTGGCGTCAATGTCGAACT (17)	NM_001246851
Hsp100/clpB	F: CAAGGACGCACAGTGAGTTT (18) R: TGCAGCATCCATCACCCTTT (19)	NM_001247214
er-sHsp	F: GCAGCAATCCGGCTAATACA (20) R: TTTCTTCCTCTCCGCTCA (21)	NM_001247671
MTSHP	F: AGCGTGAGCCAATTGCTGAA (22) R: GCCACCTCACATTCTCCTT (23)	NM_001246943
bZIP	F: CGTGAATCTGCAAGGCGGTC (24) R: GCTGCCAAGGCTCAAGCAAA (25)	AF176641
DREB2	F: TTTGCTACCCCGAAATGGC (26) R: CGGGTCGGGCAGTAAATGT (27)	AF500012
TAS14	F: CCCTGGGATGCATTGAACACC (28) R: GGCATGGCCCAATATACA (29)	U26423
SI_Actin	F: TCAGACAACAGCAGCAATCC (30) R: CTCGTTTCTTGCTGCCTTC (31)	AB199316

[0047]

[0048]

트레할로스 함량 분석

[0049]

T2 세대 형질전환 토마토 종자를 0.2g 채취하여 트레할로스 함량 분석에 이용하였다. 채취된 0.2g 토마토 종자를 액체 질소가 있는 상태에서 마쇄하여 2 mL 멸균수 첨가 후 100℃에서 15분간 가열하였다. 가열 후 원심분리하여 추출액을 분리하였고, 트레할로스 함량 측정은 HPAEC-PAD 시스템(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.

[0050]

실시에 1. 형질전환체 유전자 도입 및 발현 분석

[0051]

형질전환 식물체의 유전자 도입을 확인하기 위해 TPSP 프로브를 이용하여 서던블롯 분석을 수행하였다(도 1a). 형질전환체 #1-1, #8 라인의 경우 2 카피 이상 유전자가 도입되었으며, 형질전환체 #9-1, #20-1 라인의 경우 1 카피 유전자가 도입되었음을 확인하였다. 또한 도입된 유전자의 발현 분석을 위하여 노던 블롯 분석을 수행한 결과(도 1b), 1 카피 유전자가 도입된 #9-1, #20-1 라인의 TPSP 유전자 발현이 2 카피 유전자가 도입된 #1-1, #8 보다 높은 발현 수준을 보였다.

[0052] **실시예 2. TPSP 형질전환 토마토 종자의 고온처리 후 발아율 향상**

[0053] 수침 상태의 야생종 토마토 종자와 TPSP 형질전환 토마토 종자에 고온(55℃)을 2시간 30분간 처리 후 발아율의 변화를 관찰하였다(도 2a). 고온처리 후 7일 경과 시 형질전환 종자는 유근(radicle) 및 자엽(cotyledon)이 발생한 반면, 야생형 종자의 경우 유근만 발달하여 발아 속도에 차이를 보였고, 야생형 식물체에서는 발아된 개체 중 자엽과 본엽의 위치가 바뀐 형태적 변이를 보이는 개체들을 확인할 수 있었다(데이터 미제시). 고온 처리 후 10일 경과 시 발아율을 살펴보면, 야생형의 경우 17% 정도 발아된 반면, 형질전환체의 경우 #1-1 라인은 100% 발아하여 고온에 전혀 영향을 받지 않았고, #8, #9-1, #20-1 라인은 각각 97%, 84%, 54%로 야생형에 비해 월등히 높은 발아율을 보였다(도 2b).

[0054] 위와 같은 발아율의 차이가 기본적으로 보유한 종자 활력에서 오는 차이가 아닌지 검증하기 위해 정상적인 온도 조건 (25℃)에서 야생형 토마토 종자와 형질전환 토마토 종자를 치상하여 관찰한 결과(데이터 미제시), 야생형과 형질전환체간의 발아율 차이가 없는 것으로 보아 고온처리 시 형질전환 종자의 높은 발아율은 종자활력에 의한 차이가 아닌 TPSP 유전자의 형질전환으로 오는 효과임을 확인할 수 있었다.

[0055] **실시예 3. 고온처리 시 TPSP 형질전환체의 열(heat) 관련 유전자 발현 변화**

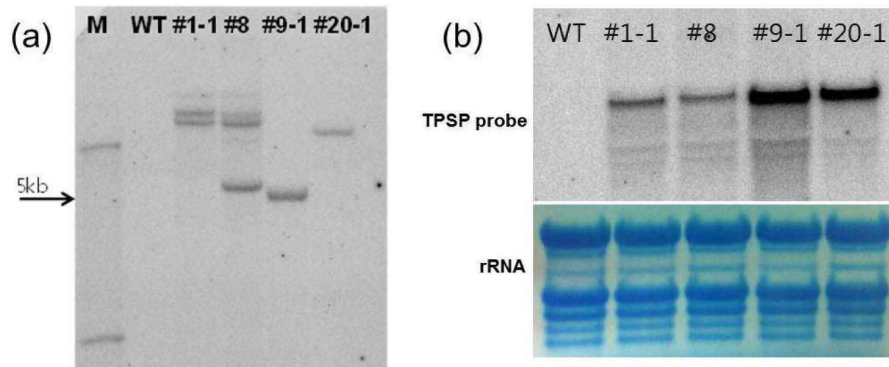
[0056] 본 발명에서는 TPSP 형질전환체의 내열성 증대의 결과가 고온조건 시 발현되는 HSP(heat shock protein)이나 HSF(heat shock transcription factor)의 발현에 관여하는 신호전달물질로서의 가능성을 확인하기 위하여 고온처리(55℃, 30분) 후 실시간-PCR 을 수행하여 관련 유전자들의 발현 양상을 관찰하였다(도 4). 우선 HSF의 발현 양상을 살펴보면(도 4a), 토마토의 주요 HSF인 HsfA1 및 HsfA2의 발현이 증대되었고, HsfA3 및 HsfB1의 경우 소폭 증대됨을 확인하였다. 특히 HsfA2 경우 야생형 종자에 비해 5~6배 정도 큰 폭으로 증대되었다. HSP의 발현은 총 6개 HSP를 관찰한 결과, Hsp17.8, er-sHsp 및 MtSHP인 3개의 Hsp 유전자의 발현이 크게 증대되었고, Hsp21, Hsp70 및 Hsp100 유전자의 경우 소폭 증대됨을 확인하였다. 특히 고온조건 시 발현되는 세포내 위치 (intercellular location)가 미토콘드리아로 동일한 er-sHsp와 MtSHP의 발현량이 최대 10배 이상 증대되는 것을 확인하였다. 또 한가지 특징으로 단백질 크기가 작은 열 충격 단백질(HSP)들의 발현량이 상대적으로 단백질 크기가 큰 유전자(Hsp70 및 Hsp100)에 비해 발현 증대가 더 높게 이뤄진 것을 확인할 수 있다(도 4b). 또한, 비생물적 스트레스 관련 유전자 중 디히드린(dehydrin) 관련 유전자인 DRE의 전사인자인 DREB2의 발현도 증가되는 것을 확인하였다(도 4c).

[0057] 인위적으로 트레할로스 첨가 후 고온처리에 있어 내열성이 증대됨을 확인하였고(도 3), 이 경우에도 TPSP 형질전환체에서와 마찬가지로 열 관련 유전자들의 발현량에 변화가 있는지를 살펴본 결과, 트레할로스 미처리구 (야생형)에 비해 열 관련 유전자의 발현이 증대됨을 역시 확인할 수 있었다. 다만 형질전환체의 경우 고온처리 30분 후 발현의 차이를 보이는 반면, 인위적인 트레할로스 첨가에 의한 발현량의 차이는 1시간 경과 후부터 차이를 보였다. 이 결과는 핵 형질전환 시 자주 발생하는 위치효과(position effect)에 의한 영향이 아닌 트레할로스 물질이 열 관련 유전자 발현에 관여함을 다시 한번 증명할 수 있다.

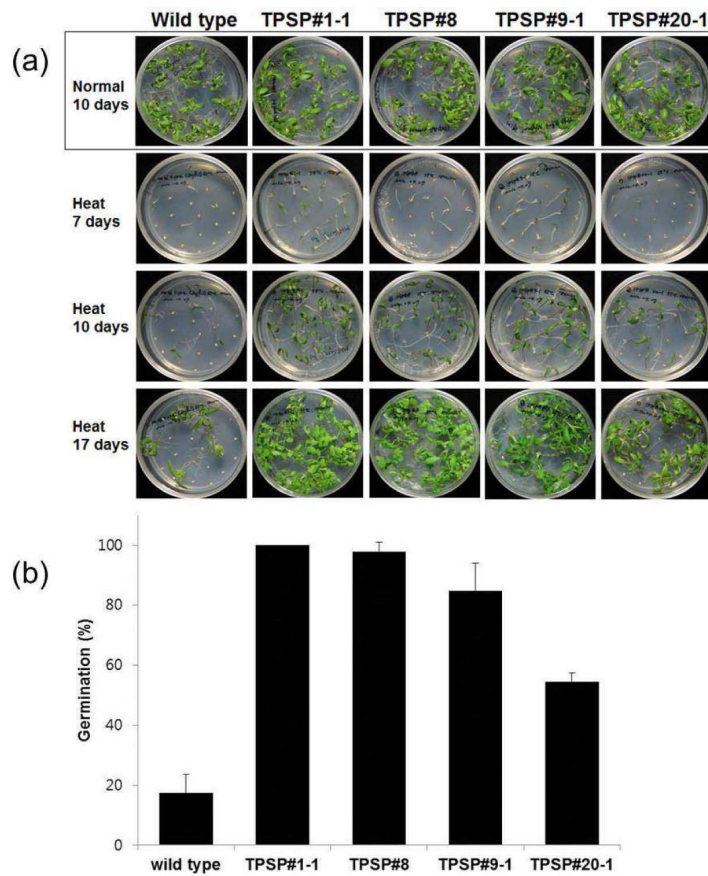
[0058] 본 발명에서는 고온 처리 후 TPSP 형질전환 토마토 종자의 발아율 향상 및 관련 유전자 발현 변화를 관찰하였다. 고온처리 시 발아율 향상은 트레할로스의 함량 증가에 따른 세포 및 세포막 보호 기능에 의한 내성 증가와 고온 시 발현되는 열 관련 유전자의 발현량 증대에 따른 것으로 판단된다. 열 관련 유전자의 발현량 증대는 TPSP 유전자가 열 관련 유전자의 조절자(regulator)로서 작용하였을 가능성도 있으나, 인위적인 트레할로스 첨가 시 야생종의 열 관련 유전자의 발현량이 증대 되는 것으로 보아 트레할로스가 열 관련 유전자의 신호전달물질로 작용하여 발현량을 증대시킨 것으로 판단된다.

도면

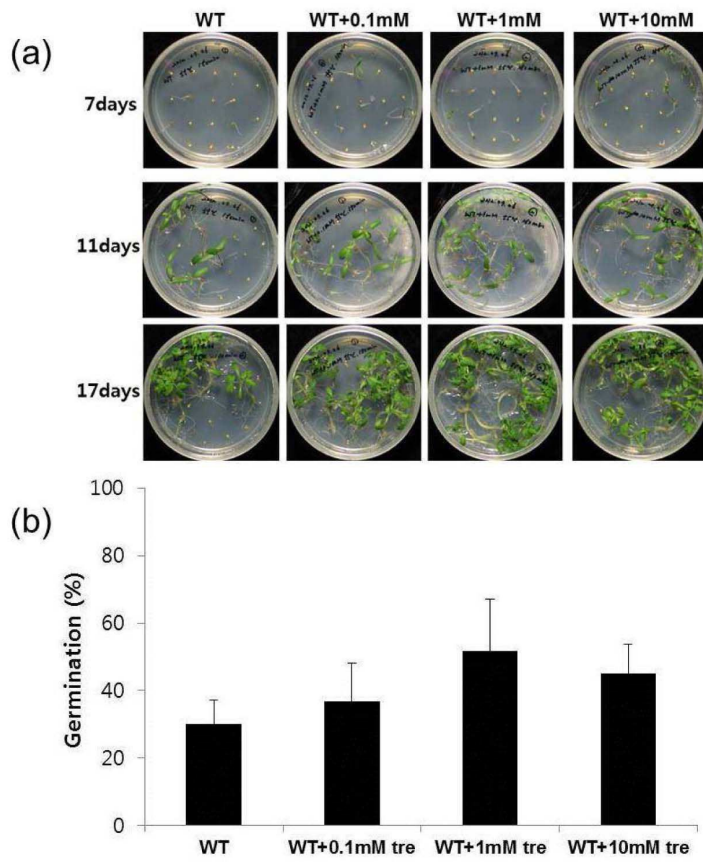
도면1



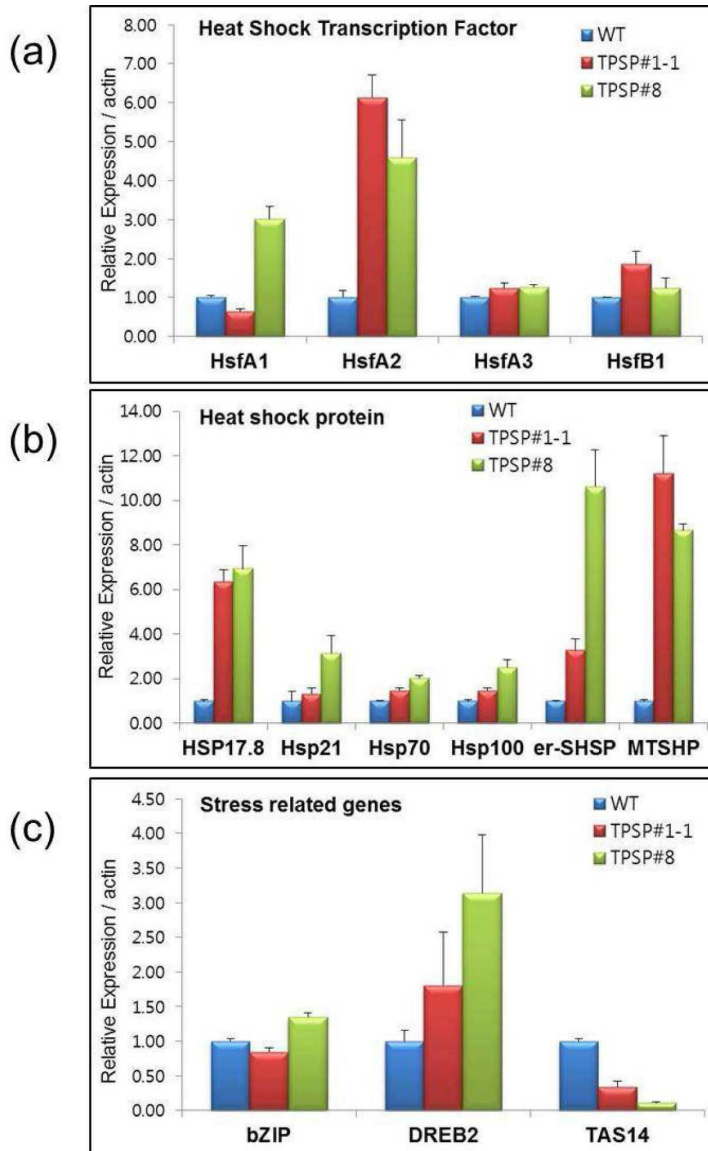
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Method for producing transgenic plant having resistance to high temperature stress using TPSP gene from Escherichia coli and the plant thereof
- <130> PN12216
- <160> 31
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 2241
- <212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

atgagtcggt tagtcgtagt atctaaccgg attgcaccac cagacgagca cgccgccagt	60
gccggtggcc ttgccgttgg catactgggg gcaactgaaag ccgacggcgg actgtggttt	120
ggctggagtg gtgaacacagg gaatgaggat cagccgctaa aaaaggtgaa aaaaggtaac	180
attacgtggg cctcttttaa cctcagcga caggaccttg acgaatacta caaccaattc	240
tccaatgccg ttctctggcc cgcttttcat tatcggtcgc atctgggtgca atttcagcgt	300
cctgcctggg acggctatct acgcgtaaat gcgttgctgg cagataaatt actgccgctg	360
ttgaagacg atgacattat ctggatccac gattatcacc tgttgccatt tgcgcatgaa	420
ttacgaaac ggggagtgaa taatcgctt ggtttctttc tgcataattcc tttcccgaca	480
ccgaaatct tcaacgcgct gccacatat gacacctgc ttgaacagct ttgtgattat	540
gatttgctgg gtttccagac agaaaacgat cgtctggcgt tcctggattg tctttctaac	600
ctgaccccg ctcacgacag tagcgcaaaa agccatacag cctggggcaa agcatttcga	660
acagaagtct acccgatcgg cattgaaccg aaagaaatag ccaaacaggc tgccgggcca	720
ctgccgcaa aactggcgca acttaagcg gaactgaaaa acgtacaaaa tatcttttct	780
gtcgaacggc tggattattc caaaggtttg ccagagcgtt ttctcgcta tgaagcgttg	840
ctggaaaaat atccgcagca tcatggtaaa attcgttata cccagattgc accaacgtcg	900
cgtggtgatg tgcaagccta tcaggatatt cgtcatcagc tcgaaaatga agctggacga	960
attaatggta aatacgggca attagcctgg acgccgcttt attatttgaa tcagcatttt	1020
gaccgtaaat tactgatgaa aatattccgc tactctgacg tgggcttagt gacgccactg	1080
cgtgacggga tgaacctggt agcaaaagag tatgttgctg ctcaggacce agccaatccg	1140
ggcgttcttg ttctttcgca atttgcggga gcgcaaacg agttaacgtc ggcgttaatt	1200
gttaaccctc acgatcgtga cgaagttgca gctgcgctgg atcgtgcatt gactatgtcg	1260
ctggcggaac gtattttccg tcatgcagaa atgctggacg ttatcgtgaa aaacgatatt	1320
aaccactggc aggagtgcct cattagcgat ctaaagcaga tagttccgcg aagcgcggaa	1380
agccagcagc gcgataaagt tgctaccttt ccaaagctag ggtcgagatc tgcagagctt	1440
atgacagaac cgtaaacga aaccctgaa ctatccgca aatatgcctg gttttttgat	1500
cttgatggaa cgctggcgga aatcaaaccg catcccgatc aggtcgtcgt gcctgacaat	1560
attctgcaag gactacagct actggcaacc gcaagtgatg gtgcattggc attgatatca	1620
gggcgctcaa tgggtggagct tgacgcaact gcaaaacctt atcgcttccc gttagcgggc	1680
gtgcatgggg cggagcgcgg tgacatcaat ggtaaaacac atatcgttca tctgccggat	1740

gcgattgcgc gtgatattag cgtgcaactg catacagtca tcgctcagta tcccggcgcg 1800

gagctggagg cgaaagggat ggcttttgcg ctgcattatc gtcaggctcc gcagcatgaa 1860

gacgcattaa tgacattagc gcaacgtatt actcagatct ggccacaaat ggcgttacag 1920

cagggaaagt gtgttgcga gatcaaaccg agaggtagca gtaaaggatga ggcaattgca 1980

gcttttatgc aggaagctcc ctttatcggg cgaacgcccg tatttctggg cgatgattta 2040

accgatgaat ctggcttcgc agtcgttaac cgactgggcg gaatgtcagt aaaaattggc 2100

acaggtgcaa ctcaggcatc atggcgactg gcgggtgtgc cggatgtctg gagctggctt 2160

gaaatgataa ccaccgatt acaacaaaaa agagaaaata acaggagtga tgactatgag 2220

tcgtttagtc gtagtatcta a 2241

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

gaaaatattc cgctactctg ac 22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

gatactgagc gatgactgta tg 22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

tcagacaaca gcagcaatcc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 cttcgtttct tgctgccttc 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 ctctgctgca atggacaatg 20
 <210> 7
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 ccccattcag gtgttttcac 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 gctcgtgttc ggcagatgaa 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 gctgtcaaag catcctgcaa 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 gtcccagttc acggacttgt 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 gggttccttg gctcatgata 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 gacttccgga gaatgcaaag 20

 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 gcccaagcca tgacagaaaa 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14

aggaacaac caaggcactg	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 15	
cgtatttccc ctgttctga	20
<210> 16	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 16	
aactgcagca gatgggcaaa ct	22
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 17	
taccgttggc gtcaatgtcg aact	24
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 18	
caaggacgca cagtgagttt	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 19
 tgcagcatcc atcacccttt 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 gcagcaatcc ggctaataca 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 tttcttcctc tctccgctca 20

 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 agcgtgagcc aattgctgaa 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 23
 gccaccttca cattctcctt 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 24
 cgtgaatctg caaggcggtc 20

<210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 25
 gctgccaagg ctcaagcaaa 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 26
 ttgctacc cggaatggc 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 27
 cgggtcgggg cagtaaatgt 20

<210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 28
 ccctgggatg cattgaacac c 21

<210> 29

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 29
 ggcatggccg ccaatatata 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 30
 tcagacaaca gcagcaatcc 20

 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 31
 cttcgtttct tgctgccttc 20