



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월05일  
(11) 등록번호 10-1515152  
(24) 등록일자 2015년04월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)  
C12N 15/82 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-0094180  
(22) 출원일자 2012년08월28일  
심사청구일자 2013년07월22일  
(65) 공개번호 10-2014-0028280  
(43) 공개일자 2014년03월10일  
(56) 선행기술조사문헌  
Phytochemistry 74 (2012) 69-78  
Appl Microbiol Biotechnol (2008) 79:819-828  
Plant Cell Physiol. 52(5): 909-921 (2011)
- (73) 특허권자  
한국생명공학연구원  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
- (72) 발명자  
곽상수  
대전광역시 유성구 과학로 125  
이행순  
대전광역시 유성구 과학로 125  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
최규환

전체 청구항 수 : 총 6 항

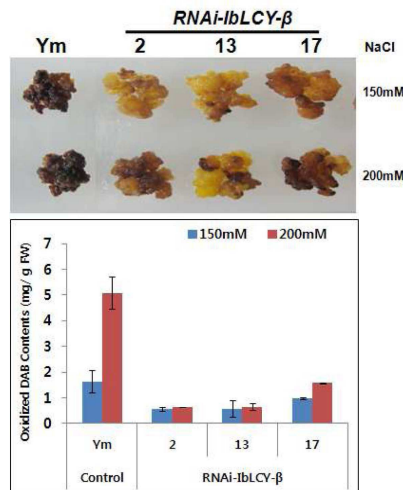
심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 **LCY-β 유전자를 이용한 환경 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법 및 그에 따른 식물체**

(57) 요약

본 발명은 고구마(*Ipomoea batatas*) 유래의 LCY-β (Lycopene-beta-cyclase) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성 및 카로티노이드 함량을 조절하는 방법, 상기 LCY-β 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 상기 LCY-β 유전자를 포함하는 식물체의 환경 스트레스 내성 조절용 조성물을 제공한다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

**김선하**

대전광역시 유성구 과학로 125

**정재철**

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008119

부처명 농림수산식품부(농림부)

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 고구마 카로티노이드 대사조절 및 색소 향산화물질 고효율 서류형질전환

기여율 1/2

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KCM3071211

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 기초기술연구회

연구사업명 주요사업(창의연구사업)

연구과제명 글로벌 식량안보 구축을 위한 고구마 향산화연구

기여율 1/2

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 고구마(*Ipomoea batatas*) 유래의 LCY-β(Lycopene-beta-cyclase) 단백질 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 LCY-β 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 단계를 포함하는 식물의 산화 스트레스 내성을 증가시키는 방법.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 고구마(*Ipomoea batatas*) 유래의 LCY-β(Lycopene-beta-cyclase) 단백질 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 LCY-β 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 산화 스트레스에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법.

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

제6항의 방법에 의해 제조된 산화 스트레스에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체.

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

제11항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

**청구항 14**

제11항에 따른 식물체의 종자.

**청구항 15**

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 고구마(*Ipomoea batatas*) 유래의 LCY-β (Lycopene-beta-cyclase) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는, 식물체의 산화 스트레스 내성 증가용 조성물.

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001]

본 발명은 LCY-β 유전자를 이용한 환경 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법 및 그에 따른 식물체에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고구마(*Ipomoea batatas*) 유래의 LCY-β (Lycopene-beta-cyclase) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성 및 카로티노이드 함량을 조절하는 방법, 상기 LCY-β 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 상기 LCY-β 유전자를 포함하는 식물체의 환경 스트레스 내성 조절용 조성물을 제공한다.

**배경기술**

[0002]

고구마(*Ipomoea batatas* L. Lam)는 비교적 척박한 땅에도 재배가 가능할 뿐만 아니라 헥타르당 생산량이 약 30 톤으로 식량과 가축사료로 이용되는 대표적인 뿌리작물이다. 자색, 황색 등의 유색고구마들은 다양한 항산화 물질을 포함하고 있는데, 특히 황색을 띠는 황색 고구마는 베타카로틴을 14.7 ~ 20 mg/100g 함유하며, 자색고구마는 안토시아닌을 2.28 g/100g 내외 함유하고 있어 세포의 노화를 촉진시키고 각종 성인병의 원인이 되는 활성산소를 제거하는 항산화 작용이 탁월하다. 또한 고구마는 1990년대 이후 아그로박테리움 공동배양을 통한 형질전환이 시도되었고, 정단 및 측아 분열조직으로부터 배발생 배양세포 유도 및 체세포배 발생을 통한 식물체 재분화 형질전환시스템을 발전시켜왔다 (Lim et al. Mol Breeding 19, 227-239, 2007). 그러나 아직 카로티노이드, 안토시아닌, 폴리페놀과 같은 저분자 항산화 물질을 고생산하는 고구마는 보고된 바 없다. 따라서 복합 스트레스 내성을 가지고 저분자 항산화 물질까지 고생산하는 작물 개발은 21세기 인류가 당면한 식량, 에너지, 환경문제를 해결하는데 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

[0003]

세계보건기구 (WHO)는 전 세계 1억 명 이상의 어린이들이 비타민 A의 부족으로 고생하고 있으며 이로 인해 매년 50만 명 이상의 어린이들이 실명하고 있다고 발표하였다. 베타카로틴은 비타민 A의 전구체로서 영양강화제, 식품보조제의 생리활성 기능을 가지고 있어 식품에서의 카로티노이드 축적에 관한 대사공학 연구는 영양학적 가치를 높이기 위한 필수 연구 대상이라 할 수 있다. 베타카로틴은 높은 항산화 활성을 가진 물질로서 생리활성 기능뿐 아니라 식물 자체의 산화 스트레스에 대한 방어 기작에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 최근 카로티노이드 생합성이 식물호르몬의 하나인 ABA에 의해 영향을 받는 것이 밝혀짐으로써, 이들 항산화 물질과 환경 스트레스에 대한 연구의 필요성이 대두 되었다.

[0004]

형질전환 식물체로부터 유용물질을 생산하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있으나 생산성이 낮아 상업화에 도달하지 못하였다. 따라서 고부가가치 생리활성물질을 보다 경제적으로 대량생산하기 위해 식물배양세포 및 식물체 자체를 이용하여 생산비를 낮추는 방법이 유용하게 이용될 것으로 사료된다. 또한 유용물질을 고생산하는 식물체를 개발하여 다시 식물배양세포를 유도하면 유용물질을 생산하고 대량생산까지의 시간이 적게 소요되며 배양세포의 스케일 업 배양이 용이하다. 또한 형질전환 식물체에서 발생할 수 있는 환경 위해성 문제를 배제할 수

있으며 생리활성 단백질 등 여러 가지 대상화합물에 폭넓게 적용 가능할 뿐만 아니라 의약품, 식품용도라도 미생물, 동물세포 배양에 비하여 거부감이 적다.

[0005] 고구마에서 가장 문제가 되는 것으로 알려진 검은 무늬병은 흑반병이라고도 하며 묘, 줄기 및 괴근에 발생한다. 묘에서는 어린 줄기의 지상부에서 검은 반점으로 나타나고, 이 반점이 확대되어 줄기를 둘러싸게 되면 잎이 누렇게 변하게 된다. 본포에서는 묘의 이식 직후부터 발생하며, 생육기 중에 줄기의 지하부에 검은 반점으로 나타난다. 병든 부위는 마른 상태로 썩으며, 씹어 보면 매우 쓴맛이 나는 이포메아마론(ipomeamarone)이라는 독성이 있다. 병든 괴근을 가축의 사료로 쓰게 되면 식욕 감퇴, 호흡장애, 눈의 충혈, 설사 등의 중독증세를 일으키는 것으로 알려져 있다. 고구마 검은 무늬병의 원인균(*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst)은 진균계의 자낭균문에 속하며, 자낭포자와 분생포자 및 후막포자를 형성한다. 따라서 방제가 매우 어렵고 고구마 저장에 있어서 큰 피해를 주는 것으로 알려져 있다 (Clark, C. A. et al. Compendium of sweet potato diseases. APS press, The American Phytopathological Society, 1988).

[0006] 한편, 한국등록특허 제1134004호에서는 식물의 베타카로틴 함량을 증가시키는 라이코펜  $\epsilon$ -사이클라아제 유전자 및 이의 용도가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2011-0052865호에서는 식물의 베타카로틴 함량을 증가시키는 베타카로틴 히드록실라아제 유전자 및 이의 용도가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이, LCY- $\beta$  유전자를 이용한 환경 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법 및 그에 따른 식물체에 대해서는 개시된 바가 없다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 고구마 유래의 LCY- $\beta$ (Lycopene-beta-cyclase) 유전자의 발현을 조절하여 베타카로틴 함량을 선택적으로 높임으로써 기능성 활성물질의 생산을 증대시키고 항산화 활성 및 내염성이 증가된 식물체를 개발할 수 있게 하고, 또한 고구마 흑반병을 야기하는 원인균에 노출시킨 야생형 고구마의 경우, 상기 유전자 발현량이 현저히 증가하는 결과를 통해 상기 유전자 과발현시 고구마 흑반병 저항성을 증가시킬 수 있을 것으로 판단함으로써, 본 발명을 완성하였다.

**과제의 해결 수단**

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 고구마(*Ipomoea batatas*) 유래의 LCY- $\beta$  (Lycopene-beta-cyclase) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 LCY- $\beta$  유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 LCY- $\beta$  유전자를 포함하는 식물체의 환경 스트레스 내성 조절용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 고구마 유래의 LCY- $\beta$  단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 카로티노이드 함량을 조절하는 방법을 제공한다.

**발명의 효과**

[0013] 본 발명의 고구마 유래 LCY- $\beta$  단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 형질전환체는 유용 생리활성 물질인 베타카로틴의 함량을 선택적으로 증가시킬 뿐만 아니라 높은 항산화 활성을 보이는 것을 확인함으로써, 본 발명의 형질전환체는 고염과 같은 환경 스트레스에 내성이 강한 식물체 개발에 응용될 수 있을 것이다. 또한, LCY- $\beta$  단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시킨 형질전환체는 고구마 흑반병 내성이 증가될 수 있으므로, 질 좋은 고구마 생산 증가에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

**도면의 간단한 설명**

[0014] 도 1은 고구마 흑반병 처리시 LCY- $\beta$  유전자 발현을 분석한 결과이다.

도 2는 형질전환 캘러스들에서 라이코펜 베타-사이클라아제 RNAi 벡터의 도입 여부를 확인한 결과이다.

도 3은 백색 고구마 배양세포에 RNAi-IbLCY-β를 형질전환한 캘러스가 카로티노이드 함량의 증가로 인해 노란색의 표현형을 나타내는 결과이다. 형질전환 캘러스를 대상으로 RT-PCR을 통해 LCY-β 유전자의 발현을 조사한 결과이다.

도 4는 형질전환 캘러스를 대상으로 DPPH 라디칼 소거 활성 조사를 통한 저분자 항산화 활성을 분석한 결과이다.

도 5는 형질전환 캘러스에 150 mM 및 200 mM의 NaCl을 각각 처리한 후 표현형(A)을 살펴보고 산화된 DAB 함량(B)을 분석한 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고구마 유래의 LCY-β (Lycopene-beta-cyclase) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 고구마 유래의 LCY-β (Lycopene-beta-cyclase) 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 "환경 스트레스"란 식물체의 성장 또는 생산성을 저하시키는 외부적인 요인을 말하며 크게 생물학적 스트레스(biotic stress)와 비생물학적 스트레스(abiotic stress)로 대별된다. 생물학적 스트레스로는 대표적으로 병원균을 들 수 있으며 비생물학적 스트레스로는 고농도의 염, 건조, 저온, 고온 및 산화 스트레스 등이 포함된다. "환경 스트레스 내성"이란 상기와 같은 환경 스트레스에 의한 식물체의 성장 저하 또는 생산성의 저하가 억제되거나 지연되는 형질을 말한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 환경 스트레스는 진균, 염 또는 산화 스트레스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 상기 진균은 고구마 흑반병의 원인균일 수 있고, 바람직하게는 세라토시스티스 펄브리아타(*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 LCY-β 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시켜 항진균 활성을 증가시킬 수 있고, 상기 LCY-β 단백질을 코딩하는 유전자 발현을 억제시켜 식물의 염 또는 산화 스트레스 내성을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 상기 LCY-β 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.
- [0022] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 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 수단으로 인해 세포내 재도입된 것이다.
- [0023] 본 발명에서, 상기 LCY-β 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.
- [0024] LCY-β 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. 상

기 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.

[0025] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투메파시엔스와 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 게놈 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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmY1 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.

[0029] 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.

[0030] 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.

[0031] 또한, 본 발명은 고구마 유래 LCY-β 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명의 고구마 유래의 LCY-β(Lycopene-beta-cyclase) 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 환경 스트레스는 진균, 염 또는 산화 스트레스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 상기 진균은 고구마 흑반병의 원인균일 수 있고, 바람직하게는 세라토시스티스 펴브리아타(*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 LCY-β 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시켜 항진균 활성을 증가시킬 수 있고, 상기 LCY-β 단백질을 코딩하는 유전자 발현을 억제시켜 식물의 염 또는 산화 스트레스 내성을

증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0036] 바람직하게는, 상기 *LCY-β* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0037] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*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.
- [0038] 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.).
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [0040] 바람직하게는, 상기 형질전환 식물체 및 이의 종자는 환경 스트레스에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자이다.
- [0041] 상기 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쪽감, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물이며, 더욱 바람직하게는 고구마이다.
- [0042] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, *LCY-β* (Lycopene-beta-cyclase) 단백질 코딩 유전자를 포함하는, 식물체의 환경 스트레스 내성 조절용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 1의 염기서열로 이루어 *LCY-β* 유전자를 포함하며, 상기 유전자를 식물체에서 발현 저해시키거나 과발현시킴으로써 식물체의 환경 스트레스 내성을 증가시킬 수 있는 것이다.
- [0043] 또한, 본 발명은 고구마(*Ipomoea batatas* L. Lam) 유래의 *LCY-β* (Lycopene-beta-cyclase) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 카로티노이드 함량을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 고구마 유래의 *LCY-β* (Lycopene-beta-cyclase) 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 고구마 유래 *LCY-β* 유전자 발현을 식물세포에서 저해시켜 식물의 카로티노이드 함량을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] **실시예 1: IbLCY-β 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석**

[0048] 고구마에서 IbLCY-β 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머를 제작하였고 프라이머 서열은 하기와 같다: 정방향 프라이머 (5'-gaattcatggatactttgctaaagac-3'; 서열번호 3) 및 역방향 프라이머 (5'-aagcttctacatacataatttcaaacc-3'; 서열번호 4). 이로부터 얻어진 전장 cDNA는 1506bp로서 501개의 아미노산을 암호화하고 있다. IbLCY-β 유전자의 효과적인 RNAi를 위하여 432bp의 부분 염기서열을 클로닝하기 위한 PCR 프라이머를 제작하였고, 이때 사용한 프라이머 서열은 하기와 같다: 정방향 프라이머 (5'-ggatccgttaaatcatcaagccaaggtt-3'; 서열번호 5) 및 역방향 프라이머 (5'-ctcgaggacgttgatacctaaagtccttaa-3'; 서열번호 6). 그 결과, 약 432bp의 PCR 산물을 얻어 pGEM-T-벡터에 클로닝한 후 시퀀싱을 통하여 염기서열을 확인하였다. 프라이머의 염기서열에는 Invitrogen의 게이트웨이 발현 시스템(gateway expression system)을 이용하기 위해 5' 말단에 어댑터 서열 (대문자로 표시)을 각각 추가하였다. 염기서열은 라이코펜 베타 사이클라아제 정방향 프라이머 (5'-CAAAAAGCAGGCTNnggatccgttaatttcatcaagccaaggtt-3'; 서열번호 7)와 역방향 프라이머 (5'-CAAGAAAGCTGGTnctcgaggacgttgatacctaaagtccttaa-3'; 서열번호 8)이다. 클론테크 사의 advantage2



polymerase를 이용하여 PCR을 수행하였고 기대한 크기의 PCR 산물을 pGEMeasy 클로닝 벡터(promega)를 이용하여 클로닝한 후 시퀀싱하여 염기서열을 확인하였다. 라이코펜 베타-사이클라아제 유전자의 부분 길이는 432bp의 cDNA가 144개의 아미노산을 코딩하고 있다.

[0049] **실시예 2. 고구마 흑반병(black rot) 균 처리에 대한 라이코펜 베타-사이클라아제의 발현 증가**

[0050] 신황미 고구마 잎에 흑반병을 일으키는 세라토시스티스 펄브리아타(*Ceratocystis fimbriata*) 곰팡이 균을 0, 12, 24 시간 처리한 후 병징이 나타난 잎에서 총 RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 *IbLCY-β* 유전자의 발현을 분석하였다. 그 결과 무처리에 비해 병원균의 처리에 따라 *IbLCY-β* 유전자의 발현이 현저히 증가함을 알 수 있었다(도 1).

[0051] **실시예 3. 고구마 라이코펜 베타-사이클라아제 유전자의 식물발현벡터 제작 및 형질전환체 개발**

[0052] 본 발명의 라이코펜 베타-사이클라아제 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 벡터를 제작하였다. 먼저 라이코펜 베타-사이클라아제 유전자가 클로닝되어 있는 pGEMeasy 벡터를 BP 반응시켜 pDONR207 벡터에 유전자를 클로닝하였다. 이후 pDONR207와 RNAi 벡터인 pH7GWIWG2(I)의 LR 반응으로 클로닝한 라이코펜 베타-사이클라아제 유전자의 RNAi 벡터를 제작하였다. RNAi 벡터를 아그로박테리움 매개로 율미(Ym) 캘러스에 형질전환하고 항생제 선별하였다. 형질전환한 캘러스를 대상으로 (주)인트론바이오테크놀로지사의 G-spinTMIp 게놈 DNA 추출 키트(식물용)를 이용하여 게놈 DNA를 추출한 후 유전자 특이적 프라이머를 가지고 PCR 분석하였다. 라이코펜 β-사이클라아제 RNAi 형질전환체의 경우 2, 3, 6, 11, 13, 17, 18, 33, 41번 형질전환 캘러스에서 PCR 산물을 확인하였다(도 2). 따라서 형질전환을 시도한 캘러스들에 라이코펜 베타-사이클라아제 RNAi 벡터가 도입되었음을 확인하였다.

[0053] **실시예 4. 라이코펜 베타-사이클라아제 유전자의 발현 억제로 인한 베타카로틴 함량 증가**

[0054] 라이코펜 β-사이클라아제 RNAi 형질전환체와 대조구인 율미 배양세포에서 카로티노이드 함량을 HPLC를 통해 분석하였다. 그 결과 α-branch pathway의 주요 카로티노이드인 알파카로틴과 루테인이 형질전환 배양세포에서 1.6~3.5배 이상 현저히 증가하였다. 또한 베타카로틴의 경우 형질전환 배양세포에서 2.3~3.3배 이상 증가하였다. 특히 전체 카로티노이드 함량의 경우 형질전환 배양세포가 대조구인 율미 배양세포보다 2.7~3.8 배 높은 함량을 보여 LCY-β 유전자 발현억제로 α-branch pathway의 주요 카로티노이드 함량 뿐만 아니라 전체 카로티노이드 함량도 현저히 증가하였음을 알 수 있었다(표 1).

표 1

Samples	$\alpha$ -Carotene	Lutein	13Z- $\beta$ -Carotene	$\beta$ -Carotene	9Z- $\beta$ -Carotene	Cryptoxanthin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Others	Total carotenoids
Ym	ND	2.8 ± 0.3	1.04 ± 0.12	4.4 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0	11.6 ± 0.6	4.3 ± 1.1	14.2 ± 1.9
#2	0.9 ± 0.1	3.7 ± 0.4	4.81 ± 0.15	6.1 ± 0.8	4.6 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0.8 ± 0.1	30.0 ± 1.8	15.2 ± 0.8	38.4 ± 2.7
#13	2.7 ± 1.9	7.0 ± 1.1	5.39 ± 0.50	8.8 ± 0.5	7.6 ± 1.0	4.3 ± 0.4	0.7 ± 0.0	17.8 ± 3.2	17.8 ± 1.7	54.3 ± 7.2
#17	1.4 ± 0.2	3.0 ± 0.4	5.23 ± 0.45	7.7 ± 0.3	5.2 ± 0.2	2.7 ± 0.3	1.3 ± 0.1	17.2 ± 0.8	17.6 ± 1.7	44.2 ± 3.7

[0055]

[0056]

**실시예 5. 형질전환 켈러스의 베타카로틴 함량 증가로 인한 항산화 활성 증가**

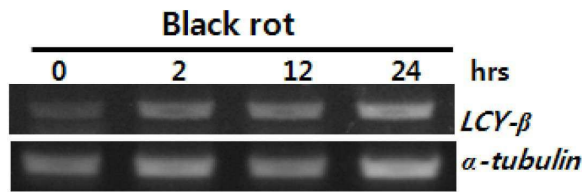
[0057]

본 발명의 라이코펜 베타-사이클라아제 유전자의 형질전환 켈러스를 대상으로 저분자 항산화 활성을 나타내는 DPPH 라디칼 소거 활성을 조사하였다. 베타카로틴이 항산화 활성이 높은 점에 착안하여 실제로 형질전환 켈러스가 베타카로틴의 함량 증가로 인한 항산화 활성이 높아졌는지를 확인하기 위해, 울미 켈러스와 형질전환 켈러스를 대상으로 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하여 저분자 항산화 활성을 분석하고 150 mM과 200 mM의 NaCl을 각각 처리한 후 항산화 활성을 비교하였다. 울미와 형질전환 켈러스를 100% 메탄올로 추출한 후 10 mM의 DPPH 용액에 30분간 반응시킨 후 남아있는 DPPH 양을 계산하여 저분자 항산화 활성을 측정하였으며 활성은 아스코브산에 상응하는 값으로 표현하였다. 그 결과 대조구인 울미보다 2-4 배 이상 활성이 높음을 확인하였고, 이는 베타카로틴 함량이 높은 신향미 품종의 활성과 비슷한 수준임을 알 수 있었다 (도 4). 따라서 본 발명의 베타카로틴 함

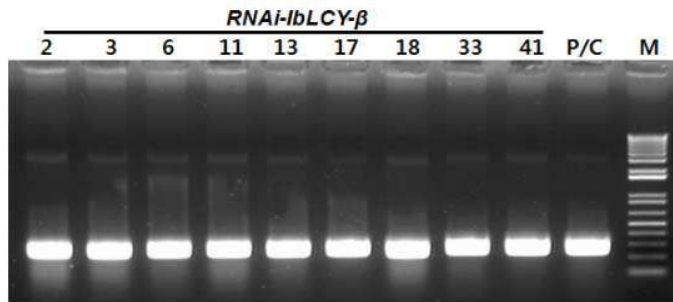
량이 증가된 형질전환체가 실제로 저분자 항산화 활성도 함께 증가되었음을 확인하였다. 또한 NaCl을 처리한 캘러스를 대상으로 활성 산소종과 반응하여 산화되면 갈변하는 DAB으로 염색한 후 표현형을 비교하였다. 그 결과 대조구인 율미 캘러스가 세포 내의 활성 산소종의 증가로 인한 DAB의 갈변이 형질전환 캘러스보다 훨씬 많이 진행됨을 확인할 수 있었다 (도 5). 구체적으로 산화된 DAB 양을 측정된 결과 전반적으로 150 mM의 NaCl 처리에서 보다 200 mM의 NaCl 처리에서 세포 내의 산화 스트레스에 의한 DAB의 산화도가 높았다. 또한 산화된 DAB의 양을 측정된 결과 대조구에 비해 1/2에서 1/5 이상으로 감소하였음을 확인할 수 있었다 (도 5). 따라서 라이코펜 베타-사이클라아제 유전자의 발현을 억제한 형질전환 캘러스가 베타카로틴의 함량이 증가하면서 항산화 활성이 증가하여 세포 내의 활성 산소종을 제거하는 능력이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

**도면**

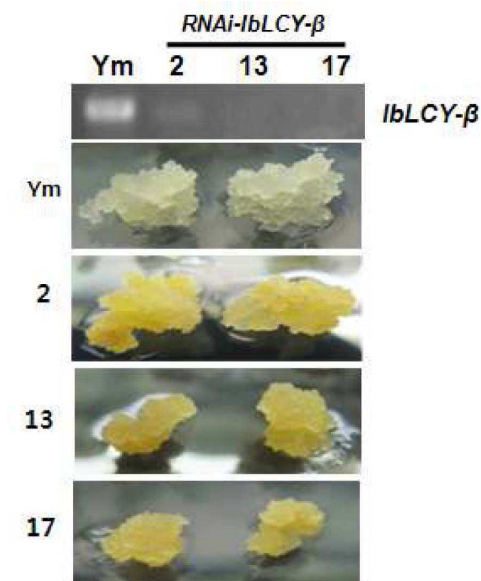
**도면1**



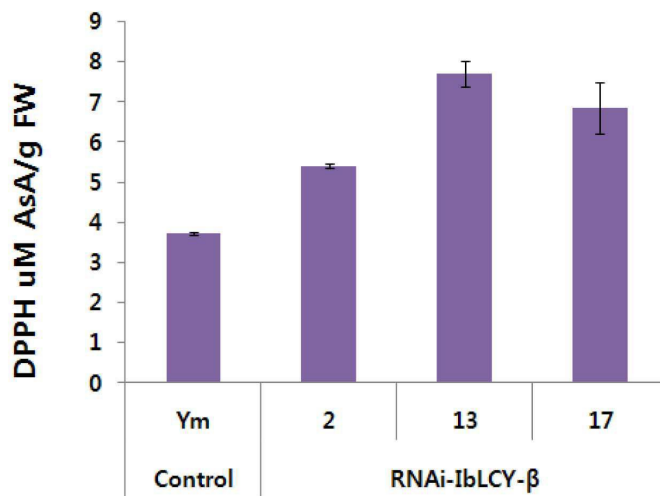
**도면2**



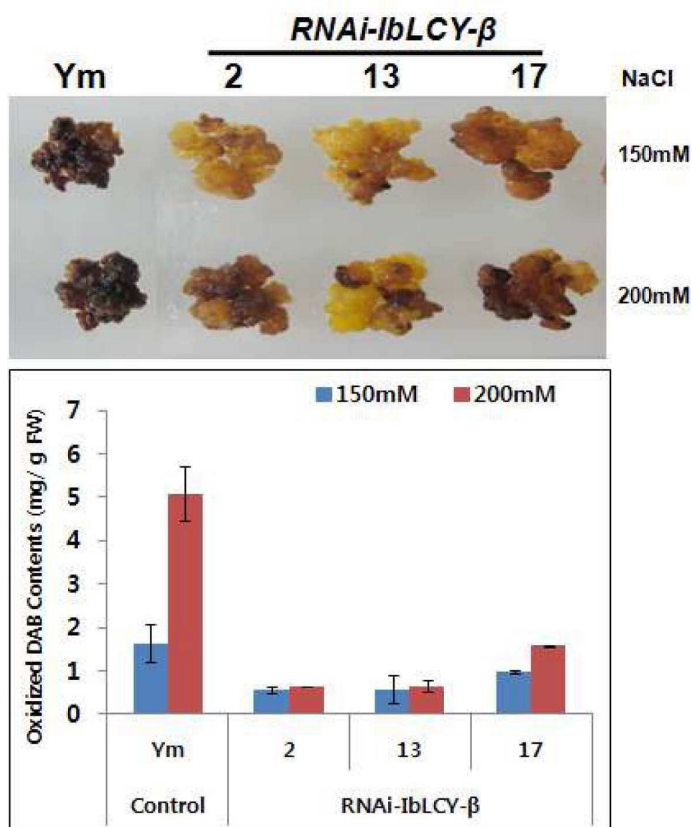
**도면3**



도면4



도면5



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Method for producing transgenic plant with increased resistance

to various environmental stresses using the LCY-beta gene and the plant thereof

<130> PN12185

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1506

<212> DNA

<213> Ipomoea batatas

<400> 1

```

atggatactt tgctaaagac ccctaagtag cttgaatttc tgcaccaca tcatgggttt      60
gcagttaaag ctagtgcctt tacctcctg aagcctcaa aacaggaat taggattggt      120

tcatggaac cttgcaggaa tgttggcctg gttaaggcca gcagtagtgc cctattagag      180
cttgtgcctg tgaccaagaa agagaatctt gattttgagc tccctatgtt tgaaccctct      240
aaagggattg ttgtggattt agctgtggtt gggggtggcc ctgctgggct tgcagtggca      300
cagcaggttt cacaagctgg gttatcagtt tgttcaattg acccctctcc caaattgatt      360
tggccaata attatggagt ttgggtgat gaattcgagg ccatggattt gttggattgc      420
ctcgatacca cgtggtctgg agctatggtg tatattgatg accgcacgac taaagatctt      480
gacaggcctt atgggctggg taacaggaag aaactcaaat cgaaaatgat gcagaaatgc      540

attgcaatg gtgtaagtt tcatcaagcc aagttataa aggtgatcca tgaagaatcg      600
aaatccatgt tgatttgag tgacggtgtg acgattcaag caactgtggt tcttgatgca      660
accggctttt ctagatgctt ggttcagtac gataagcctt ataaccggg ctatcaagtt      720
gcttatggca ttctggcaga agtggaggaa cacccttacg atttgaataa gatggttttc      780
atggatnggc gagactctca cctaacagt aacttggagc taaaggagag aaataaaaga      840
ateccgacct ttctttacgc catgccattt ttctcgaga ggatattcct tgaagaaacc      900
tactagtgg ctcgtcccgg cttagatatg aaggatattc aggaagaat ggtggctcgt      960

ttaaggcact taggtatcaa cgtcaagagc attgaagaag acgagcgttg tgttatcca      1020
atgggaggtc ccctaccctg gatacccaa cgagttgttg gaattggcgg tactgcaggt      1080
atggttcac cctcgaccgg atatatggtg gcgaggactc tggctgcagc tccggttgtt      1140
gccaacgcaa tcattcagta cctaggttcc gagagaagcc ttctgggcaa cgaattatca      1200
gcactctgtt ggaaagacct gtggccaata gagaggaggc ggcaaaggga attcttttgt      1260
tttggatgg atattctact gaagctcgat ttgccagcca caagaagatt tttgatgcg      1320

```

ttttttgatc tagaaccgccg ttattggcat ggatttctat catcccgctct gtttcttcgt 1380

gagctcatat tttttggctct ctcgcttttc tctcatgccca gtaatacttc taggttagag 1440

ataatgacca agggcacttt gcctctggta aacatgatca acaatttggtt acaggatata 1500

gattaa 1506

<210> 2

<211> 501

<212> PRT

<213> Ipomoea batatas

<400> 2

Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Glu Leu Glu Phe Leu His Pro

1 5 10 15

His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Ala Phe Thr Ser Leu Lys Pro

20 25 30

Gln Lys Gln Glu Ile Arg Ile Gly Ser Trp Lys Pro Cys Arg Asn Val

35 40 45

Gly Arg Val Lys Ala Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Val

50 55 60

Thr Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Phe Glu Pro Ser

65 70 75 80

Lys Gly Ile Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly

85 90 95

Leu Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Gln Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser

100 105 110

Ile Asp Pro Ser Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp

115 120 125

Val Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Thr Thr

130 135 140

Trp Ser Gly Ala Met Val Tyr Ile Asp Asp Arg Thr Thr Lys Asp Leu

145 150 155 160

Asp Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Lys Leu Lys Ser Lys Met

165 170 175

Met Gln Lys Cys Ile Ala Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val  
 180 185 190

Ile Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Ser Asp  
 195 200 205

Gly Val Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser  
 210 215 220

Arg Cys Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val  
 225 230 235 240

Ala Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Tyr Asp Leu Asn  
 245 250 255

Lys Met Val Phe Met Asp Xaa Arg Asp Ser His Leu Asn Ser Asn Leu  
 260 265 270

Glu Leu Lys Glu Arg Asn Lys Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met  
 275 280 285

Pro Phe Phe Ser Gln Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala  
 290 295 300

Arg Pro Gly Leu Asp Met Lys Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg  
 305 310 315 320

Leu Arg His Leu Gly Ile Asn Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu Arg  
 325 330 335

Cys Val Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Ile Pro Gln Arg Val  
 340 345 350

Val Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr  
 355 360 365

Met Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile  
 370 375 380

Ile Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser Leu Leu Gly Asn Glu Leu Ser  
 385 390 395 400

Ala Ser Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg  
 405 410 415

Glu Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro  
 420 425 430

Ala Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr  
 435 440 445

Trp His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Arg Glu Leu Ile Phe

450 455 460

Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Leu Glu  
 465 470 475 480

Ile Met Thr Lys Gly Thr Leu Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu  
 485 490 495

Leu Gln Asp Ile Asp  
 500

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

gaattcatgg atactttgct aaagac

26

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

aagcttctac atacataatt tcaaacc

27

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ggatccgtta aatttcatca agccaaggtt

30

<210> 6

<211> 30



<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 6  
 ctcgaggacg ttgataccta agtccttaa 30

<210> 7  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 7  
 caaaaaagca ggctnnggat ccgttaaatt tcatcaagcc aaggtt 46

<210> 8  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 8  
 caagaaagct gggtnctcga ggacgttgat acctaagtgc cttaa 45