(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0043394
(43) 공개일자 2019년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) *C12N 15/67* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/67 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0135403
(22) 출원일자 2017년10월18일
심사청구일자 2017년10월18일

(71) 출원인
대한민국(산림청 국립산림과학원장)
서울특별시 동대문구 회기로 57 (청량리동)
(72) 발명자
배은경
경기도 수원시 팔달구 화양로67번길 10, 103동 403호
최영임
경기도 수원시 영통구 청명로 132번길, 324동 601호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
조영신

전체 청구항 수 : 총 10 항

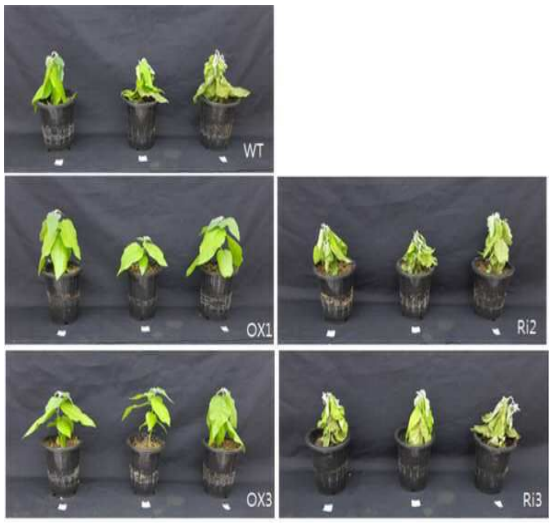
(54) 발명의 명칭 **식물체의 건조 스트레스 내성 증진 단백질, 이 단백질을 암호화하는 유전자 및 이 유전자로 형질전환된 식물체**

(57) 요 약

본 발명에서는 현사시나무 (*Populus alba*×*Populus glandulosa*) 유래의 식물체 건조 스트레스 내성을 증진하는 PagSAP5 단백질, 이 단백질을 암호화하는 내건성 유전자 및 이 유전자로 형질전환되어 건조 스트레스에 대한 내성이 증진된 식물체가 개시된다.

본 발명에 따른 PagSAP5 유전자/단백질은 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성에 관여하여, 이 유전자/단백질의 발현조절을 통해 수목 및 농작물 등의 개량에 유용하게 활용할 수 있고, PagSAP5 유전자로 형질전환된 식물체는 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 지구 온난화 등에 의한 기후변화로 야기된 건조한 환경에 바이오매스 생산성이 향상된 식물체로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도7a



(52) CPC특허분류
C12N 15/8273 (2013.01)
(72) 발명자
이효신
경기도 수원시 영통구 인계로 165번길, 523동 208호
최지원
서울특별시 서대문구 세무서2길 64, 101동 205호

명 세 서

청구범위

청구항 1

건조 스트레스 내성을 증진시키는 단백질을 암호화하는, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 PagSAP5 유전자.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 건조 스트레스 내성 증진 PagSAP5 단백질.

청구항 3

제 2항의 단백질을 암호화하는 유전자.

청구항 4

제 1항 또는 제 3항에 있어서, 상기 유전자는 현사시나무 (*Populus alba*×*Populus glandulosa*)에서 유래된 것인 유전자.

청구항 5

제 1항 또는 제 3항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6

제 5항의 재조합 벡터에 의해 형질전환되고 건조 스트레스 내성이 증진된 식물체.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 식물체는 수목류, 과수류, 채소 작물류, 특용 작물류, 화훼류, 및 사료 작물류로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인 식물체.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 수목류는 포플러인 것인 식물체.

청구항 9

식물체의 건조 스트레스 내성을 증진시키는 방법으로, 상기 방법은

(a) 제1항 또는 제 3항의 유전자를 식물체에 형질전환하는 단계; 및

(b) 상기 형질전환된 식물체에서 상기 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 식물체는 수목류인 것을 특징으로 하는 식물체의 건조 스트레스 내성을 증진시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물체의 건조 스트레스 내성을 증진하는 단백질, 이 단백질을 암호화하는 신규한 유전자, 이 유전자로 형질전환된 식물체에 관한 것으로, 더 상세하게는 현사시나무 (*Populus alba*×*Populus glandulosa*) 유래의 식물체 건조 스트레스 내성을 증진하는 PagSAP5 단백질, 이 단백질을 암호화하는 내건성 유전자, 및 이 유전자로 형질전환되어 건조 스트레스에 대한 내성이 증진된 식물체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 식재 후 생장관리를 거의 하지 않는 산림수종은 고정된 생육 환경에서 일생동안 건조, 고염, 냉해, 중금속, 열충격 및 오존과 같은 다양한 비생물 스트레스에 직면하게 되며, 이러한 비생물학적 스트레스는 산림수종의 생장과 발달의 제한 요인이 되어 생산 감소의 주요 원인이 된다.

[0004] 특히 지구온난화에 따른 지구의 평균 기온이 상승함에 따라 건조 내성이 약한 수목의 고사가 증가하고, 산림과 토양이 점차적으로 황폐해지거나 토양의 사막화가 계속적으로 늘어나고 있다. 그러므로 수목의 생산성에 영향을 미치는 건조 스트레스 내성에 관련된 단백질 및 유전자들에 대한 기능 연구가 중요하다.

[0005] 건조 스트레스 관련 단백질을 암호화하는 유전자들을 이용한 유전공학 연구는 건조 스트레스 저항성 형질전환 식물체들을 개발하는데 있어 매우 유용한 방법이며, 유전공학 기법으로 개발된 많은 형질전환 식물들이 건조 스트레스에 대한 내성이 증진되었다는 보고들이 있고, 다양한 작물에서 다양한 저항성 유전자들이 발견되고 있으며 그 발현 네트워크에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다 (등록특허 10-1325044호, 등록특허 10-1758868호).

[0006] 그러나 수목에서의 건조 스트레스에 대한 저항성을 개선하는 단백질과 이를 암호화하는 유전자와 관련된 보고는 매우 적고 그 기능도 잘 알려져 있지 않는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 수목의 내건성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 연구를 지속한 결과, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자가 수목 건조 내성 형질에 관여를 하고 이 유전자는 건조 스트레스 처리시 발현이 증가되고 또한 식물체에 형질전환한 경우 식물체의 내건성을 증진할 수 있음을 확인하게 되어 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 수목 건조 내성증진 PagSAP5 (*Populus alba*×*Populus glandulosa* Stress Associated Protein 5) 유전자, 및 서열번호 1의 염기서열에 의해 암호화되거나 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 내건성 증진 PagSAP5 단백질을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 PagSAP5 유전자를 포함하는 벡터 및 상기 벡터에 의해 형질전환된 건조 스트레스에 대한 내성이 증진된 식물체를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 PagSAP5 유전자의 발현을 증가시켜 식물체의 건조 스트레스 내성을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 건조 스트레스 내성을 증진시키는 단백질을 암호화하는, 서

열번호 1의 염기서열을 갖는 PagSAP5 유전자를 제공한다.

[0014] 본 발명의 유전자인 PagSAP5은 현사시나무 (*Populus alba*×*Populus glandulosa*)로부터 분리하였으며, 시퀀싱을 통하여 서열번호 1의 염기서열로 이루어져 있음을 확인하였다 (실시예 1).

[0015] 본 발명자들은 현사시나무의 건조 스트레스 반응에 대한 연구 중에, 상기 PagSAP5 유전자가 식물체에 건조 스트레스 및 식물호르몬인 앱시스산 (abscisic acid: ABA)에 처리시 강하게 발현된다는 사실과 상기 유전자의 발현이 증가될 경우 건조 스트레스에 대한 내성이 증진됨을 확인하여, PagSAP5 유전자는 건조 스트레스 내성에 관여하는 유전자임을 규명하였다 (실시예 2).

[0016] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에 의해 암호화되거나 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는, 내건성 증진 PagSAP5 단백질을 제공한다.

[0017] 본 발명에서 내건성 증진 PagSAP5 단백질은 아미노산의 부가, 치환 또는 결실로 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 동질의 내건성 활성을 나타내는 기능적 동등물도 포함한다.

[0018] 상기 기능적 동등물에서, 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예로는, 지방족 아미노산 (Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산 (Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산 (Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산 (Asp, Glu), 염기성 아미노산 (His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황 함유 아미노산(Cys, Met) 등을 들 수 있다. 아미노산의 결실은 바람직하게는 본 발명의 PagSAP5 단백질의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다. 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 PagSAP5 단백질의 기본 골격 및 이의 생리활성을 유지하면서 단백질의 일부 화학 구조가 변형된 단백질 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 단백질의 생리활성을 유지하면서 안정성 등을 연장하거나 GFP (Green Fluorescent Protein)와 같은 다른 단백질과 융합으로 만들어진 융합단백질 등이 이에 포함된다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은 PagSAP5 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0020] 본 발명에서 PagSAP5 유전자를 포함하는 재조합 벡터는 바람직하게는 식물 발현 벡터이며, 더욱 바람직하게는 도 5a에 기재된 재조합 벡터이나, 이에 제한되지 않는다. 대체로 벡터는 식물체 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다.

[0021] 본 발명에서 재조합 벡터는 상기 PagSAP5 유전자가 발현될 수 있도록, 발현조절 서열과 기능적으로 연결되어 있다. 예를 들어, 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한, 벡터는 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

[0022] 본 발명의 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 벡터는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 하이브리드 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다.

[0023] 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 형질전환 하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은 상기 벡터에 의해 형질전환된 건조 스트레스에 대한 내성이 증진된 식물체를 제공한다.

[0025] 본 발명에서 "식물체"는 성숙한 식물체뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다. 본 발명에서 상기 벡터로 식물체를 형질전환하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법, 미세사출법 (microprojectile bombardment), 일렉트로포레이션 (electroporation), PEG-매개 융합법 (PEG mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 진공 침윤법 (Vacuum infiltration method), 화아침지법 (floral

meristem dipping method), 및 아그로박테리아 분사법 (Agrobacteria spraying method)을 이용할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 식물체는 상록수, 낙엽수, 침엽수, 활엽수, 교목, 관목, 덩굴나무 등을 포함하는 수목류; 포도, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아 등을 포함하는 과수류; 벼, 밀, 보리, 옥수수 등을 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기 등을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배 등을 포함하는 특용작물류; 장미, 글라디올러스 등을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버 등을 포함하는 사료작물류로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나이며, 바람직하게는 수목류이며, 더욱 바람직하게는 현사시나무 등을 포함하는 포플러이다.

[0027] 본 발명에 따른 PagSAP5 유전자로 형질전환된 식물체는 건조 스트레스에 대한 내성이 현저히 증진되었다 (도 6, 도 7, 표 3).

[0028] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 PagSAP5 유전자의 발현을 증가시켜 식물체의 건조 스트레스 내성을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다. 상기 방법은 (a) PagSAP5 유전자를 식물체에 형질전환하는 단계; 및 (b) 상기 형질전환된 식물체에서 PagSAP5 유전자를 과발현시키는 단계를 포함한다.

[0029] 본 발명에서 "과발현"은 증가된 유전자의 발현을 의미하며, 구체적으로는 RNA로의 전사를 의미한다.

[0030] 본 발명에서 "건조 스트레스 내성"은 건조 스트레스 조건에서 여러 가지 형태적, 생리적 또는 생화학적 형질들의 종합적 대응 노력에 의하여 생장 유지 및 생산을 유지하는 것을 의미한다. 건조 스트레스 내성 관련 주요 형질은 건조조건에서 양호한 수분상태 및 생산성 유지에 기여하는 심근성, 잎의 노화 방지, 기공의 개폐조절, 삼투조절 능력, 세포의 막 구조 유지 능력 등이다.

발명의 효과

[0032] 본 발명에 따른 PagSAP5 유전자/단백질은 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성에 관여하여, 이 유전자/단백질의 발현조절을 통해 수목 및 농작물 등의 개량에 유용하게 활용할 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 PagSAP5 유전자로 형질전환된 식물체는 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 지구 온난화 등에 의한 기후조건 변화로 야기된 건조한 환경에 바이오매스 생산성이 향상된 식물체로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 PagSAP5 유전자의 염기서열을 나타낸다.

도 2는 PagSAP5 단백질의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 3은 현사시나무 현탁 배양세포에서 건조 스트레스 처리 (250mM 만니톨, Man) 및 식물호르몬 처리 (앱시스산 25μM, ABA)에 따른 PagSAP5 유전자의 발현을 나타낸다.

도 4는 PagSAP5 유전자의 조직 특이적 발현 분석 결과를 나타낸다. ML는 성숙잎 (Mature Leaf), YL은 어린잎 (Young Leaf), S는 줄기 (Stem), R은 뿌리 (Root), F는 꽃 (Flower).

도 5a는 PagSAP5 유전자를 pBI121 벡터에 삽입하여 제작한 재조합 발현벡터 pBI121-PagSAP5의 유전자 지도를 나타낸다.

도 5b는 PagSAP5 유전자의 발현억제를 위한 RNAi 벡터인 재조합 백터 pK7GWIWG2(I)-PagSAP5의 유전자 지도를 나타낸다.

도 6a는 pBI121-PagSAP5 과발현 벡터 (OX)로 형질전환된 현사시나무 라인 (OX1, OX2, OX3)의 PagSAP5 유전자의 발현 정도를 리얼타임 qRT-PCR로 분석한 결과를 나타낸다. WT는 대조구 (Wild type)

도 6b는 pK7GWIWG2(I)-SAP5 발현억제 RNAi 벡터 (Ri)로 형질전환된 현사시나무 라인 (Ri1, Ri2, Ri3, Ri4)의 PagSAP5 유전자의 발현 정도를 리얼타임-qRT-PCR로 분석한 결과를 나타낸다. WT는 대조구 (Wild type)

도 7a는 형질전환된 현사시나무 (OX1, OX3, Ri2, Ri3)의 건조 스트레스 조건 (단수 12일)에서 생장시킨 후 표현

형을 분석한 결과를 나타낸다.

도 7b는 형질전환된 현사시나무 (OX1, OX3, Ri2, Ri3)의 건조 스트레스 조건 (단수 12일)에서 생장 중의 엽록소 형광량 (Fv/Fm)의 변화를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 구체적인 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 보다 상세히 설명하기로 한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 보다 명확하게 이해시키기 위하여 예시한 것일 뿐이며, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0038] 실시예 1: 현사시나무 유래 건조 스트레스 내성 관련 유전자

[0039] <현탁배양세포를 이용한 건조 스트레스 처리>

[0040] 현사시나무 (*Populus alba*×*P. glandulosa*)를 식물재료로 사용하였다. 현사시나무의 잎을 MS 캘러스 고체 배지에 치상하여 캘러스를 유도하였다. 유도한 캘러스를 MS 캘러스 액상배지로 현탁하여 22±1℃의 약한 광조건 (20 μmol $m^{-2}s^{-2}$)에서 120rpm으로 진탕배양하였다.

[0041] MS 캘러스 액체 배지는 MS 배지 (Duchefa, Netherlands)에 1.0mg/L의 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-D), 0.1mg/L의 1-나프탈렌아세트산 (NAA), 0.01mg/L의 6-벤질아미노푸린 (6-BAP) 및 30g 설탕을 첨가하여 pH 5.8로 조정한 것을 사용하였고, MS 캘러스 고체 배지는 MS 캘러스 액체 배지에 0.8%의 아가(agar)를 첨가하여 사용하였다.

[0042] 0.4g의 현탁배양세포를 100ml의 MS 캘러스 액상배지로 옮겨 5일간 배양한 후 각각 건조 스트레스 (만니톨 250 mM, Man) 및 식물호르몬 (앱시스산 20μM, ABA)을 처리한 다음 2시간과 10시간 동안 진탕배양한 후 진공펌프를 이용하여 배지를 제거하고 세포를 회수하였다. 대조구 (WT)는 스트레스 처리에 사용된 동일한 현탁배양세포를 아무런 처리 없이 2시간과 10시간 후에 각각 동일한 방식으로 세포를 회수하였다. 회수한 시료는 즉시 액체 질소에서 동결한 후 80℃에 보관하였다.

[0043] <total RNA 분리>

[0044] 회수한 현사시나무의 현탁배양세포로부터 Total RNA는 RNeasy plant Minin kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 분리하였다. Real-time qPCR 분석에 사용한 primer는 Primer3 프로그램 (http://fokker.wi.mit.edu)으로 설계하였다.

[0045] <cDNA 합성 및 qRT-PCR 분석>

[0046] 분리한 1㎍의 total RNA로부터 PrimeScript RT reagent Kit (Takara, Japan)을 사용하여 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다. 이때 프라이머는 스트레스 관련 단백질 패밀리에 상동성을 보인 *P. tricocarpa*의 염기서열 (Potri.003G117100.1)을 기반으로 하여 Primer3 프로그램을 사용하여 제작하여 사용하였다 (표 1).

표 1

[0047]

프라이머	서열
PagSAP5_qRT_F(서열번호 3)	5' - gtcagttgtgtctgctgaagct -3'
PagSAP5_qRT_R(서열번호 4)	5' - agcacctttgaaatcaaagag -3'
Actin-F(서열번호 5)	5' - gccatctctcatcggaatgga -3'
Actin-R(서열번호 6)	5' - agggcagtgatttccttgctca -3'

[0048] PCR 증폭은 실시간 모니터링이 가능한 CFX96 Touch™ Real-Time PCR (BioRad, USA)과 AmpOne Taq DNA polymerase (GeneAll, South Korea)를 사용하였으며 95℃에서 5분간 1회, 95℃에서 30초, 56℃에서 30초 그리고 72℃에서 1분의 과정을 40회 반복하였다. 마지막으로 72℃에서 10분간 처리하여 반응을 종료하였다. PCR 증폭산물의 정량을 위한 내부표준으로는 actin 유전자 (서열번호 5과 서열번호 6)를 사용하였다.

[0049] <유전자 분리 및 염기서열 분석>

[0050] 건조 스트레스 처리된 현사시나무 현탁세포 유래의 RNA로부터 합성된 cDNA 중에서 EST (expressed sequence tag) 분석을 통하여 애기장대에서 보고된 스트레스 관련 단백질 패밀리 유전자와 서열 상동성을 보이는 cDNA 클론을 선발하였고, 선발된 cDNA 클론의 염기서열을 결정하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0051] 도 1에 도시된 바와 같이, cDNA 서열은 528 base pair (bp) 길이의 open reading frame을 가지고 있고, PagSAP5로 명명하였다 (서열번호 1).

[0052] 상기 cDNA 서열을 기반으로 Vector NTI advance 10.0 (Invitrogen, USA)을 이용하여 예상 아미노산 서열을 조사하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0053] 도 2에 도시된 바와 같이, 상기 아미노산 서열은 175개 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하며, 애기장대, 벼 등 식물의 스트레스 관련 단백질 패밀리 유전자에서 확인되는 A20 도메인 (아미노산 19~40번째 위치)과 ZnF-AN1 도메인 (116~148번째 위치)을 포함하고 있다.

[0055] 실시예 2: 스트레스에 처리에 따른 PagSAP5 유전자의 발현 양상

[0056] 실시예 1에서 기재된 바와 같이, 배양 2시간 및 10시간 후 회수한 각각의 현탁배양세포에서 PagSAP5 유전자의 발현 수준을 qRT-PCR으로 분석하였다. 각각의 PagSAP5 유전자의 발현 값은 actin 유전자의 발현 값에 비례하여 상대적으로 계산하였고, 서열번호 3과 서열번호 4의 프라이머를 이용하였다. 그 결과를 도 3에 나타냈다.

[0057] 도 3에 도시된 바와 같이, PagSAP5 유전자의 발현은 건조 스트레스와 ABA 처리 10시간 후에 대조구 (WT)에 비하여 1.5배 이상 증가하였다. 따라서 PagSAP5 유전자는 ABA에 의존적인 건조 스트레스 내성에 관여하는 유전자로 판단된다.

[0059] 실시예 3: PagSAP5 유전자의 조직특이적 발현 양상

[0060] PagSAP5 유전자 조직특이적 발현 분석을 위하여 현사시나무 1년생 줄기의 삽목묘로부터 잎 (어린잎, 성숙잎), 줄기, 뿌리를 채취하였다. 꽃은 25년생 나무로부터 3월에 채취하였다. 모든 시료는 즉시 액체질소 (-80℃)에 얼린 다음 보관하고 분석에 사용하였다.

[0061] 상기 현사시나무의 꽃, 어린 잎과 성숙잎, 줄기 및 뿌리로부터, 실시예 1과 동일한 방식으로, 각각의 total RNA를 분리하여 qRT-PCR 분석을 실시하였고, 그 결과를 도 4에 도시하였다.

[0062] 도 4에 도시된 바와 같이, PagSAP5 유전자는 줄기 (Stem; S)에서 가장 높게 발현되었고, 뿌리 (Root; R)에서 가장 낮게 발현되었다. 줄기 다음으로 꽃(Flower; F)에서 높게 발현되었고, 성숙 잎 (Mature Leaf; ML), 어린 잎 (Young Leaf; YL)에서는 거의 같은 수준으로 발현되었다.

[0064] 실시예 4: 형질전환 재조합 벡터 제작 및 형질전환 식물체 제작

[0065] <형질전환 재조합 벡터 제작>

[0066] PagSAP5 유전자의 과발현 형질전환 재조합 벡터와 PagSAP5 유전자 발현억제 RNAi 벡터를 각각 제작하였다. PCR 증폭에는 표 2와 같은 프라이머를 사용하였다.

표 2

[0067]

프라이머	서열
PagSAP5-XbaI_F(서열번호 7)	5' - cacgggggactctagaatgggttctgagcaaaacgatggc -3'
PagSAP5-SacI_R(서열번호 8)	5' - gatcggggaaattcgagctctcagaacctctccaccttattagc -3'
PagSAP5_RNAi_F(서열번호 9)	5' - gccgccccctcacccaaagccggcaaataggtgctttag -3'
PagSAP5_RNAi-R(서열번호 10)	5' - tcggcgcgcccaccctaatacattcacttggtgctctc -3'
CamV 35S_F(서열번호 11)	5' - gaaacctcctcggattccat -3'
attB1_F(서열번호 12)	5' - acaagtttgtacaaaaaagcaggct -3'

[0068] 구체적으로는 PagSAP5 유전자의 과발현 벡터 제작을 위해 서열번호 7과 서열번호 8의 프라이머를 사용하여 PCR

증폭을 하였다. PCR 증폭은 AmpOne Taq DNA polymerase (GeneAll, South Korea)를 사용하였으며 95℃에서 5분간 1회, 95℃에서 30초, 56℃에서 30초 그리고 72℃에서 1분의 과정을 40회 반복하였다. 그리고 72℃에서 7분간 반응을 종결시켰다. PCR 증폭 산물 (561bp)은 1.0% agarose gel (Promega, USA)에 전기영동하고 분리하고 Expin combo kit (GeneAll, South Korea)을 사용하여 매뉴얼에 따라 정제한 후, pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 서브클로닝하였다. 제한효소 XbaI과 SacI으로 절단한 후 단편을 분리하여 정제한 다음 pBI121 벡터의 XbaI/SacI 위치에 삽입하여 pBI121-PagSAP5(OX) 과발현 벡터를 제작하였다. pBI121-PagSAP5(OX) 과발현 벡터의 유전자 지도를 도 5a에 나타냈다.

[0069] PagSAP5 유전자의 발현억제 벡터 제작을 위해 Gateway 시스템을 이용한 Hairpin RNAi (RNA interference) 제작 방법을 사용하였으며, pENTR_IF와 pK7GWIWG2(I) binary 벡터를 사용하였다. 선발한 PagSAP5의 부위는 서열번호 9와 서열번호 10의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 하였다. pK7GWIWG2(I)-PagSAP5(Ri) RNAi 벡터를 제작하였다. pK7GWIWG2(I)-PagSAP5(Ri) RNAi 벡터의 유전자 지도를 도 5b에 나타냈다.

[0070] <PagSAP5 유전자가 형질전환된 현사시나무 제작>

[0071] PagSAP5 유전자 과발현 벡터와 RNAi 발현억제 벡터를 각각 아그로박테리움 투마파시엔 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404에 도입한 다음 현사시나무의 형질전환을 위한 표준실험방법 (Noh et al, 1994, Res Rep For Gen Res Inst Kor, 30, 114-120; Kim et al, 2011, Plant Biotecchnology Journal, 9, 334-347)에 따라 형질전환시켰다.

[0072] 시험관에서 6주간 무균배양한 현사시나무의 줄기를 약 5~7mm의 길이로 잘라 형질전환 아그로박테리움 균주와 15분간 공조 배양하고, 캘러스유도배지(MS, 2,4-D 1.0 mg/L, BAP 0.1 mg/L, NAA 0.01 mg/L, agar 0.8%, pH5.8)에서 2일간 암배양한 후, 항생제가 첨가된 캘러스 유도배지에서 4~5주간 배양하였다. 이후, 캘러스로부터 신초를 유도하기 위해 항생제가 첨가된 줄기유도배지 (WPM, Zeatin 1.0mg/L, BAP 0.1mg/L, NAA 0.01mg/L, agar 0.8%, pH5.8)로 옮겨 4~6주간 배양하였다. 유도된 신초는 뿌리유도배지 (1/2 MS, IBA 0.2 mg/L, pH5.8)로 옮겼다. 식물체는 25℃, 30 μmole $m^{-2}S^{-1}$, 16시간 광조건에서 배양하여 PagSAP5 과발현 형질전환 포플러와 PagSAP5 발현억제 형질전환 포플러를 제작하였다. 항생제는 kanamycin 50㎍/mℓ을 사용하였다.

[0073] 재분화된 식물체의 형질전환 여부는 genomic DNA PCR 분석을 통하여 확인하였다.

[0074] PagSAP5 과발현 형질전환 현사시나무 OX1, OX2, OX3 (서열번호 8과 서열번호 11 프라이머, 표2)와 발현억제 형질전환 현사시나무 Ri1, Ri2, Ri3, Ri4 (서열번호 10과 서열번호 12 프라이머, 표2)의 gDNA-PCR 분석은 Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR kit (Thermon scientific, USA)을 사용하여 사용자 매뉴얼에 따라 PCR 증폭하였다. PCR 증폭은 98℃에서 5분 후 98℃에서 5초, 60℃에서 5초 72℃에서 30초간의 40 사이클 동안 C1000 touch thermal cycler (Bio-Rad, USA)에서 수행한 후, 1.0% 아가로즈 젤에 전기영동하고, UV 광에서 시각화하였다.

[0076] 실시예 5: 형질전환된 현사시나무의 PagSAP5 유전자의 발현 양상 분석

[0077] PagSAP5 과발현 현사시나무와 RNAi 발현억제 현사시나무에서의 PagSAP5 유전자의 발현을 확인하기 위하여 qRT-PCR을 실시하였다.

[0078] qRT-PCR 분석에는 PagSAP5 유전자에 특이적인 서열번호 3와 서열번호 4 프라이머를 사용하였다 (표 1). qRT-PCR을 위해서 형질전환된 현사시나무 7종 라인 및 형질전환하지 않는 현사시나무 (대조구; WT)의 total RNA 1㎍을 각각 주형으로 PrimeScript RT reagent Kit (Takara, Japan)를 사용하여 사용자 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR 증폭은 95℃에서 3분 후 95℃에서 10초, 60℃에서 10초 72℃에서 30초간의 40 사이클 동안 Multi-color Real-time PCR System CFX96 (Bio-Rad, USA)에서 수행하였다. 내부표준 유전자로서 액틴을 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머로 동일하게 증폭하였다. PCR 산물은 1.0% 아가로스 젤에 전기영동하고 UV 광에서 시각화하였다. 각각의 PagSAP5 유전자의 발현 값은 actin 유전자의 발현 값에 비례하여 상대적으로 계산하였고, 그 결과를 도 6a 및 도 6b에 나타냈다.

[0079] 도 6a에 도시된 바와 같이, PagSAP5 유전자로 형질전환된 현사시나무 라인 OX1, OX2, OX3에서 PagSAP5 유전자의 발현은 대조구 (WT)에 비하여 약 180 ~ 313배 증가하였다.

[0080] 도 6b에 도시된 바와 같이, PagSAP5의 발현을 억제한 형질전환체 현사시나무 라인 Ri1, Ri2, Ri3, Ri4에서

PagSAP5 유전자의 발현은 대조구 (WT)에 비하여 약 0.22 ~ 0.88배로 감소하였다.

[0082] 실시예 6: 형질전환된 현사시나무의 건조 스트레스 내성 검정

[0083] 실시예 5에서의 형질전환체 중에서 PagSAP5 유전자 발현이 200배 이상 발현하는 2개의 PagSAP5 과발현 형질전환체 2종 (OX1과 OX3)과 PagSAP5 유전자 발현이 0.4배 이하로 발현하는 PagSAP5 발현억제 형질전환체 2종 (Ri2와 Ri3)을 선발하여 건조 스트레스 내성을 검정하였다.

[0084] 건조 스트레스 내성을 조사하기 위하여, 각각의 형질전환체 현사시나무를 24±1℃, 50% 상대 습도 및 16시간 광/8시간 암의 광주기에서 8주간 생장시켰다. 건조 처리 1일 전에 토양 수분함량이 48%가 될 때까지 물을 준 다음, 12일간 물을 주지 않고 토양 함수율이 0%가 되는 12일까지 각각의 현사시나무의 상태 (표현형)를 관찰하였고, 그 결과 사진을 도 7a에 나타내었다.

[0085] 또한 각각의 형질전환된 현사시나무의 건조 스트레스 조건 (단수 12일)에서 생장 중의 0일, 9일, 12일에 각각의 엽록소 형광량(Fv/Fm)을 Pocket PEA chlorophyll fluorometer (Hansatech, 독일)를 사용하여 측정하여 광합성 효율을 분석하였고, 그 결과를 도 7b에 나타냈다.

[0086] 도 7a에 나타난 바와 같이, 단수 처리 후 12일이 경과했을 때 PagSAP5 과발현 형질전환체 현사시나무 (OX1과 OX3)는 잎의 정상 생육 상태를 나타내어, 잎의 처짐 및 잎 마름 현상을 나타낸 대조구 (WT) 현사시나무에 비하여 증진된 건조 내성을 보이는 반면, PagSAP5 발현억제 형질전환체 현사시나무 (Ri2와 Ri3)는 모두 심한 잎 마름 현상을 나타내어 건조에 민감하게 반응함을 확인하였다.

[0087] 도 7b에 나타낸 바와 같이, 0일의 엽록소 형광량 대비 12일의 엽록소 형광량을 비교시, 대조구 (WT) 현사시나무의 광합성 효율은 82.7%, PagSAP5 발현억제 형질전환체 (Ri) 현사시나무의 광합성 효율은 38.3%, PagSAP5 과발현 형질전환체 (OX) 현사시나무는 95% 광합성 효율을 보여서, PagSAP5 유전자의 발현이 증가된 형질전환 현사시나무가 건조 스트레스 내성이 현저히 증진된다는 것을 알 수 있다.

[0088] 한편 상기 5종의 현사시나무 (대조구; WT), PagSAP5 과발현 형질전환체 2종 (OX1과 OX3), PagSAP5 발현억제 형질전환체 2종 (Ri2와 Ri3))에 13일부터 다시 관수하여 1주 동안 생장시킨 후 생존율을 조사하였고 그 결과를 표 3에 나타냈다.

표 3

[0089]

구분	생존개체수	개체수	생존률
WT	3	12	25.0
OX1	8	12	66.7
OX3	5	11	45.5
Ri2	1	12	16.7
Ri3	2	12	0.0

[0090] 상기 표에 나타낸 바와 같이, PagSAP5 과발현 형질전환체 현사시나무의 생존율은 45.5 ~ 66.7%로 대조구 (WT) 현사시나무의 생존율 25%에 비해 2배 이상 높았다. 반면에 PagSAP5 발현억제 형질전환체 현사시나무의 생존율은 0 ~ 16.7%로 대조구 현사시나무에 비하여 감소하였다. 따라서 PagSAP5 유전자의 발현 증가가 현사시나무의 건조 내성을 현저히 증진시킴을 확인할 수 있었다.

도면

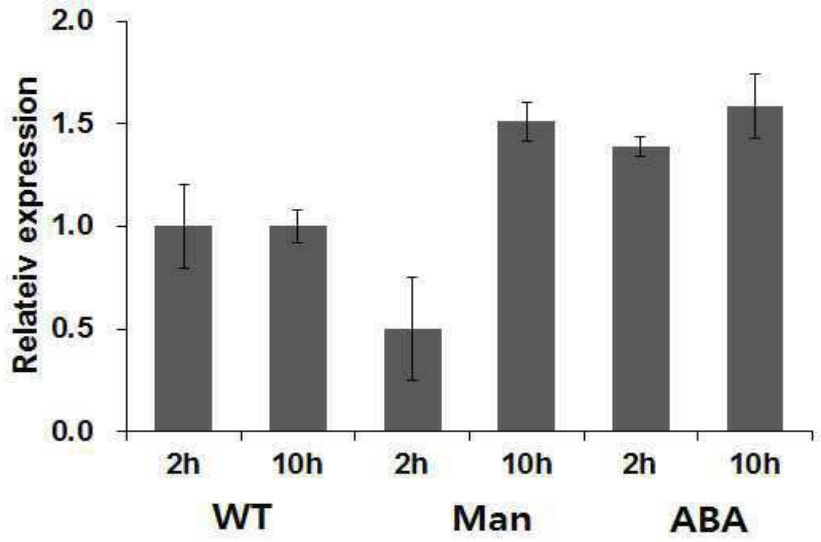
도면1

```
atgggttctg agcaaaacga tggcacaagc ttcccaccag cagagccaaa gctttgtgtt  60
aatgggtgtg gatttttgg tacggctgca aacatgaacc tttgctccaa gtgttaccgt 120
gaccttcgtg ccgaagaaga gcaggctgcc tctgccaagg ctgccatgga aaagacactg 180
aatatcaatc caaaacaaca tattgattct aaggttgttg tcgatgcccc tcaagttgtg 240
gtggcggcta attccgtgca gttagatgtg tctgatgaag cttcttcgtc agcagaaact 300
gttgttgctg gtggtggtca ggtgccatca aagccggcaa ataggtgctt tagctgcaat 360
aagaaggttg gtttgacagg attcaagtgc aagtgcggtg gcacttactg cgggactcat 420
aggtacgcag agaatcacga gtgcctcttt gatttcaaag gtgccggccg tgatgcaatc 480
gcgaaggcaa atcctgtgat taaggctaat aaggtggaga ggttctga              528
```

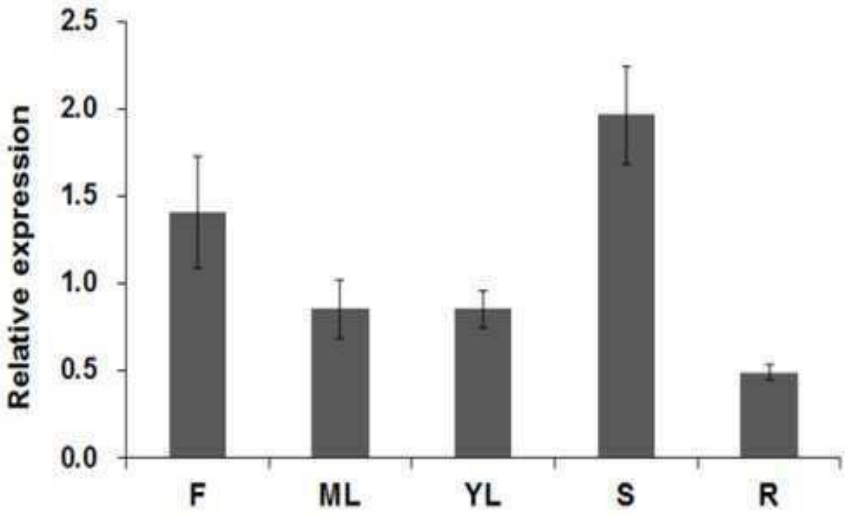
도면2

```
Met Gly Ser Glu Gln Asn Asp Gly Thr Ser Phe Pro Pro Ala Glu Pro
  1               5                  10                  15

Lys Leu Cys Val Asn Gly Cys Gly Phe Phe Gly Thr Ala Ala Asn Met
            20                  25                  30

Asn Leu Cys Ser Lys Cys Tyr Arg Asp Leu Arg Ala Glu Glu Glu Gln
        35                  40                  45

Ala Ala Ser Ala Lys Ala Ala Met Glu Lys Thr Leu Asn Ile Asn Pro
    50                  55                  60

Lys Gln His Ile Asp Ser Lys Val Val Val Asp Ala Pro Gln Val Val
65                  70                  75                  80

Val Ala Ala Asn Ser Val Gln Leu Asp Val Ser Asp Glu Ala Ser Ser
                85                  90                  95

Ser Ala Glu Thr Val Val Ala Gly Gly Gly Gln Val Pro Ser Lys Pro
            100                 105                 110

Ala Asn Arg Cys Phe Ser Cys Asn Lys Lys Val Gly Leu Thr Gly Phe
        115                 120                 125

Lys Cys Lys Cys Gly Gly Thr Tyr Cys Gly Thr His Arg Tyr Ala Glu
    130                 135                 140

Asn His Glu Cys Leu Phe Asp Phe Lys Gly Ala Gly Arg Asp Ala Ile
145                 150                 155                 160

Ala Lys Ala Asn Pro Val Ile Lys Ala Asn Lys Val Glu Arg Phe
                165                 170                 175
```

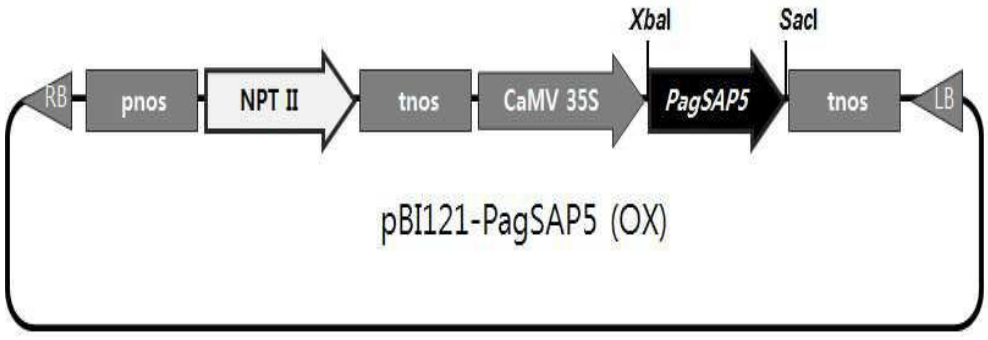
도면3


Relateiv expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
2h
10h
2h
10h
2h
10h
WT
Man
ABA

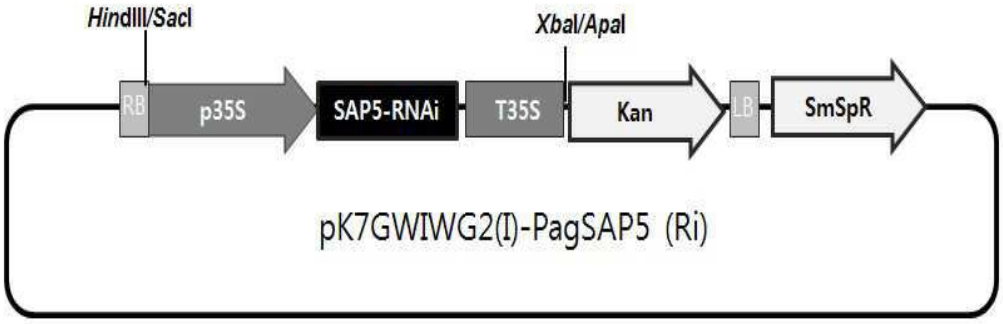
도면4


Relative expression
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
F
ML
YL
S
R

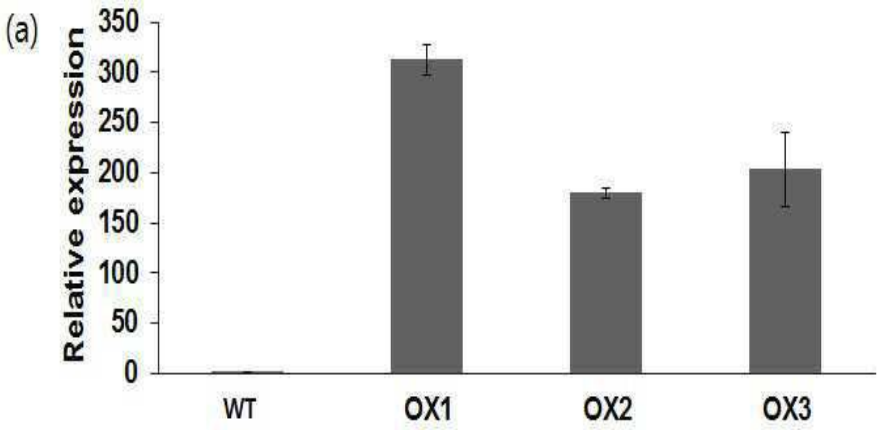
도면5a


XbaI
SacI
RB
pnos
NPT II
tnos
CaMV 35S
PagSAP5
tnos
LB
pBI121-PagSAP5 (OX)

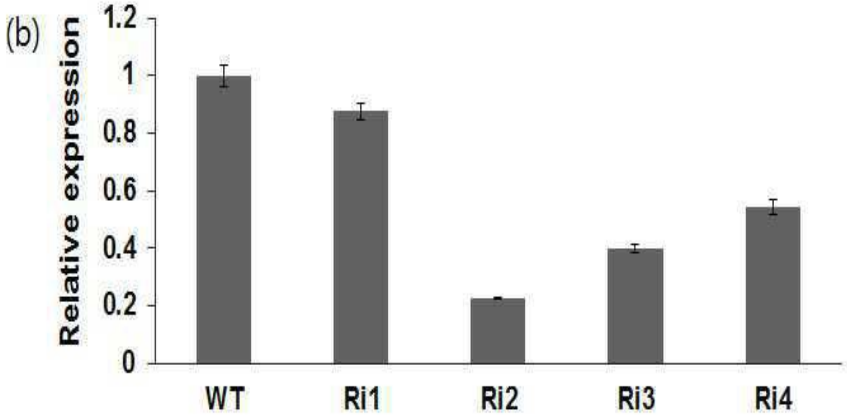
도면5b



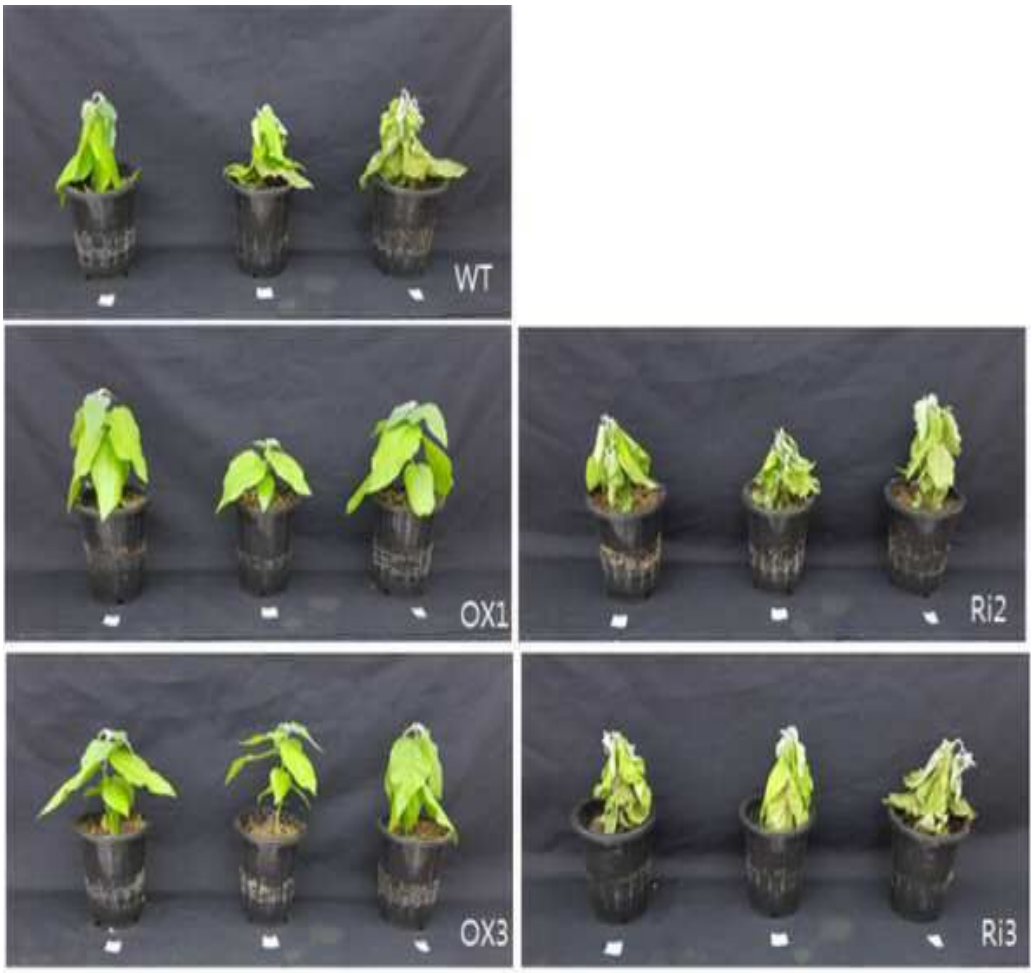
도면6a



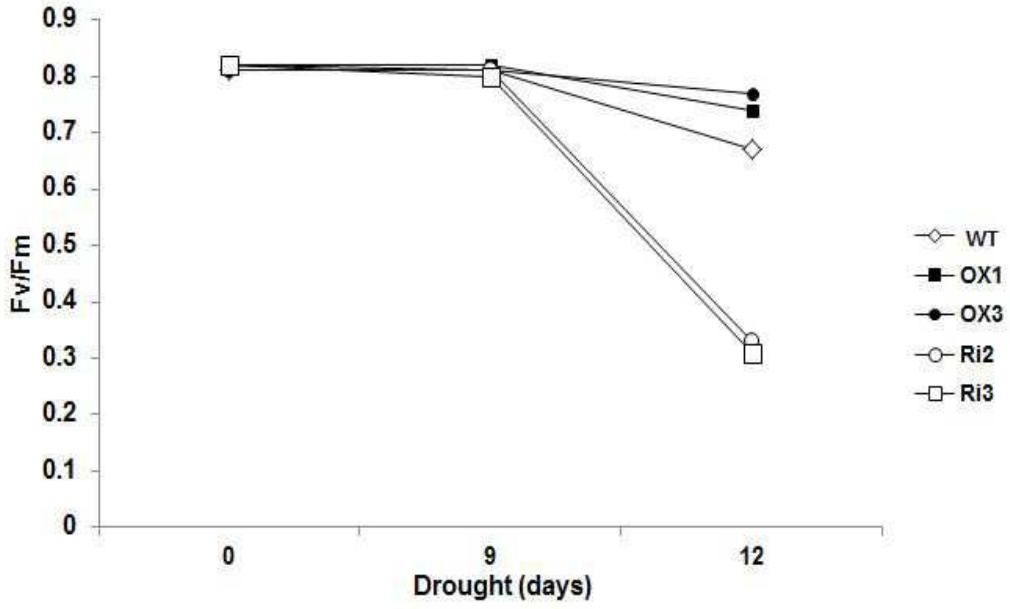
도면6b



도면7a


WT
OX1
Ri2
OX3
Ri3

도면7b


0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Fv/Fm
0
9
12
Drought (days)
WT
OX1
OX3
Ri2
Ri3

서 열 목 록

<110> National Institute of Forest Science

<120> Novel proteins enhancing drought stress tolerance of plants, genes encoding the proteins and transgenic plants transformed with the genes

<130> P-10187

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 528

<212> DNA

<213> Populus sieboldii x Populus grandidentata

<220><221> gene

<222> (329)..(528)

<223> RNAi construct

<220><221> gene

<222> (1)..(528)

<223> Open reading frame

<400> 1

atgggttctg agcaaaacga tggcacaagc ttcccaccag cagagccaaa gctttgtgtt 60

aatgggtgtg gatttttgg tacggctgca aacatgaacc tttgctccaa gtgttaccgt 120

gaccttcgtg ccgaagaaga gcaggctgcc tctgccaagg ctgccatgga aaagacactg 180

aatatcaatc caaaacaaca tattgattct aaggttgttg tcgatgcccc tcaagttgtg 240

gtggcggcta attccgtgca gttagatgtg tctgatgaag cttcttcgtc agcagaaact 300

gttgttgctg gtggtggtca ggtgccatca aagccggcaa ataggtgctt tagctgcaat 360

aagaaggttg gtttgacagg attcaagtgc aagtgcggtg gcacttactg cgggactcat 420

aggtacgcag agaatcacga gtgcctcttt gatttcaaag gtgccggccg tgatgcaatc 480

gcgaaggcaa atcctgtgat taaggctaat aaggtggaga ggttctga 528

<210> 2

<211> 175

<212> PRT

<213> Populus sieboldii x Populus grandidentata

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(175)

<223> Amino acid sequence of PatgSAP5

<400> 2

Met Gly Ser Glu Gln Asn Asp Gly Thr Ser Phe Pro Pro Ala Glu Pro
1 5 10 15

Lys Leu Cys Val Asn Gly Cys Gly Phe Phe Gly Thr Ala Ala Asn Met
20 25 30

Asn Leu Cys Ser Lys Cys Tyr Arg Asp Leu Arg Ala Glu Glu Glu Gln
35 40 45

Ala Ala Ser Ala Lys Ala Ala Met Glu Lys Thr Leu Asn Ile Asn Pro
50 55 60

Lys Gln His Ile Asp Ser Lys Val Val Val Asp Ala Pro Gln Val Val
65 70 75 80

Val Ala Ala Asn Ser Val Gln Leu Asp Val Ser Asp Glu Ala Ser Ser
85 90 95

Ser Ala Glu Thr Val Val Ala Gly Gly Gly Gln Val Pro Ser Lys Pro
100 105 110

Ala Asn Arg Cys Phe Ser Cys Asn Lys Lys Val Gly Leu Thr Gly Phe
115 120 125

Lys Cys Lys Cys Gly Gly Thr Tyr Cys Gly Thr His Arg Tyr Ala Glu
130 135 140

Asn His Glu Cys Leu Phe Asp Phe Lys Gly Ala Gly Arg Asp Ala Ile
145 150 155 160

Ala Lys Ala Asn Pro Val Ile Lys Ala Asn Lys Val Glu Arg Phe
165 170 175

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PagSAP5 qRT Forward primer

<400> 3

gtcagttgtg tctgctgaag ct 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PagSAP5 qRT Reverse primer

<400> 4

agcacctttg aaatcaaaga g 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Actin Forward primer

<400> 5

gccatctctc atcggaatgg a 21

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Actin Reverse primer

<400> 6

agggcagtga tttccttgct ca 22

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PagSAP5-XbaI forward primer

<400> 7

cacgggggac tctagaatgg gttctgagca aaacgatggc 40

<210> 8

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PagSAP5-XbaI reverse primer

<400> 8

gatcggggaa attcgagctc tcagaacctc tccaccttat tagc 44

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PagSAP5 RNAi Forward primer

<400> 9

gccgcccccct tcacccaaag ccggcaaata ggtgctttag 40

<210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PagSAP5 RNAi Reverse primer

<400> 10

tcggcgcgcc cacccttaat acattcactt ggtgctctc 39

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CamV 35S Forward primer

<400> 11

gaaacctcct cggattccat 20

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> attB1 Forward primer

<400> 12

acaagtttgt acaaaaaagc aggct 25