



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)	(45) 공고일자 2007년07월25일	(11) 등록번호 10-0742194	(24) 등록일자 2007년07월18일
(21) 출원번호 10-2006-0006766	(65) 공개번호 10-2006-0086855	(22) 출원일자 2006년01월23일	(43) 공개일자 2006년08월01일
심사청구일자 2006년01월23일			
(30) 우선권주장 1020050007534	2005년01월27일	대한민국(KR)	
(73) 특허권자	재단법인서울대학교산학협력재단 서울특별시 관악구 봉천동 산 4-2		
(72) 발명자	김민균 서울특별시 관악구 봉천5동 1712 관악드림타운아파트 130동1204호 정진욱 서울특별시 관악구 신림본동 409-137 우성아트빌라 A동 202호		
(74) 대리인	김석현 이희숙		
(56) 선행기술조사문헌 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94(13):7076-81 (1997.06.24.) 사본1부.	Biochem. Biophys. Res. Commun., 290(3):998-1009 (2002.01.25.) 사본1부.		

심사관 : 김기연

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 환경 스트레스 저항성 조절 유전자를 이용하여 식물체의환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 환경 스트레스 저항성 조절 유전자를 이용하여 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 애기장대 유래의 환경 스트레스 저항성 조절 유전자인 *AIA* 유전자를 포함하는 벡터를 식물체에 도입하여 과발현시킴으로써 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 *AIA* 유전자는 식물체 내에 도입됨으로써 식물의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 효과가 있다.

대표도

도 10

특허청구의 범위

청구항 1.

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 AIA(ABA Inducible AP2/ERF transcription factor) 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 도입하는 것을 특징으로 하는 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 AIA(ABA Inducible AP2/ERF transcription factor) 단백질을 코딩하는 핵산은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 가지는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터가 도 4에 도시된 개열지도를 갖는 pB1111L-AIA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터의 식물체로의 도입은 아그로박테리움(*Agrobacterium sp.*)-매개에 의한 방법, 입자 총충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커법(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리법(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG 침전법(Polyethylen glycol)으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 어느 하나를 사용하는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 환경 스트레스가 한발 또는 제초제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제1항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 방법.

청구항 7.

삭제

청구항 8.

제6항에 있어서, 상기 쌍자엽 식물이 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 AIA(ABA Inducible AP2/ERF transcription factor) 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 도입하는 것을 특징으로 하는 환경 스트레스 저항성 식물체의 제조방법.

청구항 10.

제9항에 있어서, 상기 환경 스트레스가 한발 또는 제초제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제9항의 방법에 따라 제조되고, 조직배양을 통해 재분화시킨 환경 스트레스 저항성 애기장대.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 환경 스트레스 저항성 조절 유전자를 이용하여 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 애기장대 유래의 환경 스트레스 저항성 조절 유전자인 *ALA* 유전자를 포함하는 벡터를 식물체에 도입하여 과발현시킴으로써 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

환경 스트레스는 식물의 성장을 저해하고 많은 중요한 농업 분야에서 수확물의 생산성을 제한하는 요소 중 하나로 작용한다. 이러한 환경 스트레스 중 대표적인 하나의 인자로서 한발 스트레스가 있다. 한발 스트레스는 식물 세포 내 삼투압 불균형과 이온 불균형을 발생시켜 식물의 성장과 광합성을 저해한다. 한편, 식물은 이러한 한발 스트레스에 대한 방어기작을 가지고 있어서 생육에 부적합한 환경에 처하게 되면 그들의 형태를 조절하거나 생리적 대사과정을 조절함으로써 환경에 적응하여 생존하고자 하는 경향이 있다. 상기 식물의 한발 저항성 기작으로는 ABA(abscisic acid) 의존성 신호전달 경로 또는 ABA 비의존성 신호전달 경로가 있다(Finkelstein et al., *Plant Cell* 14, S15-S45, 2002; Himmelbach et al., *Curr Opin Plant Biol* 6, 470-479, 2003; Kuhn and Schroeder, *Curr Opin Plant Biol* 6:463-469, 2003). 상기 ABA는 식물의 대표적인 한발 관련 유전자로서, 식물의 발아(germination), 영양생장(vegetative growth) 및 공변세포(guard cell)의 개폐 등과도 관련이 있다고 알려져 있다. 공변세포에서 ABA의 농도가 증가하면 세포 밖으로 칼륨이온(K⁺) 및 염소이온(Cl⁻)과 같은 이온이 배출되고 세포내 칼슘이온(Ca²⁺)이 증가하게 된다. 이에 따라 팽압(turgor pressure)이 감소하게 되면서 기공이 닫히게 되고 증산이 억제되어 식물체로부터 수분의 손실이 최소화된다.

그러나 한발이 지속되거나 그 정도가 큰 경우에는 식물의 발달, 성장 및 작물의 수확물이 감소하게 되며 지속적인 한발 조건은 식물 대사에 변이를 유발한다. 이러한 대사 변이는 결국에는 식물 세포가 죽음에 이르도록 한다.

따라서 이러한 한발 스트레스에 대해 식물이 저항성을 갖도록 하기 위해 많은 연구가 진행되어 왔다. 예컨대 국제공개특허 WO 2005/048693에는 식물의 Cap Binding Protein gene의 기능을 감소시키거나 억제함으로써 한발 저항성이 증가된 식물의 제조방법이 개시되어 있으며, 국제공개특허 WO 2004/058963에는 *Oryza sativa* 유래의 OSISAPI 유전자로 식물을 형질전환함으로써 한발 저항성이 증가된 식물의 제조방법이 개시되어 있다.

한편, 식물의 성장과 발달에 있어서 주요 제한 인자 중 또 다른 하나인 제초제는 식물의 성장에 필요한 주요 식물 효소 또는 단백질을 직접적으로 저해하여 식물의 성장을 억제시키거나 고사시키는 작용을 한다. 예를 들면, 제초제 글리포세이트(glyphosate)는 방향족 아미노산(aromatic amino acid)의 합성에 필요한 효소의 활성을 저해함으로써 식물을 파괴한다(Fillatti et al., *Biotechnology*, 5:726-730, 1987). 또한, 포스피노트리신(phosphinothricin)은 글루타민의 합성을 저해하며 아트라진(atrazine)은 광합성 기작을 저해하며, 파라쿼트(paraquat)(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylum dichloride)는 빛 존재 하에서 활성 산소종을 다량으로 생성하여 식물의 세포손상을 유발시킨다.

이러한 제초제에 대한 식물의 저항성을 증가시키기 위한 방법으로는 주로 미생물로부터 분리한 제초제 저항성 유전자를 식물에 형질전환하는 방법이 사용되어 왔다. 예를 들면 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*)로부터 분리된 포스포노트리신 제초제를 분해하는 제초제 저항성 유전자로 감자, 밀, 쌀, 옥수수 등을 형질전환하여 제초제 저항성을 부여한 바 있다.

한편, 최근에는 지금까지 연구되어온 환경 스트레스에 대한 방어기작이 종 특이적이거나 환경 특이적이라는 단점을 극복하여 보다 넓은 범위(broad spectrum)의 저항성을 유도할 수 있는 방어기작에 대한 연구가 진행되고 있다.

이에 본 발명자들은 다양한 환경 스트레스에 대한 식물의 저항성을 증가시키는 방법을 연구하던 중, 염기서열은 공지되어 있으나 그 기능이 규명되지 않은 *AIA* 유전자를 식물에 도입하는 경우 한발 및 제초제와 같은 환경 스트레스에 대한 식물의 저항성을 증가시키는 활성을 가지고 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명의 목적은 식물체의 *AIA* 유전자를 이용하여 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 다른 목적은 *AIA* 유전자를 이용하여 환경 스트레스 저항성 식물체의 제조방법을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스 저항성 식물체를 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *AIA* 유전자를 이용하여 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 *AIA* 유전자를 이용하여 환경 스트레스 저항성 식물체의 제조방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스 저항성 식물체를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명에 따른 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법은 애기장대로부터 분리된 AP2/ERF 계열의 기능이 알려져 있지 않은 *RAP2.12*라고도 불리는 공지된 유전자를 이용하는 것을 특징으로 한다. 본 발명자들은 상기 *RAP2.12* 유전자를 *AIA*(ABA Inducible AP2/ERF transcription factor)라고 새롭게 명명하였다.

본 발명자들은 상기 *AIA* 유전자의 기능을 규명하기 위하여 먼저, 야생형 애기장대로부터 분리한 총 RNA를 주형으로 하고 공지된 염기서열(GenBank accession no: Atlg53910)을 토대로 디자인한 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행함으로써 *AIA* 유전자의 cDNA를 제조하였다(실시예 1 참조). 상기 *AIA* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열은 서열번호 1 및 서열번호 2에 각각 나타낸 바와 같다.

본 발명자들은 상기 *AIA* 유전자의 특성을 조사하기 위하여 야생형 애기장대에서 상기 유전자의 발현 패턴을 노던 블롯 및 RT-PCR을 이용하여 분석하였다(실시예 2 참조). 그 결과, 상기 유전자는 야생형 애기장대의 모든 기관에서 발현되며 특히 잎과 뿌리에서 높게 발현됨을 알 수 있었다(도 1 참조). 또한, 상기 유전자는 발아 초기 및 발아 후기의 애기장대의 잎과 뿌리에서 모두 발현됨을 알 수 있었다. 따라서 상기 유전자는 식물의 대부분의 조직에 존재하면서 식물의 생활주기 전반에 걸쳐 특정 기능을 수행할 것으로 추정되었다.

이에 본 발명자들은 상기 유전자가 식물의 환경 스트레스 저항성을 조절하는 활성이 있는지를 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

본 발명의 일 실시예에서는 대부분의 저항성 관련 유전자들이 식물 호르몬인 ABA의 처리에 의해 유도된다는 사실을 기초로 하여 애기장대에 ABA를 포함하는 여러 종류의 식물 호르몬을 처리한 후 노던 블롯을 이용하여 *AIA* 유전자의 발현정도

를 분석하였다(실시에 3 참조). 그 결과, 상기 유전자는 ABA의 처리에 의해 유도됨을 확인할 수 있었다(도 3 참조). 반면, 옥신, 지베렐린, 자스몬산 및 에테폰과 같은 호르몬을 처리한 경우에는 *AIA* 유전자의 발현에 큰 영향을 주지 않았다. 이로부터 상기 *AIA* 유전자는 식물체의 한발 저항성을 조절하는 기능을 수행할 것으로 추정되었다.

상기와 같은 추정을 확증하기 위하여, 본 발명자들은 *AIA* 유전자를 과발현하는 형질전환체와(실시에 4 참조), *AIA* 유전자의 발현이 억제된 동형접합 돌연변이체를 제조하고(실시에 5 참조) 이들의 한발 저항성 정도(실시에 6 참조)를 조사하였다.

그 결과, *AIA* 유전자가 과발현된 형질전환체의 경우 한발 스트레스 하에서도 대부분이 생존하는 것으로 나타난 반면, 야생형과 *AIA* 유전자의 발현이 억제된 돌연변이체의 경우에는 80% 이상이 고사하는 것으로 나타났다(도 10 참조).

나아가, 본 발명에 따른 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체는 야생형 애기장대와 돌연변이체에 비해 시간이 경과에 따른 수분의 손실이 적은 것으로 나타났다(도 11 참조).

따라서 상기 *AIA* 유전자는 식물체의 한발 저항성을 증가시키는 기능이 있음을 알 수 있었다.

또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 *AIA* 유전자가 식물의 제초제 저항성과 관련이 있는지를 확인하기 위하여, 제초제의 처리에 따른 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체의 엽록소 분해 정도를 야생형 및 *AIA* 유전자 발현이 억제된 돌연변이체의 경우와 비교하여 조사하였다(실시에 7 참조). 그 결과, 본 발명에 따른 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체는 야생형 애기장대와 *AIA* 유전자 발현이 억제된 돌연변이체에 비해 제초제에 의한 엽록소 분해가 억제되는 것으로 나타났다(도 12a 및 도 12b 참조).

따라서 *AIA* 유전자는 식물의 제초제 저항성을 증가시키는 기능이 있음을 알 수 있었다.

그러므로 본 발명은 AIA 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 도입하는 것을 특징으로 하는 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 AIA 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 도입하는 것을 특징으로 하는 환경 스트레스 저항성 식물체의 제조방법을 제공한다.

본 발명에서 사용된 용어 "환경 스트레스"는 식물의 성장 또는 생산성을 저하시키는 외부적인 요인을 말한다. 바람직하게는, 상기 환경 스트레스는 한발 스트레스 또는 제초제에 의한 스트레스이다. 상기 제초제는 바이피리디니움(bipyridinium) 염계열의 제초제인 것이 바람직하며, 이러한 계열의 제초제로는 파라쿼트(paraquat)와 다이쿼트(diquat) 등이 있다.

본 발명에서 사용된 용어 "환경 스트레스 저항성"은 상기와 같은 환경 스트레스에 의한 식물의 성장 저하 또는 생산성의 저하가 억제되거나 지연되는 형질을 말한다.

본 발명의 방법에 따라 식물체 내로 재조합 벡터를 도입하게 되면 *AIA* 유전자가 과발현된다. 상기에서 "유전자의 과발현"이란 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 *AIA* 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미한다.

상기 AIA 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상의, 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체 내에서 과다발현시 식물체의 한발 저항성을 증가시키는 활성을 의미한다.

상기 본 발명에 따른 AIA 단백질을 코딩하는 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있으며 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 DNA일 수 있다.

상기 AIA 단백질을 코딩하는 핵산은 적합한 발현 벡터 내로 삽입되어 식물세포를 형질전환 할 수 있다. "발현 벡터"라는 용어는 AIA 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 핵산 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. "작동 가능하게 연결(operably linked)"된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유

전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. "발현 조절 서열(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 상기에서 프로모터로는 식물체 내에 삽입 유전자를 과다 발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 상기 프로모터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터; 피크위트 모자이크 비루스(FMV)에서 유래한 전장 전사 프로모터 및 TMV의 코트 단백질 프로모터를 들 수 있다. 또한, 단자엽 식물이나 목본식물체에서 유전자를 과다발현하기 위해서는 유비퀴틴(ubiquitin) 프로모터를 사용할 수 있다. 식물 세포 내로 본 발명의 유전자를 도입시키기 위한 적합한 벡터로는 Ti 플라스미드 및 식물 바이러스 벡터가 있다. 상기 적합한 벡터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리벡터를 사용하는 것이 바람직하다. 당업자라면 본 발명에 따른 유전자의 핵산 서열을 도입시키는 데 적합한 벡터를 선택할 수 있다.

본 발명의 일 실시예에서는 CaMV 35S 프로모터와 NOS 터미네이터가 포함된 PBI121 벡터에서 GUS 유전자를 제거한 벡터 pBI111L에 *AIA* 유전자를 삽입하여 제조한 재조합 벡터 pBI111L-*AIA*가 예시되어 있다(도 4).

상기 재조합 벡터의 식물체로의 도입은 당분야에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 아그로박테리움(*Agrobacterium* sp.)-매개에 의한 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG(Polyethylenglycol)에 의한 침전법을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 아그로박테리움-매개에 의한 방법을 사용하여 본 발명의 재조합 벡터로 애기장대를 형질전환하였다.

또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조되고 조직 배양을 통해 재분화시킨 환경 스트레스 저항성 식물체를 제공한다.

보다 구체적으로 본 발명에 따른 환경 스트레스 저항성 식물체는 *AIA* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환한 다음 통상적인 방법에 따라 캘러스의 유도, 발근 및 토양 순화의 과정을 통해 획득할 수 있다. 즉, *AIA* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 식물의 절편체를 당업계에 공지된 적합한 배지에 치상한 다음 적정 조건으로 배양하여 캘러스의 형성을 유도하고, 신초가 형성되면 호르몬 무첨가 배지로 옮겨 배양한다. 약 2주 후 상기 신초를 발근용 배지에 옮겨서 뿌리를 유도한다. 뿌리가 유도된 다음 이를 토양에 이식하여 순화시킴으로써 환경 스트레스 저항성 식물체를 획득할 수 있다.

상기 본 발명에 따른 방법이 적용될 수 있는 식물체로는 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물이 포함된다. 상기 단자엽 식물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 벼, 밀, 보리, 죽순, 옥수수, 토란, 아스파라거스, 양파, 마늘, 파, 부추, 달래, 마 및 생강이 있다. 쌍자엽 식물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쪽잠, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두가 있다. 바람직하게는, 상기 한발 저항성 식물체는 애기장대일 수 있다.

또한, 본 발명의 *AIA* 유전자 및 단백질은 공지된 유전공학적인 방법을 사용하여 식물의 환경 스트레스 저항성과 관련된 형질 개선 및 타 식물체의 한발 저항성 조절 유전자의 탐색에 유용하게 이용될 수 있다. 예를 들면, DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응, 노던 블롯 분석, 서던 블롯 분석, 효소 면역 반응 및 2-D 겔 분석 등을 포함한 다양한 방법을 사용할 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 *AIA* 단백질의 활성 또는 유전자의 발현에 영향을 주는 물질을 동정하는 방법을 제공한다. 구체적으로 본 발명의 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양한 다음 본 발명의 단백질의 활성 또는 유전자 발현에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는 본 발명의 단백질의 활성 또는 유전자 발현에 영향을 주는 화합물을 동정하는 방법을 제공한다. 상기에서 본 발명에 따른 단백질의 활성 또는 유전자 발현에 영향을 준다는 것은 상기 단백질의 활성 또는 발현을 촉진시켜 식물의 환경 스트레스 저항성을 증가시키 것을 말한다. 후보물질이 본 발명의 단백질 또는 유전자 발현에 미치는 영향은 당분야에 공지된 노던 블롯 분석 및 웨스턴 블롯 분석 등을 통해 측정할 수 있다. 본 발명의 단백질 활성 또는 유전자 발현에 영향을 주는 화합물로는, 예를 들면, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드 모조물, 화합물 및 생물체제 등이 포함될 수 있다.

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다.

하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>**AIA 유전자의 cDNA 합성**

AIA 유전자의 cDNA는 애기장대의 잎으로부터 분리한 총 RNA를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행함으로써 제조하였다. 상기 총 RNA의 분리는 알앤이지플랜트 키트(RNeasy plant kit, Qiagen)를 사용하여 수행하였으며 프라이머는 공지된 유전자 서열(GenBank accession no: At1g53910)을 기초로 하여 디자인하였다. 보다 구체적으로, RT-PCR은 상기에서 분리한 총 RNA 500ng를 시료로 하고 하기의 프라이머와 원-스텝 RT-PCR 키트(Qiagen)를 사용하여 수행하였으며 조건은 50°C에서 30분, 95°C에서 15분 동안 반응시켜 역전사한 다음 상기 역전사 결과 수득된 cDNA를 주형으로 하여 94°C에서 30초, 60°C에서 30초 및 72°C에서 1분씩 24회 반복함으로써 PCR 증폭 산물을 수득하였다.

정방향 프라이머 AIA-ap3 : 서열번호 3

5'-ATGTGTGGAGCTATAATATCCGAT-3'

역방향 프라이머, AIA-jinw : 서열번호 4

5'-TCAGAAGACTCCTCCAATCATGGAAT-3'

<실시예 2>**야생형 애기장대에서 AIA 유전자의 발현 패턴 분석**

야생형 애기장대의 기관별 및 발달단계에 따른 AIA 유전자의 발현 패턴을 노던 블롯 및 RT-PCR을 사용하여 분석하였다.

<2-1> 노던 블롯 분석

토양에서 4주간 키운 야생형 애기장대의 뿌리(root), 로제트 잎(rosette), 줄기(stem), 경엽(cauline), 꽃(flower) 및 실리크(silique)로부터 알앤이지플랜트 키트(RNeasy plant kit, Qiagen)를 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 또한, 발아 후 4일 된 애기장대와 2주된 애기장대의 뿌리와 잎으로부터 각각의 총 RNA를 분리하였다.

노던 블롯을 수행하기 위하여 상기에서 분리한 RNA 10 μ g씩을 로딩버퍼(포름아미드 50%, 1 \times MOPS, 포름알데히드 2.2%)와 혼합한 다음 1% 포름알데히드 아가로스 젤(formaldehyde agarose gel)에 로딩하여 분리하고 20 \times SSC를 이용하여 나일론막(Hybond N+ membrane)으로 옮겼다. 상기 나일론 막을 가볍게 2 \times SSC로 세척한 후 200mJ 에너지로 크로스링크시켰다. 안정화된 나일론 막을 전혼성화 버퍼(prehybridization buffer, 1% BSA, 1mM EDTA(pH 8.0), 0.25M Na₂HPO₄(pH 7.2), 7% SDS)로 3시간 동안 전처리한 후 AIA 유전자에 특이적으로 표지된 탐침과 65°C에서 하룻밤 동안 혼성화하였다. 상기 탐침은 상기 실시예 1에서 제조한 AIA 유전자의 cDNA(서열번호 1)를 주형으로 하고 하기의 프라이머(서열번호 5 및 서열번호 6)를 사용하여 AIA 유전자의 3'UTR 부분을 PCR 증폭함으로써 제조하였으며 [α -³²P]dCTP를 사용하여 표지하였다.

정방향 프라이머: 서열번호 5

5'-CGTTGATGCTGGATGTAATGGGTAT-3'

역방향 프라이머 : 서열번호 6

5'-CCTGAGTCGTTACAGCATCTTCGTT-3'

혼성화가 완료된 다음 나일론막을 65°C에서 2 \times SSC와 0.1% SDS로 5분간 세척한 후 X선 필름에 노출시켜 방사선으로 감광된 밴드를 검출하였다.

실험 결과, *AIA* 유전자는 야생형 애기장대의 모든 기관에서 발현되는 것으로 나타났으며 특히, 뿌리와 꽃에서 다른 기관에 비해 상대적으로 높게 발현되는 것으로 나타났다(도 1).

또한, *AIA* 유전자는 발아 후 4일된 애기장대와 2주된 애기장대의 잎과 뿌리 모두에서 발현되는 것으로 나타났다(결과 미도시).

상기 실험 결과로부터 *AIA* 유전자는 식물의 모든 기관에 존재하면서 식물의 생활주기(life cycle) 전반에 걸쳐 특정한 기능을 수행할 것으로 추정되었다.

<2-2> RT-PCR 분석

상기 실시예 <2-1>에서 *AIA* 유전자가 애기장대의 꽃에 높게 발현된 결과를 토대로 애기장대 꽃의 발달단계에 따른 *AIA* 유전자의 발현 패턴을 RT-PCR로 분석하였다. 이를 위해 토양에서 4주간 키운 야생형 애기장대의 꽃으로부터 발달단계별(수정 전 5~6일, 수정 전 2~3일, 수정기, 수정 후 6~8일 및 수정 후 13~16일)로 실시예 1과 동일한 방법으로 총 RNA를 분리하고 RT-PCR을 수행하였다.

실험 결과, *AIA* 유전자는 수정 전에 가장 높게 발현되는 것으로 나타났으며 발달단계가 진행됨에 따라 그 발현정도가 점차 감소하는 것으로 나타났다(도 2).

<실시예 3>

식물 호르몬의 처리에 따른 애기장대 내 *AIA* 유전자의 발현 변화

애기장대를 MS 배지(MS염 2.15g, MES 0.5g, 수크로스 10g, 0.7% 피토아가, pH 5.7)에서 2주간 키운 다음 식물 호르몬인 ABA, 자스몬산(jasmonic acid) 및 에테폰(ethephon)이 각각 100 μ M씩 그리고 옥신(auxin), 지베렐린(gibberellic acid; GA)은 각각 10 μ M이 포함된 수용액을 스프레이 하였다. 그 다음 시간별(스프레이 후 30분, 2시간, 6시간, 10시간 및 24시간)로 애기장대의 유식물체(seedling)로부터 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법으로 총 RNA를 분리하고 노던 블롯을 수행하였다. 이때, ABA에 의해 그 발현양이 증가하는 것으로 알려진 *KIN2* 유전자를 양성 대조군으로 사용하였다.

실험 결과, ABA를 처리한 경우 2시간 후부터 애기장대 내 *AIA* 유전자가 초기 수준에 비해 높게 발현되다가 스프레이 후 24시간째에는 그 발현 정도가 초기 수준 정도로 감소하였다(도 3). 반면, 옥신, 지베렐린, 자스몬산 및 에테폰과 같은 호르몬을 처리한 경우에는 *AIA* 유전자의 발현 정도가 초기 수준과 큰 차이가 없었다(결과 미도시).

일반적으로 한발 저항성 관련 유전자들은 ABA의 처리에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 상기 실험 결과로부터 *AIA* 유전자도 식물의 한발 저항성과 관련이 있을 것으로 추정되었다.

<실시예 4>

AIA 유전자를 과발현하는 형질전환체의 제조

AIA 유전자가 식물체의 한발 저항성과 관련이 있는지를 확인하기 위하여, *AIA* 유전자가 과발현되는 형질전환체를 제조하였다.

<4-1> *AIA* 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 제조

AIA 유전자를 과발현하는 형질전환체를 제조하기 위하여 상기 실시예 1의 *AIA* 유전자의 cDNA를 제한효소 *Xba*I 및 *Xho*I으로 잘라서 CaMV 35S 프로모터와 NOS 터미네이터가 포함된 벡터인 pBI111L의 동일한 자리에 삽입하여 재조합 벡터 pBI111L-*AIA*를 제조하였다(도 4).

<4-2> 애기장대의 형질전환

상기 실시예 <4-1>의 *AIA* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 마이크로펄서(electroporator, Biorad)를 이용한 전기천공 방법으로 아그로박테리움 튜메파시엔스 C58C1(*Agrobacterium tumefaciens* C58C1)에 도입하였다. 그 다음 상기 아그로

박테리움 튜메파시엔스를 카나마이신(kanamycin), 겐타마이신(gentamycin) 및 리팜비신(rifampicin)의 최종농도가 각각 30 μ g/ml, 100 μ g/ml 및 100 μ g/ml씩 포함된 YEP 배지(배지 1 리터당 효모 추출물 10g, 펩톤 10g 및 NaCl 5g 포함됨)에서 배양하여 항생제 저항성을 나타내는 형질전환체를 선발하였다. 선발된 아그로박테리움 균주를 이용하여 플로랄 딥 방법(floral dip method)(Clough et al., *Plant J.*, 16(6):735-743, 1998)으로 야생형 애기장대(*Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0)를 형질전환하였다. 즉, *AIA* 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움 균주를 카나마이신, 겐타마이신 및 리팜비신이 포함된 YEP 배지 5ml에 접종하여 하루 동안 배양한 후, 500 μ l를 취하여 동일한 조건의 YEP 배지 500ml에 접종하고 600nm에서 흡광도가 2.0 이상이 되도록 배양하였다. 배양이 완료된 후 배양액을 원심 분리하여 침전된 세포를 수득하고 상기 세포를 인필터레이션 버퍼(MS 염 2.2g/L, 수크로스 50g/L, MES 0.5g/L, 벤질아미노퓨린 0.044M 및 Silwet L-77 200 μ l/L, pH 5.7)에 현탁하였다. 4주 동안 키운 애기장대를 이 현탁액에 5~7초 동안 3번 침수시킨 후 랩으로 덮은 후 24시간 동안 배양하였다. 상기와 같은 방법으로 형질전환된 애기장대를 계속 배양하여 다음세대의 종자를 수확하였다. 상기에서 수확한 종자를 카나마이신이 포함된 MS 배지에 파종하여 7일간 배양함으로써 카나마이신 저항성을 나타내는 식물을 8개 선발하였다.

<4-3> 형질전환된 애기장대의 RT-PCR

상기 실시예 <4-2>에서 선발된 9개의 애기장대를 토양으로 옮겨서 4주간 키운 다음 잎(rossette)을 채취하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 총 RNA를 분리한 후 RT-PCR을 수행함으로써 *AIA* 유전자의 과발현 여부를 조사하였다.

실험 결과, 9개의 형질전환체 중 6개에서 *AIA* 유전자 밴드가 나타났으며 이 중에서 11번 형질전환체의 밴드의 강도가 가장 큰 것으로 나타났다(도 5).

<4-4> 형질전환된 애기장대의 서던 블롯 분석

상기 실시예 <4-3>에서 *AIA* 유전자의 밴드가 검출된 6개의 형질전환체로부터 게놈 DNA를 추출하고 이를 이용하여 서던 블롯을 수행함으로써 *AIA* 유전자가 상기 형질전환체의 게놈 내로 삽입되었는지 여부를 분석하였다. 게놈 DNA를 추출하기 위하여 6주된 T1 형질전환체로부터 잎과 줄기 약 2g을 잘라낸 후 액체질소를 이용하여 분쇄한 다음 CTAB 버퍼[2% (w/v) CTAB(cetyltrimethylammonium bromide), 100mM Tris-HCl, pH8.0, 20mM EDTA, pH8.0, 1.4M NaCl 및 1% 폴리비닐피롤리돈(M.W. 40,000)] 10ml에 넣고 65 $^{\circ}$ C에서 3시간 가량 방치하였다. 반응이 끝난 후 동일량의 클로로포름(chloroform)을 조심스럽게 혼합한 후 3000rpm에서 50분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 튜브로 옮기고 2/3 부피의 아이소프로판올(Iso-propanol)을 첨가하여 혼합한 후 12000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 침전물을 70% 에탄올을 이용해 세척하고 TE 버퍼를 이용해 1차적으로 게놈 DNA를 추출하였다, 그리고 잔존하는 RNA를 제거하기 위해 RNase A(promega, USA)를 최종농도 10 μ g/ml이 되도록 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후 다시 에탄올 추출법을 이용해 순수한 게놈 DNA를 추출하였다. 서던 블롯을 위해 각 형질전환체로부터 수득한 게놈 DNA를 10 μ g씩 취하여 제한효소 *EcoRI*과 *PstI*으로 24시간 동안 자른 후 0.7% 아가로즈젤에 로딩하였다. 로딩이 끝난 아가로즈젤을 변성 버퍼(1.5M NaCl, 0.5N NaOH) 300ml에 침전시킨 후 30분간 가볍게 혼합한 다음 버퍼를 버리고 이차증류수로 아가로즈젤을 세척하였다. 다시 아가로즈젤을 중화 버퍼(1M Tris-HCl(pH7.5), 1.5M NaCl)에 30분간 침전시킨 후 상기 제시한 노던 블롯과 같은 방법으로 서던 블롯을 진행하였다. 크로스링크된 나일론 막을 서던블롯용 진혼성화 버퍼(1% SDS, 1M NaCl, 10% 텍스트란 설페이트)를 이용해 3시간 동안 전처리 시킨 후, 35S CaMV 프로모터에 특이적인 부분을 탐침으로 하여 65 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 혼성화 하였다. 상기 탐침은 벡터 pBI111L에 존재하는 35S CaMV 프로모터를 주형으로 하고 하기의 프라이머를 사용하여 PCR을 이용해 증폭하였으며 [α -³²P]dCTP를 사용하여 표지하였다.

정방향 프라이머: 서열번호 7

5'-CTAACTGCATCAAGAACACAGAGAA-3'

역방향 프라이머 : 서열번호 8

5'-AGATATCACATCAATCCACTTGCTT-3'

혼성화가 완료된 다음 나일론막을 65 $^{\circ}$ C에서 2 \times SSC와 0.1% SDS로 5분간 세척한 후 X선 필름에 노출시켜 방사선으로 감광된 밴드를 검출하였다.

실험 결과, 2번, 4번 및 11번 형질전환체의 경우 약한 밴드가 종종 나타나지만 강한 하나의 밴드가 나타남을 볼 수 있었다(도 6). 따라서, *AIA* 유전자는 애기장대의 게놈에서 단일-카피(single-copy) 유전자로 존재함을 알 수 있었다.

<실시예 5>

AIA 유전자 활성이 억제된 돌연변이체의 제조

<5-1> 동형접합 돌연변이체의 제조

AIA 유전자가 식물체의 한발 저항성과 관련이 있는지를 확인하기 위하여, *AIA* 유전자 활성이 억제된 동형접합 돌연변이체를 제조하였다. 이를 위해 *AIA* 유전자의 프로모터 부분에 T-DNA가 삽입된 종자(Salk_019187)를 솔크(<http://signal.salk.edu-bin/tdnaexpress>)로부터 입수하였다(도 7a). 상기 종자를 카나마이신이 포함된 MS 배지에 파종하고 2주 후에 토양에 이식하고 2주간 더 키운 후 잎으로부터 게놈 DNA를 분리하였다. 상기 게놈 DNA의 분리는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 애기장대의 잎 2장을 E-튜브에 넣은 후 액체질소를 넣고 플라스틱 탐침을 이용해 초핑(chopping)한 다음 여기에 추출버퍼[100mM Tris-HCl(pH8.5), 50mM EDTA(pH8.5) 및 500mM NaCl] 500 μ l와 20% SDS 35 μ l를 첨가하고 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치하였다. 여기에 다시 5M KOAc 130 μ l를 첨가한 후 얼음에 5분간 방치하고 15000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 수득된 상층액을 새로운 튜브에 옮긴 후 아이소프로판올(Isopropanol) 640 μ l와 3M NaOAc 60 μ l를 첨가 다음 -20 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하고 15000rpm으로 10분간 원심분리하였다. DNA 침전물을 70% 에탄올로 세척한 다음 이차증류수로 게놈 DNA를 추출하였다. 상기와 같은 방법으로 수득한 게놈 DNA를 주형으로 하고 하기의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 다음 수득한 PCR 증폭산물을 전기영동함으로써 T-DNA가 삽입된 동형접합 돌연변이체를 선별하였다. PCR 증폭시 사용한 프라이머로는 T-DNA 내부 위치 프라이머 LB, 주변 게놈에 위치한 정방향 프라이머 LP 및 역방향 프라이머 RP를 사용하였다(도 7b). 상기에서 PCR 증폭 조건으로는 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분씩 35회 반복하였다. 또한, 동일한 조건 하에서 T-DNA 내부 위치 프라이머를 제외하고 게놈의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머만을 사용하여 PCR 증폭하고 이를 전기영동하였다.

LB 프라이머 : 서열번호 9

5'- GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'

LP 프라이머 : 서열번호 10

5'-TGTTAAATATCTGTTCTGCGTTGGC-3'

RP 프라이머 : 서열번호 11

5'-AACCAATTC AATCGCTCAAAC-3'

상기와 같은 방법에 따라 세 종류의 프라이머를 모두 사용하여 전기영동하면, 야생형의 경우에는 900 bp 크기(LP에서 RP까지)의 하나의 밴드가 검출된다. 동형접합 돌연변이체의 경우에는 410+ N bp(N=0~300)(RP에서부터 300+ N개의 염기와 LB에서부터 벡터의 왼쪽 경계면의 110개의 염기)크기의 하나의 밴드가 검출되며 T-DNA가 삽입된 전체 게놈의 증폭산물은 그 크기가 너무 커서 전기영동시 검출되지 않는다. 이형접합 돌연변이체의 경우에는 염색체의 한 가닥은 야생형과 동일하고 나머지 한 가닥에만 T-DNA가 삽입되어 있기 때문에 900 bp 크기의 하나의 밴드와 410+ N bp 크기의 밴드가 모두 검출된다(도 7b).

한편, T-DNA 내부 위치 프라이머를 제외하고 주변 게놈에 위치한 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 전기영동하면 야생형의 경우에는 900bp 크기의 하나의 밴드가 검출되나 T-DNA가 삽입된 게놈을 가진 돌연변이체의 경우에는 증폭산물의 크기가 너무 커서 전기영동시 검출되지 않는다.

상기와 같은 방법과 원리에 따라 세 종류의 프라이머를 모두 사용하여 PCR 증폭하고 전기영동한 결과, 총 14개의 식물계통 중 12개의 동형접합 돌연변이체가 선별되었다(도 7c). 한편, T-DNA 내부 위치 프라이머를 제외하고 주변 게놈에 위치한 프라이머만을 사용하여 PCR 증폭한 산물의 전기영동 결과는 야생형의 경우에서만 900bp 크기의 밴드가 검출되었다(도 7c).

상기에서 선발한 12개의 돌연변이체로부터 다음 세대의 종자를 수확한 후 이를 카나마이신이 포함된 MS 배지에 파종하여 카나마이신에 저항성을 가지는 돌연변이체를 최종적으로 선발하고 이를 *aia*라고 명명하였다(도 8).

<5-2> 동형접합 돌연변이체의 *AIA* 유전자의 발현 정도 측정

상기 <5-1>에서 선발한 돌연변이체(*aia*)를 토양에서 4주간 생육시킨 다음 잎으로부터 총 RNA를 분리하고 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법으로 노던 블롯을 수행하여 *AIA* 유전자의 발현 정도를 측정하였다.

실험 결과, 동형접합 돌연변이체(*aia*)의 *AIA* 유전자의 발현 정도는 야생형에 비해 매우 낮게 나타났으며, 동형접합 돌연변이체의 RNA를 야생형에 비해 4배로 높은 농도로 로딩하는 경우에 야생형과 비슷한 수준의 발현 정도를 나타냈다(도 9). 따라서, 상기 동형접합 돌연변이체에서 *AIA* 유전자의 발현이 억제되었음을 확인할 수 있었다.

<실시예 6>

***AIA* 유전자가 과발현된 형질전환체의 한발 저항성 조사**

<6-1> 한발 스트레스에 따른 생육상태 비교

토양에 야생형 애기장대, 상기 실시예 <4-2>의 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체 및 상기 실시예 <5-1>의 돌연변이체를 계속 배양하여 다음세대의 종자를 수확하였다. 상기 각각의 종자를 토양에 100여개씩 파종한 후 장일조건(16시간 광/8시간 암)으로 23℃에서 2주간 생육시켰다. 그 다음 열흘간 물 공급을 중단하여 한발 스트레스를 가한 후 물을 재공급하고 이틀 후의 생육상태를 관찰하였다.

실험 결과, 야생형 애기장대와 동형접합 돌연변이체는 80% 이상이 고사하는 것으로 나타났다. 반면, *AIA* 유전자 과발현 형질전환체는 대부분이 생존하는 것으로 나타났다(도 10).

<6-2> 각 식물의 증산율 비교

본 발명에 따른 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체의 한발 저항성을 보다 구체적으로 조사하기 위하여 야생형 애기장대, 실시예 <4-2>의 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체 및 실시예 <5-1>의 돌연변이체를 2주간 생육시킨 다음 3, 4, 5번 잎을 각각 잘라 3M 페이퍼 위에 잎의 뒷면(abaxial side)이 위로 오게 하여 1시간 간격으로 6시간 동안 잎의 무게를 측정함으로써 시간의 경과에 따른 증산율을 비교하였다.

실험 결과, *AIA* 유전자 과발현 형질전환체는 야생형과 돌연변이체에 비해 수분손실이 적은 것으로 나타났다. 즉, 6시간 후에 상기 형질전환체의 잎무게는 초기 질량의 약 70% 정도를 유지하는 것으로 나타난 반면, 야생형과 돌연변이체는 약 50% 이하로 감소되는 것으로 나타났다(도 11).

따라서, 본 발명에 따른 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체는 야생형이나 *AIA* 유전자의 발현이 억제된 돌연변이체에 비해 증산 작용이 억제되어 한발 스트레스에 대한 저항성이 증가됨을 확인할 수 있었다.

<실시예 7>

***AIA* 유전자가 과발현된 형질전환체의 제초제 저항성 조사**

AIA 유전자가 식물의 제초제 저항성과 관련이 있는지를 확인하기 위하여, 제초제의 처리에 따른 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체의 엽록소 분해 정도를 야생형 및 *AIA* 유전자 발현이 억제된 돌연변이체의 경우와 비교하여 조사하였다.

제초제인 파라쿼트(paraquat, methyl viologen) 6μM을 함유한 MS 배지에 4주 동안 생육시킨 야생형 애기장대, 상기 실시예 <4-2>의 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체 및 상기 실시예 <5-1>의 돌연변이체의 잎을 띄워놓고 연속 광 조건으로 23℃에서 72시간 배양시켰다. 대조군에는 메틸 비올로겐이 함유되지 않은 MS 배지를 사용하였다. 상기 메틸 비올로겐은 상품명 그라목손으로 잘 알려진 비선택적 제초제로서 엽록소를 가지고 있는 모든 식물을 고사시킬 뿐 아니라, 인체에 흡수될 경우 치명적인 문제를 일으킬 수 있는 독성물질이다.

제조제 스트레스에 의한 엽록소 분해정도는 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 먼저, 상기에서 배양이 완료된 각 식물체의 잎 2g을 채취하여 0.1g CaCO₃와 함께 85% 아세톤을 조금씩 첨가하면서 막자사발에서 분쇄한 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 분리한 후 공지된 방법으로 엽록소를 정량하였다(Cunniff, P.A. Plant in Official Method of Analysis, vol1, 16th ed., pp26-28, 1995).

실험 결과, 제조제를 함유한 배지에서 배양한 경우 야생형 애기장대와 동형접합 돌연변이체는 대조군에 비해 60% 이상의 엽록소가 분해되는 반면, *AZA* 유전자 과발현 형질전환체는 이들보다 10~20% 정도 손실이 덜 한 것으로 나타났다(도 12a 및 도 12b).

발명의 효과

이상, 상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이 본 발명에 따른 *AZA* 유전자는 환경 스트레스에 의해 유도되는 유전자로서 식물체 내에서 과발현 되도록 함으로써 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 야생형 애기장대의 각 기관에 따른 *AZA* 유전자의 발현 패턴을 노던 블롯으로 분석한 결과이다.

도 2는 야생형 애기장대의 꽃의 발달단계에 따른 *AZA* 유전자의 발현 패턴을 RT-PCR로 분석한 결과이다.

M: 분자량 마커

I: 꽃눈 형성기(수정 전 5~6일)

II: 수정 및 개화기 I(수정 전 2~3일)

III: 수정 및 개화기 II(수정기)

IV: 실리크 발달기(수정 후 6~8일)

V: 실리크 완성기(수정 후 13~16일)

도 3은 식물 호르몬 ABA를 애기장대에 처리하고 시간의 경과에 따라 *AZA* 유전자의 발현 패턴을 노던 블롯으로 분석한 결과이다.

도 4는 본 발명에 따른 *AZA* 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 개열지도를 도시한 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 *AZA* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 RT-PCR 분석 결과이다.

W: 야생형 애기장대, M: 분자량 마커

도 6은 본 발명에 따른 *AZA* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 노던 블롯 분석 결과이다.

W: 야생형 애기장대

도 7a는 *AZA* 유전자의 프로모터 부분에 삽입되는 T-DNA의 위치를 도시한 것이다.

도 7b는 *AZA* 유전자의 활성이 억제된 동형접합 돌연변이체의 선별을 위해 디자인한 프라이머 및 상기 프라이머에 의해 증폭되는 산물의 크기를 나타낸 것이다.

WT: 야생형, HZ: 이형접합 돌연변이체, HM: 동형접합 돌연변이체

도 7c는 PCR을 이용하여 *AIA* 유전자의 활성이 억제된 동형접합 돌연변이체를 선발한 결과이다.

A: T-DNA 내부 위치 프라이머, 주변 계놈에 대한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 모두 사용하여 PCR 증폭한 결과이다.

B: T-DNA 내부 위치 프라이머를 제외하고 주변 계놈에 대한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머만을 사용하여 PCR 증폭한 결과이다.

도 8은 PCR을 이용하여 선발한 *AIA* 유전자의 활성이 억제된 동형접합 돌연변이체의 다음 세대 종자를 카나마이신이 포함된 MS 배지에서 과중하여 카나마이신에 저항성을 가지는 돌연변이체를 최종적으로 선발한 결과이다.

A: 야생형 애기장대

B: 카나마이신에 저항성을 가지는 동형접합 돌연변이체

C: 카나마이신에 저항성을 가지는 동형접합 돌연변이체

D: 카나마이신에 저항성을 가지는 동형접합 돌연변이체

도 9는 본 발명의 방법에 따라 선발한 동형접합 돌연변이체의 *AIA* 유전자의 발현 정도를 노던 블롯으로 분석한 결과이다.

A: 야생형 애기장대(RNA 로딩양 10 μ g)

B: 동형접합 돌연변이체(RNA 로딩양 10 μ g)

C: 동형접합 돌연변이체(RNA 로딩양 40 μ g)

도 10은 한발 스트레스에 따른 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체, 동형접합 돌연변이체 및 야생형 애기장대의 생육상태를 비교한 사진이다.

A: 야생형 애기장대

B: 동형접합 돌연변이체

C: 과발현 형질전환체 1

D: 과발현 형질전환체 2

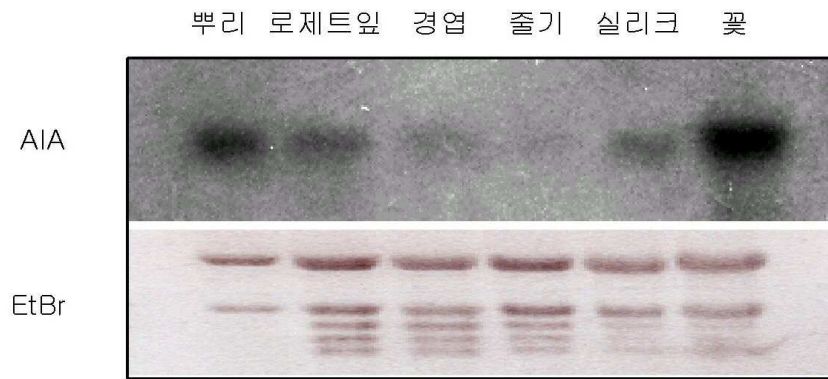
도 11은 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체, 동형접합 돌연변이체 및 야생형 애기장대의 시간의 경과에 따른 잎의 무게를 측정된 결과이다.

도 12a는 제초제의 처리에 따른 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체, 동형접합 돌연변이체 및 야생형 애기장대의 엽록소 분해 정도를 비교한 사진이다.

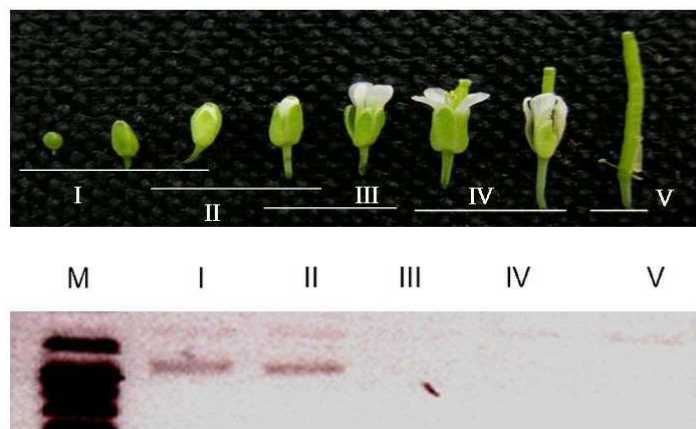
도 12b는 제초제의 처리에 따른 *AIA* 유전자 과발현 형질전환체, 동형접합 돌연변이체 및 야생형 애기장대의 엽록소를 정량한 결과이다.

도면

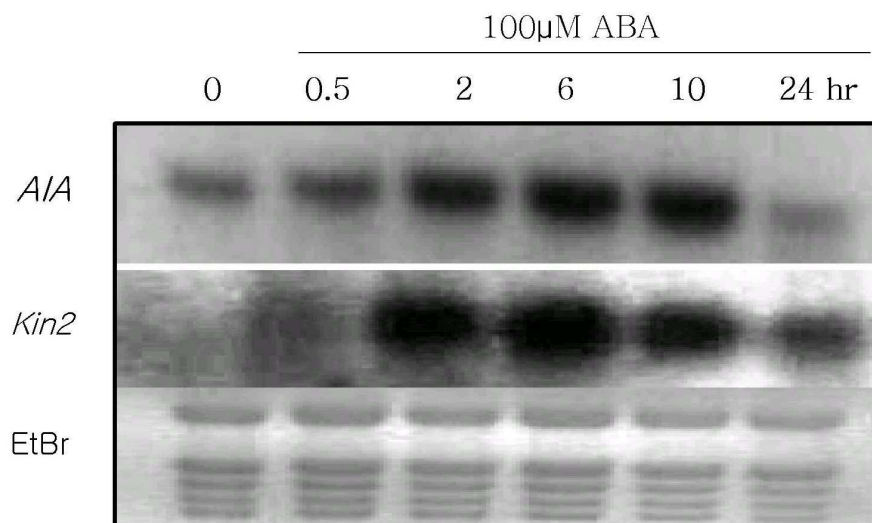
도면1



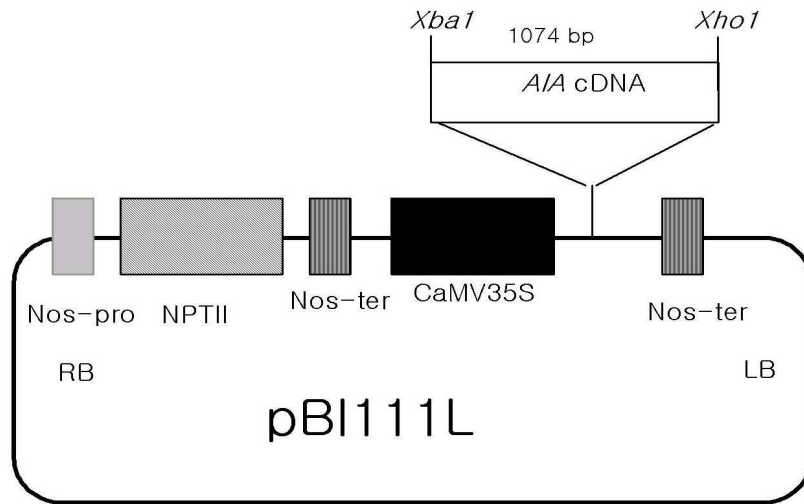
도면2



도면3



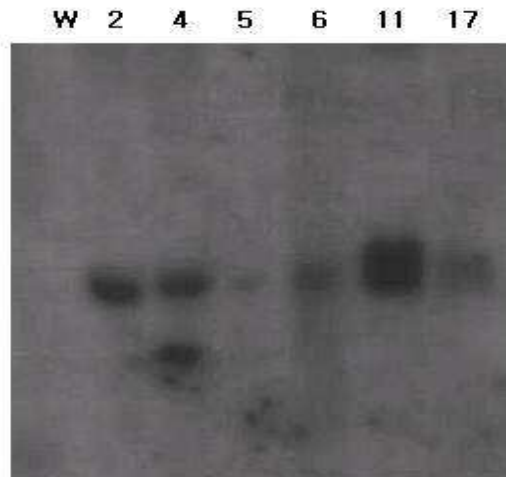
도면4



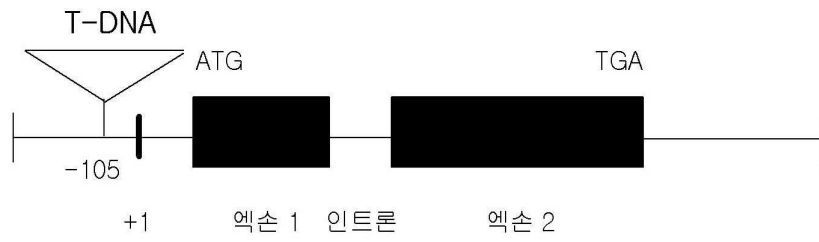
도면5



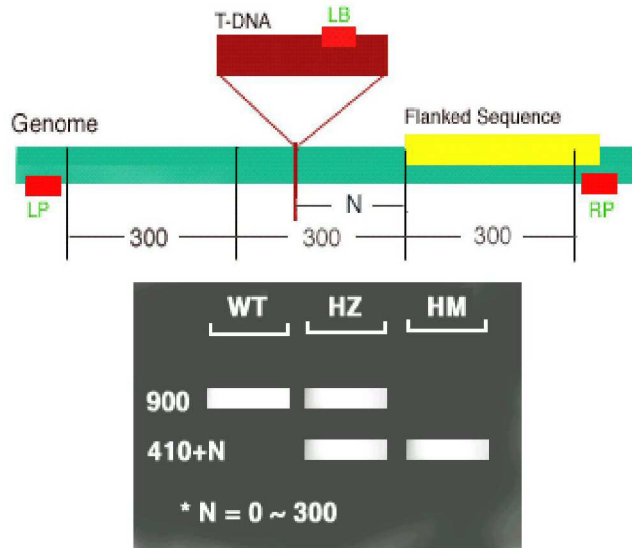
도면6



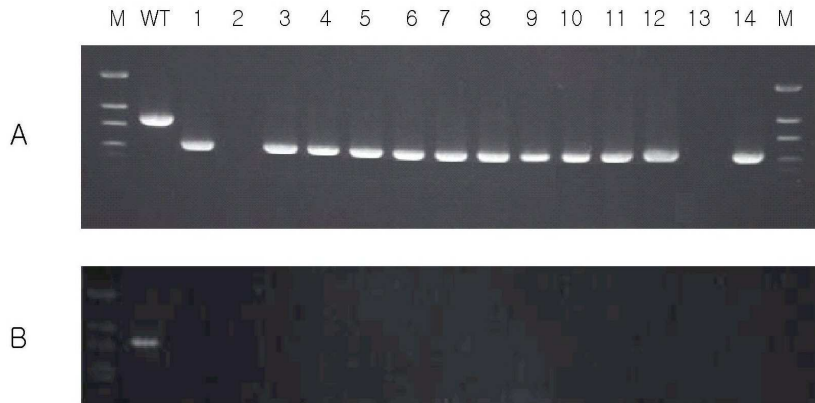
도면7a



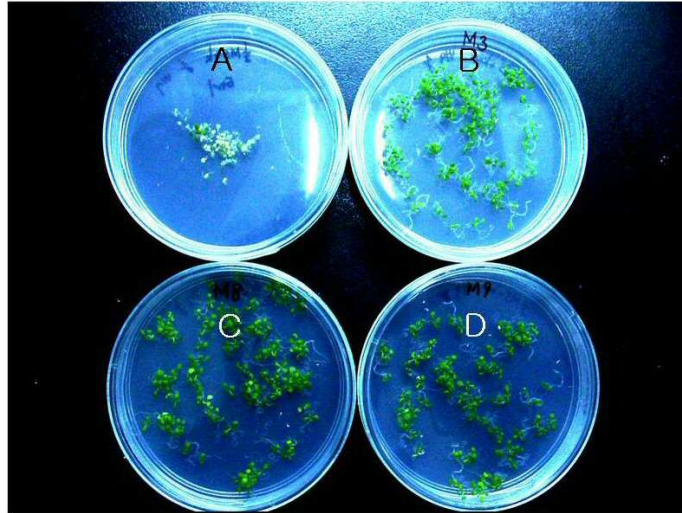
도면7b



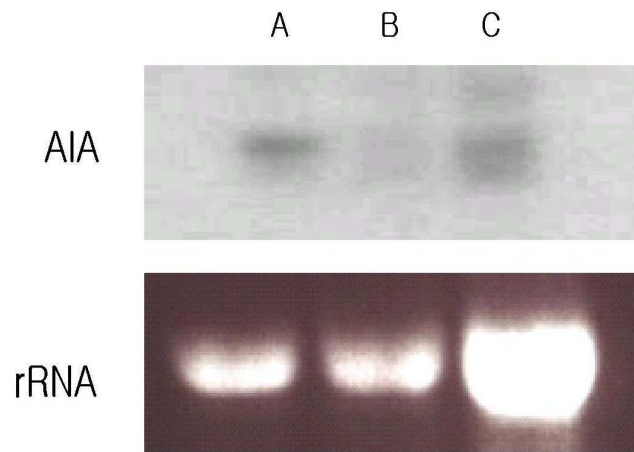
도면7c



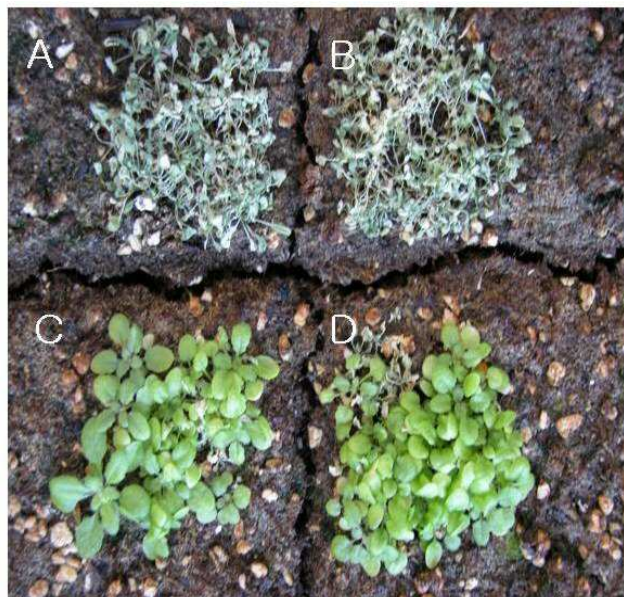
도면8



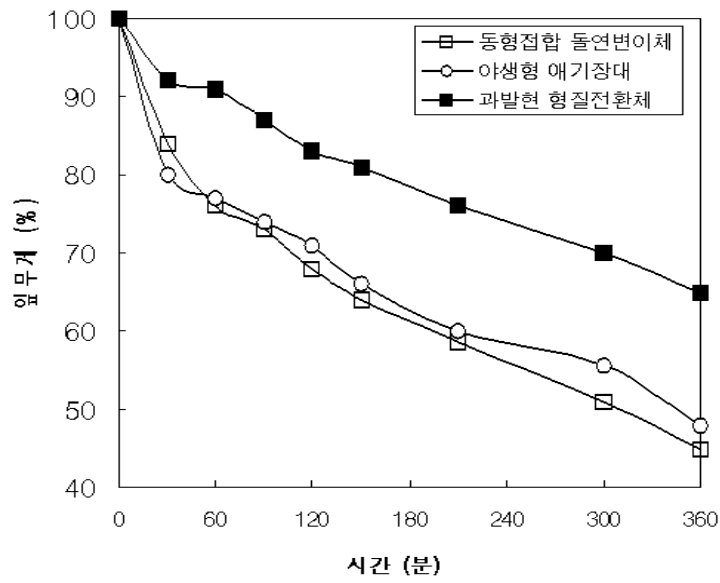
도면9



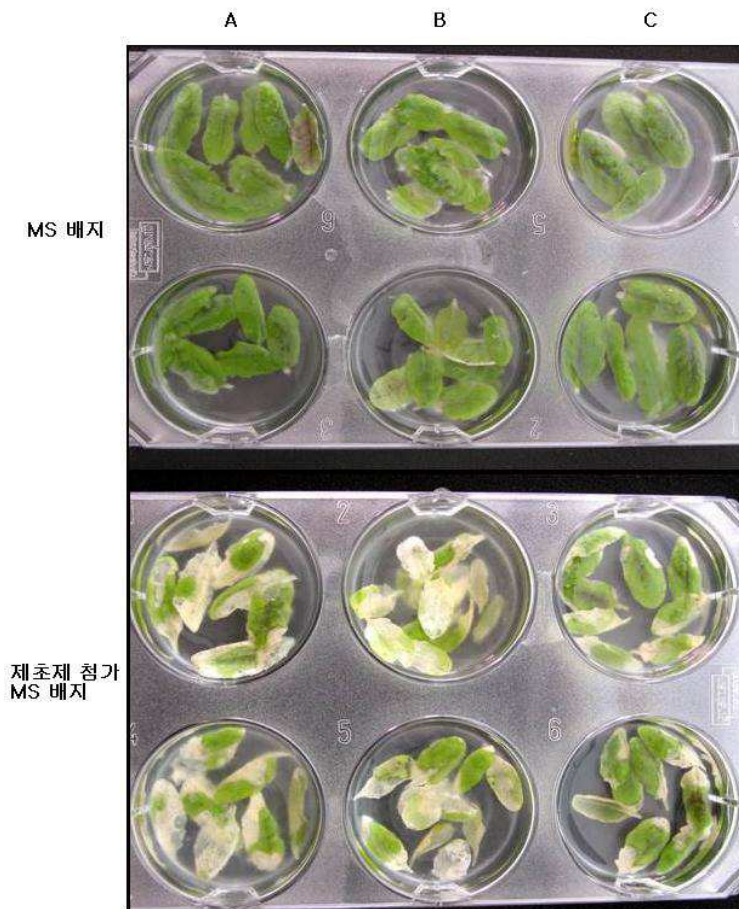
도면10



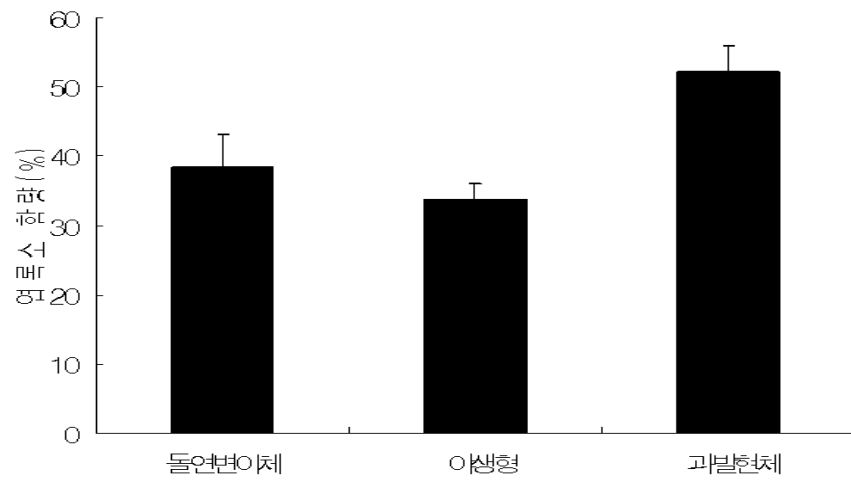
도면11



도면12a



도면12b



서열목록

서열목록 전자파일 첨부