

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> C12N 15/52	(45) 공고일자 2000년02월01일	(11) 등록번호 10-0243996	(24) 등록일자 1999년11월19일
(21) 출원번호 10-1992-0013674	(65) 공개번호 특1993-0002512	(43) 공개일자 1993년02월23일	
(22) 출원일자 1992년07월30일			
(30) 우선권주장 07/737,851 1991년07월31일 미국(US)			
(73) 특허권자 아메리칸사이아나미드컴파니	미합중국 뉴저지매디슨파이브지랄다-팜츠 가브리엘엘프리트디이트리히		
(72) 발명자	미합중국 뉴저저어지주 08543 록키 힐시 메리트 레인 11 차순영, 차윤근		
(74) 대리인	차순영, 차윤근		

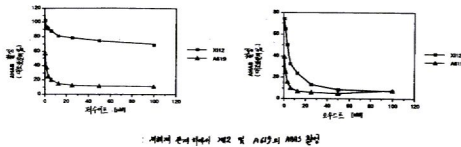
심사관 : 김형준

(54) 이미다졸리논-특이적 내성 AHAS 서열 및 상기 내성을 수여하는 방법

요약

본 발명은 이미다졸리논 제조체에 대해 특이적으로 내성이 있는 돌연변이 AHAS 효소를 암호하는 단자엽 식물 유전자에 관한 것이다. 이들 유전자의 예는 야생형 AHAS 효소의 621번 위치에서의 아미노산 치환물을 암호하는 옥수수 DNA 서열이다. 돌연변이 유전자를 사용하여 다른 식물을 제초제내성이 되도록 형질전환시킬 수 있다. 이 점에 관해서, 본 발명은 또한 숙주 세포 및 상기 유전자를 갖는 벡터를 제공하고, 이 세포 및 벡터는 형질전환방법에서 유용하다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

이미다졸리논-특이적 내성 AHAS 서열 및 상기 내성을 수여하는 방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 이미다제타피르 (퍼수이트 A; Pursuit<sup>TM</sup> A) 또는 클로로솔푸론(오우스트 B; Oust<sup>TM</sup> B) 존재하에서 10일된 메이즈(maize) 묘종(옥수수 라인 A619 또는 XI12)의 AHAS 효소 활성을 보여준다. 제초제내성 AHAS활성은 저해제의 부재하에서 AHAS 활성의 백분율로서 계산된다. 실험간의 표준 오차는 10%이다.

제2도는 파지 EMBL3 게놈 클론의 서던 분석이다. 파지 12-1A(W22로부터), 12-7A, 18-8A, 12-11 및 12-17A(XI12로부터)를 XbaI 또는 SalI으로 소화시키고, 1% 아가로스겔 상에서 분리하고, 니트로셀룰로오스 상으로 이동시키고 표지자로서 AHAS cDNA 단편과 교잡시킨다.

제3도는 옥수수 라인 XI12, XA17, QJ22, AI88 및 B73으로부터의 게놈 DNA의 서던 분석이다. 상기 DNA를 XbaI으로 소화시키고, 1% 아가로스겔 상에서 분리하고, 니트로셀룰로오스 상으로 이동시키고 표지자로서 AHAS cDNA단편과 교잡시킨다.

제4도는 플라스미드 pCD8A의 제한지도이다. XI12로부터의 돌연변이 AHAS 유전자를 8kb PstI 단편으로서 벡터 pKS(+)에 서브클로닝했다. AHAS 유전자의 위치 및 배향은 화살표로 표시된다. PstI, XhoI, HindIII, XbaI, SalI 및 ClaI의 제한부위는 기호로 나타낸다.

제5도는 아미노산 614 내지 633 지역에서 AHAS 클론 W22/4-4, B73/10-4 및 XI12/8A의 비암호 가닥(A) 및 이중가닥 DNA 서열(B)의 뉴클레오티드 서열화겔이다. 시토신에서 티미딘으로의 변환 위치가 화살표로 표시된다.

제6도는 XI12/8A 돌연변이 AHAS 유전자의 뉴클레오티드 및 추정되는 아미노산 서열이다.

제7도는 XI12/8A, B73/7-4 및 W22/1A aIs 2 유전자의 뉴클레오티드 서열 선열이다. (\*)는 621 위치에서의 돌연변이를 일으키는 염기변화로, (#)는 B73/7-4 서열과의 차이를 표시하고, (>)는 침묵 변화를 나

타낸다.

제8도는 X112/8A, B73/7-4 및 W22/1A als 2 유전자의 아미노산 서열 및 선열이다. (\*)는 621 위치에서의 돌연변이를 표시하고, (#)는 B73/7-4서열과의 차이를 표시하고(>)는 침묵 변화를 나타낸다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 아세토하이드록시산 신타제효소(acetohydroxy acid synthase enzyme; 이하 AHAS)의 신규한 변이 형태를 암호하는 신규한 DNA 서열에 관한 것이다. AHAS 효소는 여러 가지 식물 및 광범위한 미생물에서 일상적으로 생산되는 중요한 효소이다. 정상 AHAS 기능은 이미다졸리논 제조제에 의해서 억제된다. 그러나, 돌연변이 DNA 서열에 의해서 암호된 새로운 AHAS 효소는 이미다졸리논 제조제내재하에서도 정상적으로 촉매적 기능을 하므로, 그들을 함유하는 식물 또는 미생물에 제조제내성을 수여한다.

신규한 DNA 서열은 옥수수로부터 유래되며 정상 AHAS 서열의 621위치에서 아미노산 치환물을 갖는다. AHAS 유전자 서열에서의 이러한 치환은 완전한 기능의 효소를 결과시키나, 여러 가지 이미다졸리논 제조제에 의한 억제에 대해 효소를 특이적으로 내성이 되게 한다. 이 변이 서열의 유용성은 다른 유형의 유전자 형질전환 실험에서 사용하기 위한 신규의 선택성 표식을 제공할 뿐 아니라, 여러 가지 농작물의 이미다졸리논 제조제내성으로의 형질전환을 위한 도구를 제공한다. 농업에서 제조제의 사용은 이제 널리 퍼져 있다. 잡초를 효과적으로 멸절시키는 수많은 유용한 화합물이 있지만, 모든 제조제들이 바람직하지 않은 식물을 농작물보다 우선적으로 표적화할 수 있는 것은 아니며, 또한 동물에게 비독성인 것도 아니다. 종종, 잡초보다 농작물에 대해 단순히 덜 독성이 있는 화합물로 만족하는 것이 필요하다. 이 문제점을 극복하기 위해서, 제조제내성 농작물의 개발이 농업 연구의 주요초점이 되어 왔다.

제조제내성 개발의 중요한 면은 제조제표적에 대한 이해이고, 다음에 농작물이 영향을 받는 생화학적 경로를 조작하여 식물이 정상 생화학적 기능을 보유하면서 억제효과를 피하도록 하는 것이다. 제조제의 생화학적 기작의 첫 번째 발견 중 하나는 구조적으로 무관한 일련의 제조제화합물인, 이미다졸리논, 술폰일우레아 및 트리아졸로 피리미딘에 관한 것이다. 이제는 이들 각각의 제조제가 식물 성장에 필요한 필수효소인 아세토하이드록시산 신타제(AHAS : 또한 아세토락테이드 신타제, 또는 ALS라 함)와의 충돌에 의해서 식물 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다(샤너 일동, Plant Physiol, 76 : 545-546, 1984 ; 미합중국 특허 제4,761, 373호). AHAS는 아미노산 이소류신, 류신 및 발린의 합성에 필요하다.

AHAS 효소는 효모 사카로마이세스 세레비시아(Saccharomyces cerevisiae) 및 장내 세균 에세리시아 콜리(Escherichia coli) 및 살모넬라 티피무리움(Salmonella typhimurium) 같은 여러 가지 미생물에서 발견될 뿐 아니라, 고등식물 전체에 존재하는 것으로 알려져 있다. 많은 이들 중에서 정상 AHAS 생산에 관한 유전적 기초 또한 잘 규명되어 있다. 예컨대, 이, 콜리 및 에스, 티피무리움 둘다에는 세 개의 AHAS 아이소짐이 존재한다. 이들중 둘은 제조제에 대해 감수성이고, 세 번째는 아니다. 이들 아이소짐 각각은 한 개의 크고 한 개의 작은 단백질 서브유니트를 가지며 IlvIH, IlvGM 및 IlvBN 오페론에 위치한다. 효모에서, 하나의 AHAS 아이소짐은 ILV2 좌위에 위치했다. 각 경우에, 감수성 및 내성 형태가 확인되었고 여러 가지 대립형질의 서열이 결정되었다(프리덴 이동, Nucl. Acid Res. 13 : 3979-3993, 1985 ; 로오더 일동, PNAS USA 78 : 922-928, 1982 ; 스콰이어즈 일동, Nucl. Acids Res 811 : 5299-5313, 1983 ; 웨일 일동, Nucl. Acids Res 13 : 4011-4027, 1985 ; 팔코 및 듀마스, Genetics 109, 21-35, 1985 ; 팔코 일동, Nucl. Acids Res 13 : 4011-4027, 1985).

담배에서, AHAS 기능은 두 개의 연결안된 유전자, SuRA 및 SuRB에 의해서 암호된다. N 말단의 추정되는 운반 지역은 보다 실질적으로 다르지만, 성숙 단백질에서의 뉴클레오티드 수준 및 아미노산 수준 모두에, 두 유전자 간에 실질적인 동일성이 있다 ( 리 일동, EMBO J. 7 : 1241-1248, 1988). 다른 한편으로, 아리비옵시스(Ar abidopsis)는 하나의 AHAS 유전자를 가지며, 또한 완전히 서열화되어 있다(마주르 일동, Plant Physiol. 85 : 1110-1117, 1987). 고등식물에서 AHAS 유전자 서열간의 비교는 서열의 특정 지역의 고도의 보존을 나타낸다. 구체적으로, 적어도 10 지역의 서열 보존이 존재한다. 이들 보존 지역은 효소의 기능에 증대하고 그 기능의 보유는 실질적인 서열 보존에 달려있음은 이미 추측된 바 있다.

제조제내성을 나타내는 돌연변이체는 하나 이상의 이들 보존 지역에 적어도 하나의 아미노산에서 돌연변이물을 가짐에 최근에 보고되었다(미합중국 특허 제5,013,659호). 특히, AHAS 단백질서열의 이들 특정 부위에서 야생형 아미노산 대신 특정한 아미노산의 치환은 허용되는 것으로 나타났고, 촉매 기능을 보유하면서, 실제로 이 돌연변이를 갖는 식물의 제조제내성을 경과시킨다. 거기에 기술된 돌연변이물은 이미다졸리논 및 술폰일우레아에 관한 교차내성 또는 술폰일우레아-특이적 내성을 암호하나, 이미다졸리논-특이적 돌연변이물은 공개되지 않았다. 이들 돌연변이물은 담배의 SuRA 및 SuRB 좌위 둘다에 존재하는 것으로 나타났다. 유사한 돌연변이물이 아라비도시스 및 효모에서 분리되었다.

이미다졸리논-특이적 내성은 그밖의 다른 많은 식물에서 보고되었다. 미합중국 특허 제4, 761,373호는 변경된 AHAS를 식물에서 제조제내성의 근거로서 일반적으로 기술하였고, 특정한 이미다졸리논 내성 옥수수 수라인을 구체적으로 공개하였다. 하우프 일동(Mol. Gen. Genet. 211 : 266-271, 1988)은 아라비도시스에서 유사한 표현형의 발생을 공개하였다. 사타시반 일동(Nucl. Acid Res. 18 : 2188, 1990)은 정상 AHAS 서열의 653위치에서의 돌연변이를 기초로한 아라비도시스에서의 이미다졸리논-특이적 내성을 확인하였다. 본 발명에 따라서, 이제 단자엽식물에서 이미다졸리논-특이적 내성을 암호하는 유전자가 분리되었고 야생형 단자엽식물의 AHAS 아미노산 서열에서 하나의 아미노산 치환물과 관련되는 것으로 결정되었다.

본 발명은 이미다졸리논 제조제에 불감수성인 단자엽식물의 기능적 AHAS 효소를 암호하는 신규의 핵산 서열을 제공한다. 문제의 서열은 옥수수(메이즈) AHAS 서열의 621위치에서 아미노산 세린을 암호하는 코돈에서, 또는 다른 단자엽식물 서열의 상응하는 위치에서의 돌연변이물을 포함한다. 또한 밀과 같은 다른 단자엽식물이 이미다졸리논 특히 돌연변이를 나타내는 것으로 알려져 있다(예, ATCC 번호 40994-97). 옥수수에서, 야생형 서열은 이 위치에 세린을 갖는다. 적절한 구체예에서, 치환물은 세린대신 아

스파라긴이나, 세린 대신 별도의 치환물은 아스파르트산, 글루탐산, 글루타민 및 트립토판을 포함한다. 청구된 서열들은 원래 단자엽식물로부터 유래되지만, 신규 서열은 임의 유형의 식물에서 아미다졸리논 내성세포를 생산하는 방법에서 유용하고, 상기 방법은 표적 식물세포를 여기에서 제공된 하나 이상의 변경된 서열로 형질전환시킴을 포함한다. 대안적으로, 돌연변이의 유발은 이미다졸리논 불감수성 AHAS를 암호하는 핵산서열을 갖는 식물세포 또는 종자에서 돌연변이체를 생성하기 위해 이용된다. 조직 배양에서 분리된 돌연변이 식물세포의 경우에, 그런다음 이미다졸리논 내성 또는 불감수성 형질을 갖는 식물이 재생된다. 이리하여 본 발명은 또한 돌연변이 핵산서열을 가지며 기능적 이미다졸리논 내성 AHAS 효소를 발현하는 식물세포, 세균세포, 진균세포, 식물조직배양물, 성체 식물, 및 식물종자를 포함한다. 이들 신규의 제초제내성식물의 유용성은 이미다졸리논 존재 하에서 농작물을 성장시키는 새로운 방법을 가능케 한다. 내성없는 식물을 성장시키는 대신, 본 발명의 돌연변이 서열로 돌연변이시키거나 형질전환시켜 생성된 내성 식물을 밭에 심고, 농작물에 대한 결과되는 해가 없이 상기 밭을 이미다졸리논으로 일상적으로 처리할 수 있다.

또한 본 발명의 돌연변이 핵산은 형질전환 실험에서 사용하기 위한 신규의 선택성 표식을 제공한다. 내성 AHAS를 암호하는 핵산서열은 숙주세포로 이동하기 전에 두 번째 유전자에 연결시키고 전체 구조물을 숙주로 형질전환시킨다. 그런다음 추정되는 형질전환된 세포를 억제량의 제초제존재하에서 배양시켜 성장시킨다; 살아남은 세포는 성공적으로 획득한 관심사가 되는 유전자를 가질 높은 확률을 가질 것이다. 대안적으로, 내성 AHAS 유전자는 독립 플라스미드 상에서 관심사가 되는 유전자와 공동 형질전환될 수 있어, 모든 형질전환체의 약 50%가 두 유전자를 받았을 것으로 예측할 수 있다.

하기 정의는 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐서 사용하는 것으로 이해되어야 한다. "기능적" 또는 "정상"의 "AHAS 효소는 필수 아미노산 이소류신, 류신 및 발린의 합성을 위한 경로에서 첫 번째 단계를 촉매할 수 있는 것이다. "야생형" AHAS 서열은 주어진 종의 이미다졸리논 감수성 일원에 존재하는 서열이다. "내성" 식물은 돌연변이체이지만 기능적 AHAS 효소를 생산하고, 보통 이미다졸리논 억제수준 존재 하에서 성장할 때 성숙에 도달할 수 있는 것이다. 여기에서 사용되는 바, 용어 "내성"은 또한 "저항성" 식물, 즉, 이미다졸리논에 대한 반응을 표현형적으로는 불리하게 나타내나, 치명적이지 않은 식물을 포함하는 것을 의미한다.

본 발명의 유전자는 옥수수 메이즈 라인 XI12(아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 기탁번호 75051로서 기탁된 종자)로부터 분리할 수 있고, 플라스미드 pXI12/8A(아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 기탁번호 68643으로서 기탁됨)에 삽입되었다. 또한 옥수수 라인 QJ22(아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 기탁번호 40129로서 세포 배양물로서 기탁됨), 또는 여러 가지 밀식물(아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 기탁번호 40994, 40995, 40996 또는 40997로서 기탁된 종자)같은 임의의 다른 이미다졸리논-특이적 제초제내성 돌연변이체로부터 분리할 수도 있다. 게놈 DNA 라이브러리는 예컨대, 이미다졸리논 내성 돌연변이체중 하나, 바람직하게는 내성 형질을 위해 동형접합인 것으로부터의 DNA를 가진 파지 EMBL-3에서 생기고, 야생형 AHAS 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 핵산 표지자로 선별된다.

메이즈에서, AHAS 유전자는 두 개의 좌위, als 1 및 als 2에서 발견되고(Burr and Burr, Trends in Genetics 7 : 55-61, 1991), 두 좌위간의 상동성은 뉴클레오티드 수준이 95%이다. 비돌연변이 유전자는 염색체 4상의 좌위 als 1에 위치하는 반면, XI12의 돌연변이 물은 염색체 5상의 좌위 als 2에 위치한다(뉴하우스 일동, "Imidazolinone-resistant crops". In The Imidazolinone Herbicides, Shaner and O'Connor(Eds). CRC Press, Boca Raton, FL, in Press). 서던분석은 돌연변이 als 2 유전자를 갖는 몇몇 클론, 및 비돌연변이 als 1 유전자를 갖는 몇몇을 규명한다. 두 유형을 서열화 벡터로 서브클로닝하고, 디데옥시 서열화법에 의해서 서열화한다.

야생형 및 돌연변이 AHAS 유전자의 서열화 및 비교는 621위치에서 아미노산을 암호하는 코돈에서 하나의 뉴클레오티드 차이를 나타낸다(제5도). 상세하게는, 야생형에서 세린을 암호하는 코돈 AGT가 돌연변이 AHAS에서는 아스파라긴을 암호하는 AAT로 변한다(제8도). 돌연변이 AHAS 유전자는, 638 아미노산을 갖는 단백질을 암호하는 야생형 유전자와 다른 점에서 유사하고, 이중 처음 40 아미노산은 생체내에서 염색체내로의 이동 동안에 절개되는 것으로 생각되는 운반 펩티드를 구성한다. XI12 로부터 als 1 비돌연변이 유전의 서열은 B73 으로부터의 als 1 유전자와 동일한 것으로 나타난다.

본 발명의 돌연변이 유전자는 이미다졸리논 제초제에 대해 내성을 수여하나, 솔포닐우레아 제초제에는 수여하지 않는다. 내성이 수여되는 제초제의 유형은 예컨대 미합중국 특허 제4,188,487호, 제4,201,565호, 제4,221,586호, 제4,297,128호, 제4,554,013호, 제4,608,079호, 제4,638,068호, 제4,747,301호, 제4,650,514호, 제4,698,092호, 제4,701,208호, 제4,709,036호, 제4,752,323호, 제4,772,311호, 및 제4,798,619호에서 기술된다.

제6도에서 나타낸 핵산서열은 이미다졸리논-특이적 내성을 수여하기 위해 사용될 수 있는 유일한 서열은 아니다. 또한 동일한 단백질을 암호하나 유전자호의 축퇴때문에 여러 가지 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산서열이 숙고된다. 본 발명은 또한 전술한 돌연변이물이 존재하나, 내성 또는 촉매기능과 관련되지 않은 분자부분에서 하나 이상의 아미노산 침묵 변화를 암호하는 AHAS 서열을 암호하는 유전자를 망라한다. 또한 상기 서열들의 상응하는 지역에서 돌연변이물을 갖는 다른 이미다졸리논 내성 단자엽식물로부터의 유전자 서열이 숙고된다.

예컨대, 주어진 부위에서 화학적으로 동등한 아미노산의 생산을 가져오는 유전자 서열의 변경이 숙고되므로, 소수성 아미노산인 아미노산 알라닌을 위한 코돈이 글리신같은 다른 소수성 잔기를 암호하는 코돈에 의해 쉽게 치환될 수 있거나, 발린, 류신 또는 이소류신 같은 보다 소수성인 잔기를 치환될 수 있다. 유사하게, 글루탐산 대신 아스파르트산 같이, 다른 것 대신 음으로 일하전된 잔기, 또는 아르기닌 대신 리신같이 다른 것 대신 양으로 일하전된 잔기의 치환을 가져오는 변화는 또한 생물학적으로 동등한 생성물을 생성할것으로 예측할 수 있다. 본 발명은 또한 키메라 유전자를 포함하며, 이때 옥수수 AHAS 유전자의 치환된 부분은 다른 종으로부터의 정상 AHAS유전자의 변경안된 부분과 재조합된다. 따라서, 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐서, 용어 "이미다졸리논-특이적 내성 옥수수 AHAS 유전자"가 사용될 때마

다, 제6도의 서열뿐 아니라 이들 별도의 구체에 각각을 포함함을 의미한다.

본 발명의 분리된 AHAS DNA 서열은 표적 농작물을 형질전환하여 이미다졸린 내성을 수여하는데 유용하다. 외인성 DNA로 고등식물을 직접 또는 간접 형질전환하는데는, 현재 광범위한 기술이 존재하고, 신규 서열이 숙주 계통으로 통합될 수 있고 그 자손에 의해서 안정하게 유전될 수 있는 임의의 방법이 본 발명에 의해서 숙고된다. 이미다졸린은 특이적 내성형질은 하나의 우성 핵유전자로서 유전된다. 이미다졸린 내성의 수준은 유전자가 동형접합 상태로 존재할 때 증가하고, 상기 옥수수 식물은 예컨대 비내성 식물의 약 1000배 내성수준을 갖는다. 그러나, 상기 형질에 관해 이형접합인 식물은 비내성 식물의 약 50-500배의 내성을 갖는다.

식물세포의 형질전환은 벡터의 사용에 의해서 실현될 수 있다. 형질전환을 실현하는 통상의 방법은 외래 유전자를 표적 식물세포로 도입하기 위해서 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)의 사용이다. 예컨대, 돌연변이 AHAS 서열은 Ti-플라스미드 T-DNA에서 측위 서열을 갖는 플라스미드 벡터에 삽입된다. 그런다음 플라스미드를 이. 콜리로 형질전환시킨다. 이 균주 T-DNA 서열을 갖는 AHAS의 표적 식물 염색체로의 이동을 달성하는데 필요한 독성기능을 갖는 해제된 Ti-플라스미드를 가진 아그로박테리움 균주, 및 이. 콜리로부터 아그로박테리움으로의 AHAS 구조물의 이동을 집결시키는데 필요한 서열을 갖는 플라스미드를 가진 두 번째 이. 콜리균주간의 상부모 짝짓기가 수행된다. 식물 형질전환에 필요한 서열을 가진 재조합 아그로박테리움 균주를 사용하여 일 디스크를 감염시킨다. 디스크를 선택 배지상에서 성장시키고 성공적으로 형질전환된 재생체를 확인한다. 회수된 식물을 제조제 존재 하에서 성장시킬 때 제조제효과에 대해 내성이 있다. 또한 식물 바이러스는 외인성 DNA의 이동을 위해 가능한 수단을 제공한다.

또한 식물세포의 직접 흡수가 사용될 수 있다. 대표적으로, 표적식물의 원형질체를 이동될 DNA 및, 원형질체에 의한 DNA의 흡수를 촉진시키는 제제의 존재하에서 배양시켜 정치한다. 이점에 있어서 유용한 제제는 폴리에틸렌 글리콜 또는 인산칼슘이다.

대안적으로, DNA 흡수는 일렉트로포레이션에 의해서 자극될 수 있다. 이 방법에서는, 전기적 펄스를 사용하여 원형질체 세포막에서 일시적인 구멍을 연 다음, 주위 용액의 DNA를 구멍을 통하여 세포를 끌어당긴다. 유사하게, 미세주입을 사용하여 DNA를 직접 세포를, 및 바람직하게는 세포의 핵으로 직접 전달할 수 있다.

상기 각각의 기술에서, 형질전환은 배양중의 식물세포에서 일어난다.

형질전환 결과 후, 식물세포는 전식물로 재생되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재생을 위한 기술은 이제수많은 여러 가지 종에 대해 잘 알려져 있다(참조에, Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momiilan, N.Y.). 따라서, 일단 형질전환이 실현되면, 형질전환된 식물세포로부터 성숙한 식물을 재생시키는 것을 당분야의 지식 범위내에 있다.

이제는 또한 형질전환을 실현하기 위해서 분리된 세포의 사용, 및 따라서 식물 재생 기술을 반드시 필요로 하지 않는 별법이 이용가능하다. 이들은 일반적으로 "탄도"또는 "입자 가속"방법이라 하며, 이때 DNA 코우팅된 금속입자가 화학전하(클레인 이동, Nature 327 : 70-73, 1987) 또는 전기적 방전(EPO 270 356)에 의해서 식물세포로 이끌린다. 이 방법으로, 배양중의 식물세포 또는 식물의 생식 기관 또는 세포, 예컨대 꽃가루가 관심사가 되는 서열에 의해 안정하게 형질전환될 수 있다.

특정한 쌍자엽 식물 및 단자엽 식물에 있어서 DNA의 직접 흡수는 적절한 형질전환 방법이다. 예컨대, 옥수수에서, 배양된 세포벽을 셀룰라제, 헤미셀룰라제 및 펙티나제같은 하나이상의 세포벽 손상 효소를 가진 완충액에서 소화시켜 생존성 원형질체를 분리한다. 상기 원형질체를 수회 세척하여 효소를 제거하고, 관심사가 되는 유전자를 가진 플라스미드 벡터와 혼합한다. 세포는 PEG(예, 20% PEG 4000) 또는 일렉트로포레이션에 의해 형질전환될 수 있다. 원형질체를 니트로셀룰로오스 필터 상에 놓고 공급장치 배양물로서 작용하는 심기온 옥수수 세포와 함께 배지상에서 배양한다. 2-4주후, 니트로셀룰로오스 필터의 배양물을 이미다졸린 약 0.32μM을 함유하는 배지상에 놓고 1-2개월 동안 배지에서 유지시킨다. 식물세포를 가진 니트로셀룰로오스 필터를 제조제를 함유한 신선한 배지로 이동시키고 2주마다 세포를 관리한다. 형질전환된 세포는 성장을 멈추고 수주후에 죽는다.

본 발명은 실제적으로 임의 유형의 식물, 단자엽 식물 및 쌍자엽 식물 둘다의 형질전환에 적용될 수 있다. 제조제내성을 위한 형질전환이 숙고되는 농작물에는 옥수수, 밀, 쌀, 기장, 귀리, 보리, 수수, 해바라기, 고구마, 자주개자리, 사탕무, 브라시카(Brassica)종, 토마토, 후추, 콩, 담배, 멜론, 호박, 감자, 땅콩, 완두, 목화 또는 카카오가 있다. 또한 신규 서열을 사용하여 장미같은 관상식물종, 및 소나무 및 포플라 같은 나무종을 형질전환할 수 있다.

또한 본 발명의 신규 서열은 식물 유전학 연구에서 선택성 표식으로 유용하다. 예컨대, 식물의 형질전환에서, 이미다졸린 내성을 암호하는 서열은 표적 이미다졸린 감수성 식물세포를 형질전환하는데 사용될 관심사가 되는 유전자에 연결될 수 있다. 관심사가 되는 유전자 및 이미다졸린 내성 서열 둘다를 포함하는 구조물을 식물세포에 도입한 다음, 식물세포를 이미다졸린 억제량 존재 하에서 성장시킨다. 대안적으로, 관심사가 되는 두 번째 유전자가 별개의 플라스미드 상에서 숙주세포내로 공동형질전환될 수 있다. 상기 처리에서 살아남은 식물세포는 아마도 관심사가 되는 유전자뿐 아니라 내성 유전자를 획득했으므로, 형질전환체 만이 제조제에 의한 선택방법에서 살아남는다. 두 유전자의 성공적인 형질전환 및 발현의 확인은 계통 DNA의 서던 교잡에 의해서, PCR에 의해서 또는 유전자의 표현형 발현 관찰에 의해서 실현될 수 있다.

본 발명은 하기의 비제한적 실시예에 의해 더 설명된다.

[실시예]

1. XI12에서 전(全)식물의 제조제내성 확인

XI12식물을 10일에 V3잎단계(4-5잎, 이중 3개는 가시성 엽설을 갖는다)에 대해 제초제를 처리한다. 이미제타피르를 2000, 500, 250, 125 및 62.5g/ha 비율로 적용한다. 클로르술폴론을 32, 16, 8, 4 및 2g/ha로 적용한다. 식물을 400l/ha의 분무 부피로 발아후 처리한다. 분무후, 식물을 추후 관찰을 위해 온실에 놓는다.

XI12 식물은 모든 비율의 이미제타피르 처리에 영향을 받지 않으나, 클로르술폴론에 대해서는 가시성의 증가된 내성은 나타내지 않는다. 따라서, XI12는 전식물 수준에서 이미다졸리논에 대해 선택적 내성을 나타낸다(제1도 참조).

XI12에서의 내성은 또한 핵유전자의 하나의 우성 대립형질로서 유전되는 것으로 보인다. 이형접합 내성 XI12를 자가교배하였을 때 자가교배된 자손은 핵유전자의 하나의 우성 대립형질에 관해 예상한 3 내성 : 1 감수성 비율로 분리된다. 이 연구에서, 분리하는 묘종을 전술한 분무원안 후에 이미제타피르 치사량(125 또는 250g/ha)으로 발아후 분무하여, 내성에 관한 분리를 확립한다.

## 2. AHAS 추출

XI12 종자를 80°C의 주야 온도 및 15시간의 광주기에서 유지되는 온실의 흙에 파종한다. 파종 후 2주에 식물을 수확한다. 싹의 기부가 AHAS추출에 사용된다. 조직 5g을 액체 질소에서 분말화한 다음 10mM 초성포도산 염을 함유하는 100mM 인산칼륨 완충액(pH 7.5), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EDTA, 100uM FAD(플라빈 아데닐 디뉴클레오티드), 1mM 발린, 1mM 류신, 10% 글리세롤 및 10mM 시스테인을 포함하는 AHAS분석 완충액에서 균등화한다. 균등물을 10,000rpm에서 10분동안 원심분리하고 상정액 3ml를 평형화된 바이오-라드 에코노-탈염(Bio-Rad Econo-Desalting) 칼럼(10DG)상에 적용하고 4ml AHAS 분석 완충액으로 용리한다.

AHAS 활성은 산 존재하에서의 탈카르복실화에 의한 아세트인오로의 전환 후에, 생성물 아세트락테이트의 평가에 의해 측정된다. 표준 반응 혼합물은 100mM 초성포도산 나트륨을 함유하는 50mM 인산칼륨(pH 7.0), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM 티아민 피로포스페이트, 10uM FAD, 및 적당한 농도의 여러 가지 저해제내에 효소를 함유한다. 이 혼합물을 실험에 따라 1 내지 3시간 동안 37°C에서 항온처리한다. 이 항온처리 기간의 말엽에서, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 첨가로 반응을 정지시켜 시험관에서 0.85% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 최종 농도를 만든다. 반응 생성물을 60°C에서 15분동안 탈카르복실화한다. 형성된 아세트인은 크레아린(0.17%) 및 1-나프톨(4N NaOH 내 1.7%)과의 항온처리에 의해서 결정한다. 형성된 유색 착물의 흡광을 520nm에서 측정한다.

B73, A619 또는 다른 야생형 메이즈 라인으로부터의 AHAS 활성은 1uM의 I<sub>50</sub>으로 이미제타피르(퍼수이트)에 의한 억제에 대해 매우 감수성이 있다(제1도 참조). 이 관찰과 반대로, XI12는 퍼수이트 또는 아아세날(ARSENAL™)(이미제피르) 최고 농도(100 uM)에서 70-80%의 효소활성을, 셉터(SCEPTER™)(이미제퀸) 존재하에서 약 70%를 나타낸다. 이 결과는 A619로부터의 생체의 AHAS 활성에 비해 이미제타피르에 대한 XI12로부터의 AHAS 활성의 저항상에서 100배 증가를 나타낸다. 술포닐우레아에 대한 두 라인으로부터 AHAS 활성의 감수성은 서로 다른 그림을 제공한다. 오우스트(OUST™; 술포메투론 메틸) 100nM존재하에서, XI12의 AHAS 활성은 단지 15-20%이다. 오우스트 존재 하에서 A619의 AHAS 활성은 5-10%이고, 퍼수이트 존재하에서는 15-20%이다.(제1도 참조).

## 3. XI12 AHAS 유전자의 클로닝

이미다졸리논 내성 옥수수 조직 배양 라인으로부터 유래된 XI12돌연변이체의 종자를 파종한다. 그로부터 얻은 식물은 돌연변이 AHAS 표현형에 관해 분리되는 것으로 나타난다. 동형접합 내성 종자 물질을 얻기 위하여, XI12 돌연변이 식물의 집단을 자가교배한다. 세 연속 성장시기에 대한 제초제내성에 관해 선택한 후, 종자는 돌연변이 AHAS 유전자에 관해 동형접합이다. 동형접합 종자를 수집하고 사용하여 AHAS 유전자 분리에서 사용될 묘종을 성장시킨다.

DNA는 동형접합 XI12 라인의 7일된 암황화 묘종으로부터 추출한다. 식물조직 60g을 액체질소에서 분말화하고, DNA 추출 완충액(1.4M NaCl, 2.0% Ctab(헥사데실 트리메틸 암모늄 브로마이드), 100mM 트리스-CI pH 8.0, 20mM EDTA, 2% 머캅토 에탄올) 108ml 및 물 54ml로 이동시킨다. 50-60°C에서 30분동안 항온처리한 후, 현탁물을 동량의 클로로포름으로 추출한다. DNA는 동량의 침전 완충액(1% Ctab; 50mM 트리스-CI pH8.0, 10mM EDTA)을 첨가하여 침전시킨다. 게놈 DNA를 정제하기 위하여, 6.6M CsCl 및 에티디움 브로마이드에서 고속 원심분리를 수행한다(Ti80 로터, 50,000rpm, 20°C, 24시간). 정제된 DNA를 염포화된 부탄올로 추출하고 1리터 투석 완충액(10mM DNA를 염포화된 부탄올로 추출하고 1리터 투석 완충액(10mM 트리스-CI pH 8.0, 1mM EDTA, 0.1M NaCl) 3 교환에 대해서 25시간동안 투석한다. XI12 게놈 DNA의 농도는 310mg/ml가 되도록 분광분석학적으로 결정된다. 수율은 0.93mg이다.

XI12 게놈 DNA를 사용하여 파지 EMBL-3에서 게놈 라이브러리를 생성한다. DNA를 MboI로 부분 소화시키고 단편을 EMBL-3의 BamHI 부위로 클로닝하기 전에 자당 구배상에서 분리하여 8 내지 22kb 사이의 크기 범위를 생성한다. 2.1 × 10<sup>6</sup> 독립클론을 얻은 후, 라이브러리를 한 번 증폭시킨다. 라이브러리의 역가는 9 × 10<sup>10</sup> pfu/ml로 결정된다.

XI12 라이브러리 분석을 위한 표지자를 얻기 위하여, Clontech Inc. CA에서 구입한 람다 gt11의 W22(야생형) cDNA 라이브러리를 아라비도시스 AHAS 게놈클론으로부터 분리한 800nt BamHI 표지자로 선별한다. 파지를 50,000pfu/15cm 평판 밀도로 평판배양하고, 니트로셀룰로우스 필터 상으로 이동시키고, 6 x SSC, 0.2% SDS에서 2시간동안 예비교잡시키고 6 x SSC, 0.2% SDS에서 아라비도시스 AHAS 표지자와 하룻밤동안 교잡시킨다. 하나의 양성 파지를 확인하고, 후에 정제하고 1.1kb EcoRI 단편의 서브클로닝을 위해 사용한다. 1.1kb EcoRI 단편을 pGemA-4로 서브클로닝하고 표지자로서 사용하여 XI12 AHAS 유전자를 확인한다.

XI12게놈 라이브러리를 12-15cm 평판(농도 50,000pfu/평판)상에서 평판배양하고 W22 AHAS cDNA 표지자로 선별한다. 필터를 예비교잡하고(2시간) 쳐어치 완충액(0.5M 인산나트륨, 1mM EDTA, 1% BSA, 7% SDS)에

서 65°C로 교잡하고 (하룻밤) 65°C에서 2 x SSC, 0.2% SDS 및 0.3 x SSC, 0.2% SDS에서 세척한다. 12 양성 반점을 선별된 총 7.5×10<sup>5</sup> pfu로부터 얻고 5 양성 클론을 후에 정제하고 치스홀름(Chisholm, Bio Techniques 7 : 21-23, 1989)에 따라 분리한다. 서던 분석(제2도 참조)은 파지 클론이 두가지 유형의 AHAS 클론을 나타냄을 보여준다 : 유형-1 클론은 AHAS CDNA 표지자에 교잡하는 하나의 큰 Xba I (> 6.5kb) 단편을 가지며, 유형-2 클론은 AHAS CDNA 표지자에 교잡하는 두 개의 2.7 및 3.7kb Xba I 단편을 갖는다. X112 DNA의 게놈 서던은 게놈 DNA로 소화시킴으로써 및 AHAS CDNA 표지자와 교잡시킴으로써 얻은 Xba I 단편이 X112 파지 클론에서 확인된 Xba I 단편에 상응함을 입증한다(제3도 참조). 또한 제한 소화 및 서던분석은 5AHAS 클론의 것을 입증하며, 한 클론은 돌연변이 als 2 유전자를 나타내고 내 클론은 als 1 유전자를 나타낸다.

염색체5상에 위치한 돌연변이 좌위(클론 12/8A) 및 염색체 4상에 위치한 비돌연변이 좌위(클론 12/17A)에 상응하는 AHAS 유전자를 Pst I 단편(클론 12/8A)으로서 또는 Xba I 단편 (12/17A)으로서 서열화 벡터 pBluescript II KSm13 (+)(pKS+; Stratagene)으로 서브클로닝한다. 파지 12/17A로부터의 2.7kb 및 3.7kb Xba I 단편 둘다는 확인된 AHAS 유전자의 하나의 완전한 복사물을 갖는다. 각각의 서열은 AHAS 암호서열에 상보적인 프라이머를 사용하는 디데옥시 서열화(Pharmacia T7 서열화 키트)에 의해서 얻는다.

DNA 추출 방법, 게놈 라이브러리의 클로닝 및 라이브러리의 선별은 X112 게놈 DNA에 관해 기술한 바와 같다. B73 AHAS 유전자를 Xba I 단편으로서 서열화 벡터 pKS+로 서브클로닝하고 서열화한다. 서열은 S112 AHAS 유전자에 관해 기술한 바와 같이 AHAS암호서열에 상보적인 프라이머를 사용하여 디데옥시 서열화에 의해서 얻는다.

Clontech Inc., CA로부터 구입한 EMBL3의 W22 게놈 라이브러리를 선별한다. 파지를 50,000 pfu/17.78 cm(7인치) 평판 밀도로 평판배양하고, 니트로셀룰로오스 필터 상에 이동시키고, 전술한 W22 AHAS CDNA 표지자와 교잡한다. (예비교잡 및 교잡조건 : 6x SSC, 0.5% SDS, 1X Demhard's 100mg/ml 송아지 흉선 DNA, 65°C, 세척조건 : 3X xSSC, 0.2% SDS 65°C에서 2시간동안, 및 0.3 xSSC, 0.2% SDS 2시간동안). 두 개의 양성파지(12/1A 및 12/4/-4)를 확인하고 추후에 정제한다.

W22 게놈 클론 12/1A를 두 개의 0.78kb (pGem A-4) 및 3.0 kb (pGem A-14; Promega) Sal I 단편으로서 벡터 pGem-A2로, 및 6.5kb Xba I 단편으로서 벡터 pKS+(pCD 200)로 서브클로닝한다. W22 AHAS 유전자의 암호가닥서열은 파지 12-1A의 서브클론 pGem A-14 및 pGem A-4로부터 생긴 마련된 삭제물의 디데옥시 서열화에 의해서 얻는다. 이 서열을 사용하여 AHAS 비암호 가닥에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 고안한다. 비암호 가닥의 서열은 암호가닥에 상보적인 프라이머를 사용하는 클론 pCD 200의 디데옥시 서열화에 의해서 얻는다. W22 AHAS 유전의 서열화를 상보할 때, 두 DNA 가닥의 프라이머를 고안하고 X112 및 B73 게놈 라이브러리로부터 분리된 AHAS 유전자의 서열화를 위해 사용한다.

4. QJ 22 AHAS 유전자의 클로닝

이미다졸리논에 대해 선택적으로 내성이 있는 메이즈 라인 QJ22에서 AHAS를 암호하는 유전자의 서열이 또한 결정된다. QJ22의 게놈 라이브러리는 EMBL3 벡터에서 제조된다. 800,000 파지의 라이브러리는 야생형 메이즈 라인 W22로부터 유래된 AHAS클로 (A-4)로부터 분리된 850 뉴클레오티드 Sal I/Cla I 단편으로 선별한다. 5 양성 파지를 선택하고 파지를 부분적으로 정제하기 위해 2회 선별한다. 부분적으로 정제된 파지를 PCR로 분석하여 어느 클론이 QJ22 als 1 유전자를 나타내는지 결정한다. 상기 클론은 495 위치에서 유전자 특이적 Sma I 부위를 갖는 3.7kb Xba I 단편으로서 확인된다. 두 번째 선택은 이들 특성을 갖는 하나의 양성 클론의 존재를 나타낸다.

PCR 생성물은 Promega로부터의 상업적 키트(Magic PCR Preps)를 사용하여 정제되고, 정제된 DNA는 Promega로부터의 Taq 폴리머라제서열화 시스템 "fmoI"로 서열화된다. QJ 22 돌연변이 AHAS DNA 두 가닥의 서열 분석은 아미노산 621에 관한 코돈에서 G로부터 A로의 뉴클레오티드 변화를 나타낸다. 이 돌연변이는 X112에서 나타난 것과 동일하고 서열의 나머지는 als 1 유전자와 일반이다.

[결과]

돌연변이 AHAS 유전자의 서열을 야생형 옥수수 라인 B73 및 W22로 부터 얻은 서열과 비교한다 (제7도 참조). X112 돌연변이 유전자(X112/8A) 및 QJ22 돌연변이 유전자 및 야생형 유전자는 AGT 로부터 AAT로의 하나의 뉴클레오티드 변화를 일으키는, 621 위치에서 아미노산 변화를 제외하고는 동일하다 (제8도 참조). X112돌연변이 X112/8A 및 야생형 B73/7-4 유전자는 위치 63에서 부가의 차이를 나타낸다. 다른 한편으로, X112/17에서 클로닝된 비돌연변이 X112 AHAS 유전자는 성숙한 AHAS 단백질에 관해 암호하는 지역의 상응하는 B73/10-2에 완전히 일치한다(자료는 나타내지 않음).

[생물학적 물질의 기탁]

하기의 생물학적 물질은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션, 12301 파크론 드라이브, 록빌시, 메릴랜드주, 20857에 하기와 같이 기탁되었다 :

1991년 7월 3일에 기탁번호 ATCC 68643로 기탁된 플라스미드 pX/12-8A를 가진 이. 콜리 XL I 블루 1991년 7월 16일에 기탁번호 ATCC 75051로 기탁된 X112 옥수수 종자.

(57) 청구의 범위

청구항 1

야생형 옥수수 AHAS 효소에 대하여 621번 위치에서 세린 대신에 아미노산 치환물을 가지며 그 치환은 세린으로부터 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산 또는 글루타민으로부터 선택되는 산성 아미노산으로의 치환이며, 또는 다른 단자엽 식물의 AHAS효소에서 상응하는 아미노산 치환물을 가지며, 치환은 효소에

이미다졸리논 내성을 부여하는, 기능적 AHAS 효소를 암호화하는 핵산 서열.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 치환된 아미노산이 아스파라긴인 서열.

**청구항 3**

야생형 옥수수 AHAS 효소에 대하여 621번 위치에서 세린 대신에 아미노산 치환물을 가지며 그 치환은 세린으로부터 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산 또는 글루타민으로부터 선택되는 산성 아미노산으로의 치환이며, 또는 다른 단자엽 식물의 AHAS 효소에서 상응하는 아미노산 치환물을 가진, 이미다졸리논-특이적 내성 기능적 AHAS 효소.

**청구항 4**

제2항에 있어서, 치환된 아미노산이 아스파라긴인 효소.

**청구항 5**

제1항의 핵산을 포함하는 재조합 벡터.

**청구항 6**

제5항의 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 단자엽 식물 세포 또는 세균 세포인 숙주세포.

**청구항 8**

제7항의 형질전환된 단자엽 식물세포로부터 무성적으로 재생된, 이미다졸리논-특이적 내성 성체 단자엽 식물.

**청구항 9**

제1항의 핵산서열을 단자엽 식물세포에 제공함을 포함하는, 단자엽 식물세포에 이미다졸리논-특이적 내성을 부여하는 방법.

**청구항 10**

이미다졸리논 억제량 존재 하에서 제2항의 효소를 생성하는 단자엽 식물을 재배함을 포함하는, 이미다졸리논 특이적 내성 식물을 성장시키는 방법.

**청구항 11**

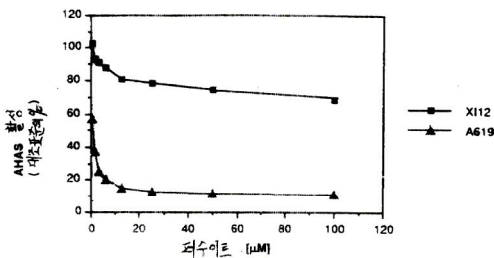
제1항의 핵산 서열에 연결되거나, 제1항의 핵산서열 존재하에서 연결되지 않은 관심사가 되는 유전자를 우량한 숙주세포에 제공하고, 억제량의 이미다졸리논 존재 하에서 세포를 성장시키고, 관심사가 되는 유전자를 갖는 살아남은 세포를 확인함으로써 구성되는, 관심사가 되는 유전자로 성공적으로 형질전환된 숙주세포를 선택하는 방법.

**청구항 12**

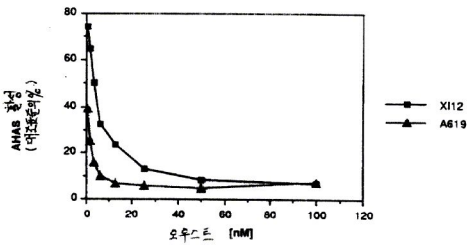
농업적으로 유용한 형질을 암호화하는 유전자에 연결된 제1항의 서열을 포함하는 핵산 구조물.

**도면**

도면 1a



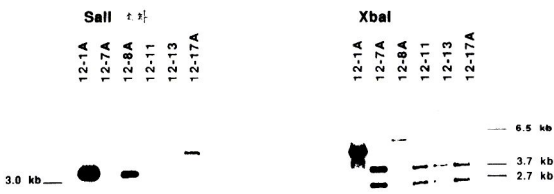
도면1b



저해제 존재 하에서 계2 및 A619의 ANAS 활성

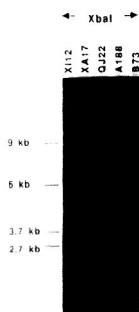
도면2

XI12 5'UTR 3' 말단 부위 분리된 파생 시퀀스



도면3

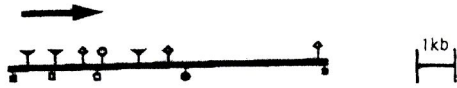
5'에이즈 등계 및 파생 시퀀스의 거울-DNA의 서열 분석



표지자: W22로부터 1.1 kb EcoRI cDNA



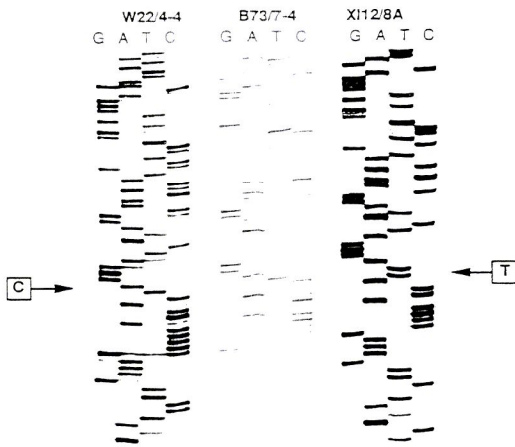
도면4



- T Sall
- XhoI
- ⊥ HindIII
- XbaI
- ◇ ClaI
- △ PstI

플라스미드 pCD8A의 제한자  
Restriction map of plasmid pCD8A

도면5a



도면5b

W22/1A 및 B73/7-4  
서열 :

5'TAGTG3'  
3'ATCAC5'

XI12/8A 서열 :

5'TAATG3'  
3'ATTAC5'

