(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월07일
(11) 등록번호 10-1427180
(24) 등록일자 2014년07월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0036771
(22) 출원일자 2013년04월04일
심사청구일자 2013년04월04일
(56) 선행기술조사문헌
KR101199104 B1
KR101219013 B1
KR1020110092148 A

(73) 특허권자
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
(72) 발명자
장철성
강원 춘천시 영서로2141번길 33, 104동 802호 (퇴계동, 중앙하이츠빌1단지아파트)
임성돈
경기 성남시 분당구 미금로 215, 804동 1302호 (금곡동, 청솔마을대원아파트)
(74) 대리인
최규환

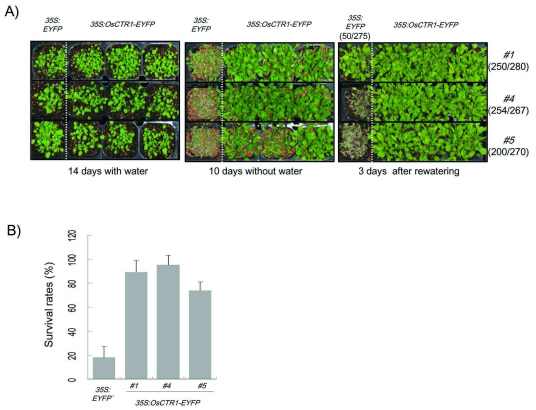
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 **식물의 가뭄 스트레스 내성을 증가시키는 벼 유래의 OsCTR1 유전자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 벼 유래 *OsCTR1*(*Oryza sativa* chloroplast proteins targeting RING E3 ligase 1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 조절하는 방법, 상기 *OsCTR1* 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 *OsCTR1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물체의 환경 스트레스 내성 조절용 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010-0007088
부처명 교육과학기술부
연구사업명 일반연구자지원사업
연구과제명 단백질 분해 기작에 관여하는 벼 RING finger protein 유전자군들의 기능 유전체 분석 및 네트워크 구축
기 여 율 1/2
주관기관 강원대학교산학협력단
연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 308020-05
부처명 농림축산식품부
연구사업명 농림기술개발사업
연구과제명 돌연변이 육종기술을 이용한 신품종 개발
기 여 율 1/2
주관기관 강원대학교산학협력단
연구기간 2008.12.20 ~ 2013.12.19

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 벼 유래 *OsCTR1*(*Oryza sativa* chloroplast proteins targeting RING E3 ligase 1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *OsCTR1* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 식물의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 벼 유래 *OsCTR1*(*Oryza sativa* chloroplast proteins targeting RING E3 ligase 1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 *OsCTR1* 유전자를 과발현시키는 단계; 및

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

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제5항의 방법에 의해 제조된 가뭄 스트레스에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체.

청구항 10

삭제

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

청구항 12

제9항에 따른 식물체의 종자.

청구항 13

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 벼 유래 *OsCTR1*(*Oryza sativa* chloroplast proteins targeting RING E3 ligase 1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는, 식물체의 가뭄 스트레스 내성 증가용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물의 가뭄 스트레스 내성을 증가시키는 벼 유래의 *OsCTR1* 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 벼 유래 *OsCTR1*(*Oryza sativa* chloroplast proteins targeting RING E3 ligase 1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 조절하는 방법, 상기 *OsCTR1* 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 *OsCTR1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물체의 환경 스트레스 내성 조절용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물의 병 저항성 반응 또는 환경적 스트레스에 대한 내성을 가지는 식물의 방어관련 기작 연구는 지금까지 알려져 있지 않은 생체 내 기작을 규명하는 과학 기술적 가치를 지닌다. 또한 식물방어관련 유전자의 정보는 작물의 분자적 유전육종의 직접적 재료로서 제공될 수 있을 뿐 아니라 전통적 유전육종에도 사용될 수 있는 장점을 지니고 있다.

[0003] 환경친화적 식량생산의 측면에서 병 방어 관련 다양한 유전자, 또는 이들 형질을 이용한 작물 육종은 경제적으로 중요한 병원체, 잡초, 그리고 환경적 스트레스에 의한 손실을 최소화함으로써 식량생산비용을 줄일 수 있으며, 고품질의 식량을 제공하여 농산물의 경쟁력 회복에 기여함과 동시에 신품종의 개발과 연관된 다양한 산업의 활성화에 기여한다.

[0004] 환경 스트레스는 식물의 성장을 저해하고 많은 중요한 농업 분야에서 수확물의 생산성을 제한하는 요소로서 수분 스트레스, 저온 스트레스, 염해 스트레스, 산화 스트레스 등이 있다. 특히 수분 스트레스는 탈수, 고염도 및 저온과 같은 외부환경에 의해 유발되며, 식물의 생장을 저해하는 환경 스트레스에 있어서 가장 가혹한 스트레스 중의 하나이다.

[0005] 식물은 이러한 수분 스트레스에 대한 방어 기작을 가지고 있어서 생육에 부적합한 환경에 처하게 되면 그들의 형태를 조절하거나 생리적 대사과정을 조절함으로써 환경에 적응하여 생존하고자 하는 경향이 있다. 지금까지 수분 스트레스에 관여하는 다수의 유전자들이 분리되었다.

[0006] 한국등록특허 제0792169호에는 '전사인자 ＡｔＭＹＢ４４의 유전자 전이를 통한 광엽화, 개화지연 및 환경 스트레스 저항성이 강화된 식물체'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제0742194호에서는 '환경 스트레스 저항성 조절 유전자를 이용하여 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 식물의 가뭄 스트레스 내성을 증가시키는 벼 유래의 *OsCTR1* 유전자 및 이의 용도에 관해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 벼 유래의 *OsCTR1* 유전자가 가뭄 스트레스에서 강하게 발현이 유도되고, 세포 내 세포질 및 엽록체에 위치하며, 엽록체에 위치하는 단백질들과 주로 상호작용하는 것을 확인하였고, *OsCTR1* 유전자가 과발현된 애기장대 식물체에서 가뭄 스트레스 조건에서 대조군에 비해 저항성을 보여 OsCTR1이 환경 스트레스에 중요한 유전자임을 증명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 벼 유래 *OsCTR1*(*Oryza sativa* chloroplast proteins targeting RING E3 ligase 1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 *OsCTR1* 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 식물체를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 식물체의 종자를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 *OsCTR1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물체의 환경 스트레스 내성 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명을 통해 *OsCTR1* 유전자 과발현 식물체에서는 가뭄 스트레스 처리 시 대조군에 비해 강한 저항성을 보이는 것을 확인하였다. 따라서 환경 스트레스에 대해 저항성이 강한 형질전환 식물체의 개발을 위해 *OsCTR1* 유전자는 유용할 것으로 기대된다.

[0014] 또한, OsCTR1의 분자생화학적 분석으로 세포 내 위치와 상호작용 단백질과의 결합 및 기능 등을 규명함으로써, 관련 분야에 기초지식으로 유용하게 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 벼 식물체의 뿌리, 줄기, 잎 및 원추화서(panicle) 및 수상화서(spike) 등의 조직들을 이용하여 *OsCTR1* 유전자의 발현 양상을 RT-PCR법으로 분석한 결과이다. A) 식물체의 다른 조직들 간 그리고 다른 발달 과정 중에 있어 *OsCTR1* 유전자의 발현 양상을 확인한 것으로 각 조직별 그리고 각 발달 과정 단계별로 유전자의 발현 양상에 차이가 있는 것을 보여주는 그림이다. Stage I은 영양생장기 단계, Stage II는 생식생장기 단계. B) 비생물학적 스트레스와 식물 호르몬 처리에 따른 *OsCTR1* 유전자의 발현 양상을 확인한 것으로 탈수 스트레스와 식물 호르몬 처리시에 *OsCTR1* 유전자의 발현 유도가 확인된 것을 보여주는 그림이다. C는 대조군, T는 스트레스 처리군.

도 2는 *OsCTR1* 유전자의 과발현을 유도한 형질전환 애기장대 식물체 중 독립적인 3개체에 대한 *OsCTR1* 유전자 발현 수준을 RT-PCR법으로 조사한 결과이다. WT는 야생형 애기장대, 35S:EYFP는 *OsCTR1* 유전자를 포함하지 않은 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대, 35S:OSCTR1-EYFP #1, 4, 5는 형질전환 애기장대.

도 3은 *OsCTR1* 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대(35S:OSCTR1-EYFP #1, 4, 5)의 ABA 감수성(sensitivity)을 알아보기 위해서 1 μM ABA를 함유한 배지에서 배양한 결과로 비형질전환(35S:EYFP) 애기장대와 비교해 *OsCTR1* 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대의 ABA 감수성이 높은 것으로 확인되었다. 바 크기는 1㎝.

도 4는 *OsCTR1* 유전자를 과발현하는 형질전환 및 비형질전환 애기장대의 ABA호르몬에 관한 표현형 분석을 나타낸 그림이다. A) ABA 처리 농도별 발아율을 확인한 것으로 형질전환 식물체의 발아율이 비형질전환체에 비해 낮은 발아율을 보이는 것을 나타내는 그림이며, B) 역시 동일 조건에서 떡잎 녹화율을 확인한 결과로서 형질전환 애기장대의 녹화율이 대조군에 비해 낮은 것을 확인하였다.

도 5는 형질전환 애기장대(35S:OSCTR1-EYFP #1, 4) 두 개체 및 비형질전환 애기장대의 ABA 농도별 기공개폐 정도를 확인한 결과로 ABA 호르몬을 각각 1, 10 μM 의 농도로 처리한 후 광학 현미경으로 기공개폐 정도를 비교한 사진과 그래프이다.

도 6은 형질전환 및 비형질전환 애기장대의 잎을 자연건조하면서 관찰한 결과이다. A)는 수분유출에 따른 무게 변화를 측정한 것으로서 형질전환 식물체의 보습성이 향상되었음을 나타내는 그림이며, B)는 이 상태에서 24시간, 48시간 경과 후의 잎의 형태 변화 상태를 보여주는 사진이다.

도 7은 형질전환 및 비형질전환 애기장대 잎에서의 과산화수소(H_2O_2) 축적을 측정한 것으로, 탈수 처리 후 90분 및 180분 후의 잎에서 과산화수소의 생성 정도를 조직화학적 염색법을 이용하여 분석한 사진이다.

도 8은 2주 성장한 형질전환 및 비형질전환 애기장대에 10일간 수분공급을 중단하고 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 조사한 결과를 보여주는 사진과 수분 재공급 3일 후의 생존율을 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼 유래 *OsCTR1*(*Oryza sativa* chloroplast proteins targeting RING E3 ligase 1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 방법은 벼 유래 *OsCTR1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 과발현

시켜 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 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.

[0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 환경 스트레스는 가뭄 스트레스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 *OsCTR1* 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 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0021] 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 수단에 의해 세포내 재도입된 것이다.

[0022] 본 발명에서, 상기 *OsCTR1* 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.

[0023] OsCTR1 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보좀 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 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.

[0025] 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 포스피노트리신(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.

[0026] 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 이루어

질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0027] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(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.

[0028] 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.

[0029] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 벼 유래 *OsCTR1 (Oryza sativa* chloroplast proteins targeting RING E3 ligase 1) 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.

[0031] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법은 벼 유래 *OsCTR1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 과발현시켜 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 바람직하게는, 상기 *OsCTR1* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다.

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

[0034] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefiaciens*)에 의해 매개 될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[0035] 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0036] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0037] 바람직하게는, 상기 형질전환 식물체 및 이의 종자는 환경 스트레스에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자이다.

[0038] 상기 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갓무, 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 애기장대 식물체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 벼 유래 *OsCTR1* (*Oryza sativa* chloroplast proteins targeting RING E3 ligase 1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는, 식물체의 환경 스트레스 내성 조절용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 *OsCTR1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 함유하며, 상기 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 환경 스트레스 내성, 바람직하게는 가뭄 스트레스 내성을 증가시킬 수 있는 것이다.

[0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의

내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] **실시예 1: 벼 *OsCTR1* 유전자의 기관별 및 발달 시기별 발현특성 분석**

[0042] 벼 식물체(품종: 동안벼)의 기관 및 발달시기에 따른 *OsCTR1* 유전자의 발현 양상을 확인하기 위해 초기 및 후기 영양 생장기 단계의 뿌리, 줄기 및 잎 기관을 채취하고, 생식 생장기 단계의 원추화서(panicle)와 수상화서(spike)를 수집하여 RT-PCR을 수행하였다. *OsCTR1* 유전자 특이적 프라이머는 Primer-BLAST(NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)를 이용하여 제작하였고, 정방향 프라이머 5'-ACATCTCCAAGATGCTGTGC-3'(서열번호 2), 역방향 프라이머 5'-AGCATGGCAGAGAACCAGAT-3'(서열번호 3)을 사용하였다. 그 결과 벼의 뿌리에서는 *OsCTR1* 유전자의 발현이 전혀 관찰되지 않았고, 줄기에서는 후기 영양 생장기 단계에서, 잎에서는 후기 영양 생장기와 생식 생장기 단계에서 *OsCTR1* 유전자의 발현이 확인되었다. 그리고 원추화서 발달이 진행될수록 *OsCTR1* 유전자의 발현이 증가되고 더욱 분화된 수상화서에서도 *OsCTR1* 유전자의 발현이 관찰되었다. *Os18S-rRNA*는 전기영동 실험에서 동량의 RNA를 비교하였음을 증명하기 위하여 각 레인별로 그 양을 관찰한 것으로 사용한 프라이머는 정방향 프라이머 5'-ATGATAACTCGACGGATCGC-3'(서열번호 4) 및 역방향 프라이머 5'-CTTGGATGTGGTAGCCGTTT-3'(서열번호 5)였다(도 1a).

[0043] **실시예 2: 다양한 환경 스트레스 처리에 의한 *OsCTR1* 유전자의 발현특성 분석**

[0044] *OsCTR1* 유전자 발현이 다양한 환경 스트레스 처리에 반응하는 정도를 분석하기 위해 식물체에 비생물학적 및 생물학적 스트레스인 탈수, 열(45℃), 저온(4℃), 0.1 mM ABA, 1 mM 살리실산 및 0.1 mM 자스몬산 처리를 하였다. 각 스트레스 처리는 종자 발아 후 2주된 벼(품종: 동안벼) 유식물체를 대상으로 처리하고, 처리 후 0, 1, 6, 12, 24, 48인 시간대별로 잎을 수집한 후 RT-PCR에 사용하였다. *OsbZIP23, OsHsp90-1, OsLIP19, OsSa1T, OsPR1b, OsPBZ1* 유전자는 탈수, 열, 저온, ABA, 살리실산 및 자스몬산 처리에 대한 양성 대조군으로 사용하였으며, *Os18S-rRNA*는 전기영동 실험에서 동량의 RNA를 비교하였음을 증명하기 위하여 각 레인별로 그 양을 관찰한 것이다. 유전자 증폭을 위해 사용한 프라이머는 *OsbZIP23* 정방향 프라이머 5'-CTCTGATCCCTCGTTGCGTTA-3'(서열번호 6) 및 역방향 프라이머 5'-CAACACCCCAGCACCAAACT-3'(서열번호 7), *OsHsp90-1* 정방향 프라이머 5'-CTACGTGCGCCGCGTCTTCA-3'(서열번호 8) 및 역방향 프라이머 5'-CGGCTCGAACGACCTCTTCCTCT-3'(서열번호 9), *OsLIP19* 정방향 프라이머 5'-AGCCCCTCGGGTTGGTCGAA-3'(서열번호 10) 및 역방향 프라이머 5'-AGAAGGAGTGGGAACGGCGG-3'(서열번호 11), *OsSa1T* 정방향 프라이머 5'-GGTCCGTGGGGCGGAAATGG-3'(서열번호 12) 및 역방향 프라이머 5'-ACTGGGCCATGGGTTCCAGA-3'(서열번호 13), *OsPR1b* 정방향 프라이머 5'-CCTGGGACACGAGCGTGCAG-'3(서열번호 14) 및 역방향 프라이머 5'-TCGCTCTTCTCGCCCACCCA-'3(서열번호 15), *OsPBZ1* 정방향 프라이머 5'-TGAGGTCGAGGGGGATGGCG-'3(서열번호 16) 및 역방향 프라이머 5'-CGGCGGCCTCGATCTTCGTC-3'(서열번호 17)였다.

[0045] 그 결과 비생물학적 스트레스 중 열이나 저온 스트레스 처리에서는 양성 대조군 유전자의 발현은 확인되었으나, *OsCTR1* 유전자의 발현은 확인되지 않았고, 탈수 스트레스 처리에서만 12시간에서 48시간까지 *OsCTR1* 유전자의 발현이 유도된 것을 확인할 수 있었다. 또한 ABA, 살리실산 그리고 자스몬산을 처리한 벼의 잎에서도 *OsCTR1* 유전자의 발현이 유도된 것을 확인할 수 있었다(도 1b).

[0046] **실시예 3: *OsCTR1* 유전자를 과발현하는 애기장대 형질전환 실험**

[0047] *OsCTR1* 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대를 제조하기 위하여, 유전자의 항시 발현을 유도하는 CaMV35S 프로모터에 OsCTR1 유전자를 융합하고, DNA 구조물을 아그로박테리움 투머파시엔스 GV3101 (*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)에 형질전환하고, 꽃대침지법(floral dip transformation)에 따라 애기장대 식물체 형질전환을 유도하였다. 이들 식물체에서 얻은 종자를 카나마이신이 함유된 배지에서 발아시켜 카나마이신 저항성 식물체를 선발하였으며, 제 3 세대 종자를 대상으로 실험을 하였다. 이들 형질전환 애기장대에 삽입된 목적유전자를 확인하기 위해 RT-PCR 분석을 실시하였다. 이 유전자는 벼에서 분리한 것으로 원래 애기장대에 존재하지 않으므로 비형질전환체(WT, 35S:EYFP)에서 검출되지 않았으며, 형질전환체(35S:OsCTR1-EYFP #1, 4, 5)에서는 *OsCTR1* 유전자가 확인되었다(도 2).

[0048] **실시예 4: *OsCTR1* 유전자 발현량 변화에 따른 형질전환 애기장대의 표현형 관찰**

[0049] 벼에서 *OsCTR1*의 발현이 ABA 처리에 의해 유도된다는 점으로 미루어 볼 때, *OsCTR1*은 ABA에 의존하여(ABA-dependent) 작용이 활성화되는 유전자임을 알 수 있었다. *OsCTR1* 유전자의 과발현체가 환경 스트레스 관련 식물 호르몬인 ABA에 어떻게 반응하는지 확인하기 위해 0.5, 1 μM ABA를 포함한 MS 배지에서 발아율을 관찰하였다. ABA를 포함하지 않은 배지에서는 비형질전환체 및 *OsCTR1* 유전자 과발현체의 발아 및 생장에 차이가 없었으나, 0.5, 1 μM ABA를 포함한 배지에서는 *OsCTR1* 유전자의 과발현체가 ABA에 대하여 감수성이 높은(hypersensitve) 것으로 확인되었다(도 3).

[0050] 그리고 *OsCTR1* 유전자의 과발현체를 0.5, 1 μM ABA를 포함한 MS 배지에서 떡잎 녹화율을 관찰하였다. ABA를 포함하지 않은 배지에서는 비형질전환체 및 *OsCTR1* 유전자 과발현체의 떡잎 녹화율에 차이가 없었으나, 0.5, 1 μM ABA를 포함한 배지에서는 *OsCTR1* 유전자 과발현체가 ABA에 대하여 감수성이 높은(hypersensitve) 것으로 확인되었다(도 4).

[0051] 그리고 *OsCTR1* 유전자의 과발현 애기장대 잎의 기공 개도 크기를 관찰하였다. ABA를 포함하지 않은 배지에서는 비형질전환체 및 *OsCTR1* 유전자 과발현체의 평균 기공 개도 크기에 차이가 없었으나, 0.5, 1 μM ABA를 포함한 배지에서는 *OsCTR1* 유전자 과발현체가 ABA에 대하여 감수성이 높은(hypersensitve) 것으로 확인되었다(도 5).

[0052] **실시예 5: *OsCTR1* 유전자 형질전환 애기장대의 탈수 스트레스 저항성 실험**

[0053] 먼저 *OsCTR1* 유전자 과발현 애기장대 잎의 수분 손실 정도를 비형질전환 애기장대의 잎과 비교하였다. 2주 키운 식물체의 로제타 잎들을 떼어내어 자연 건조 시키면서 최대 6시간까지 매 30분 마다 무게를 측정하며 수분 감소율을 측정하였다. 그 결과 *OsCTR1* 유전자 과발현 애기장대의 잎이 비형질전환 애기장대의 잎에 비해 수분 손실이 적은 것으로 나타났으며(도 6A), 떼어낸 잎의 모양도 비형질전환체의 잎보다 더 오랫동안 원래의 모양을 유지하는 것을 볼 수 있었다(도 6B).

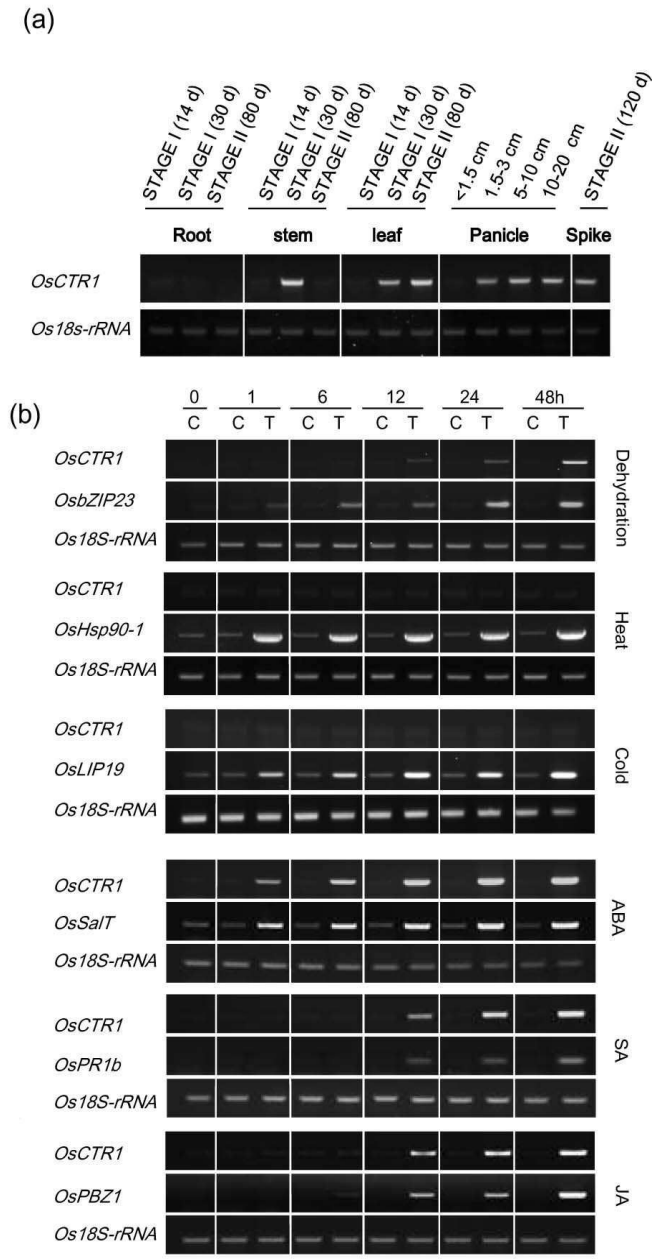
[0054] 그리고 대조군에 비해 높은 탈수 스트레스 저항성을 보인 *OsCTR1* 유전자 과발현 애기장대 잎의 과산화수소 축적 정도를 조직화학적 염색법을 통해 측정하였다. 탈수 처리 후 90분 및 180분 후의 형질전환 및 비형질전환 애기장대 잎을 1 ㎎ ·㎖$^{-1}$ 농도의 3,3'-디아미노벤지딘(diaminobenzidine) 용액에 4시간 동안 담궈 둔 후, 표백 용액(에탄올:아세트산:글리세롤 3:1:1)에 옮겨 담은 후 95℃에서 15분 동안 끓인 후 염색된 정도를 관찰하였다. 그 결과 형질전환 애기장대 잎에서 탈수가 진행될수록 더 많은 과산화수소의 축적을 확인할 수 있었다(도 7).

[0055] **실시예 6: *OsCTR1* 유전자 형질전환 애기장대의 가뭄 저항성 실험**

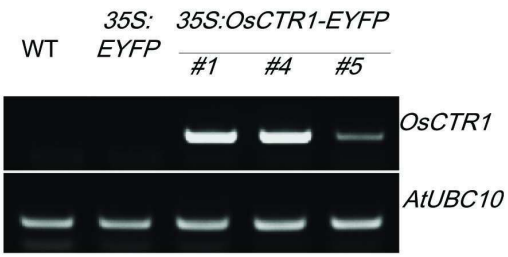
[0056] *OsCTR1* 유전자 과다 발현 애기장대가 가뭄 스트레스에 저항성을 보이는지 확인하기 위해 가뭄 저항성 실험을 수행하였다. 2 주 동안 온실에서 키운 형질전환 애기장대와 비형질전환 애기장대를 10일 동안 물을 주지 않음으로써 가뭄 스트레스 조건을 준 결과, *OsCTR1* 형질전환 애기장대가 비형질전환 애기장대보다 가뭄 스트레스에 저항성을 나타내었고, 물을 다시 주어 회복되는 정도를 3일 후에 확인한 결과 대조군인 비형질전환 애기장대는 18%의 생존율만 보인 반면, *OsCTR1* 유전자 과발현 형질전환 애기장대들은 74%에서 95%까지 높은 생존율을 보여주었다(도 8).

도면

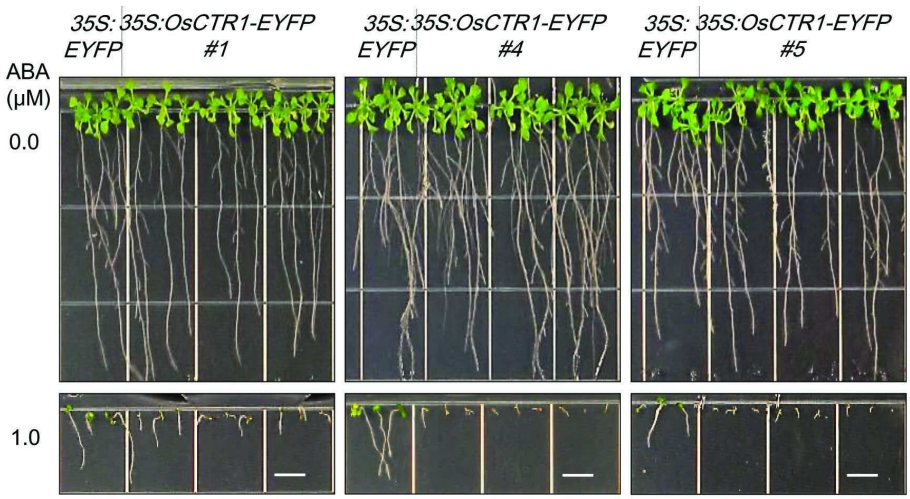
도면1


(a)
STAGE I (14 d)
STAGE I (30 d)
STAGE II (80 d)
STAGE I (14 d)
STAGE I (30 d)
STAGE II (80 d)
STAGE I (14 d)
STAGE I (30 d)
STAGE II (80 d)
<1.5 cm
1.5-3 cm
5-10 cm
10-20 cm
STAGE II (120 d)
Root
stem
leaf
Panicle
Spike
OsCTR1
Os18s-rRNA
(b)
0
1
6
12
24
48h
C
C T
C T
C T
C T
C T
OsCTR1
OsbZIP23
Os18S-rRNA
Dehydration
OsCTR1
OsHsp90-1
Os18S-rRNA
Heat
OsCTR1
OsLIP19
Os18S-rRNA
Cold
OsCTR1
OsSalT
Os18S-rRNA
ABA
OsCTR1
OsPR1b
Os18S-rRNA
SA
OsCTR1
OsPBZ1
Os18S-rRNA
JA

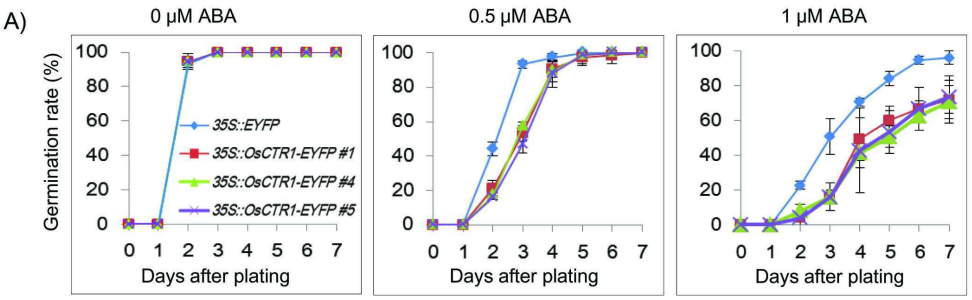
도면2

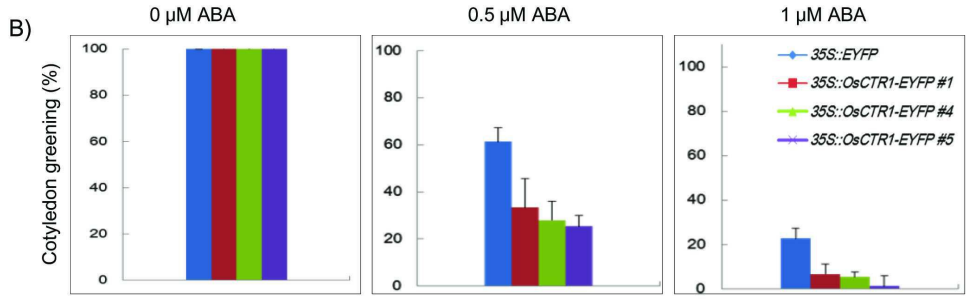

WT
35S: EYFP
35S:OsCTR1-EYFP
#1
#4
#5
OsCTR1
AtUBC10

도면3

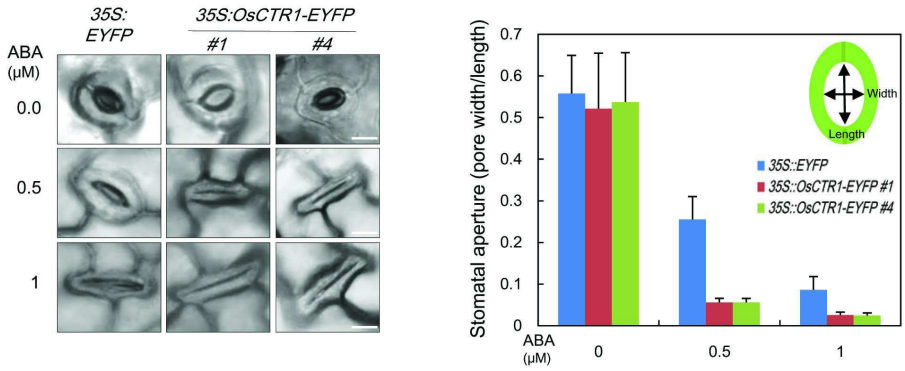

35S:EYFP
35S:OsCTR1-EYFP #1
35S:EYFP
35S:OsCTR1-EYFP #4
35S:EYFP
35S:OsCTR1-EYFP #5
ABA (μM)
0.0
1.0

도면4

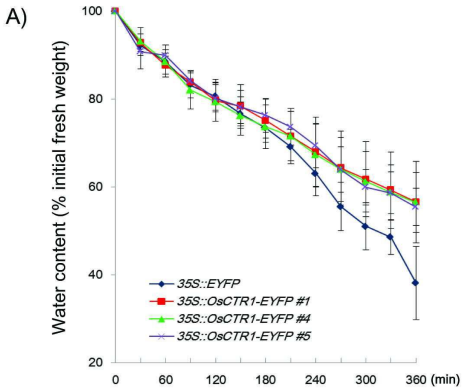

A)
0 μM ABA
0.5 μM ABA
1 μM ABA
Germination rate (%)
Days after plating
35S::EYFP
35S::OsCTR1-EYFP #1
35S::OsCTR1-EYFP #4
35S::OsCTR1-EYFP #5

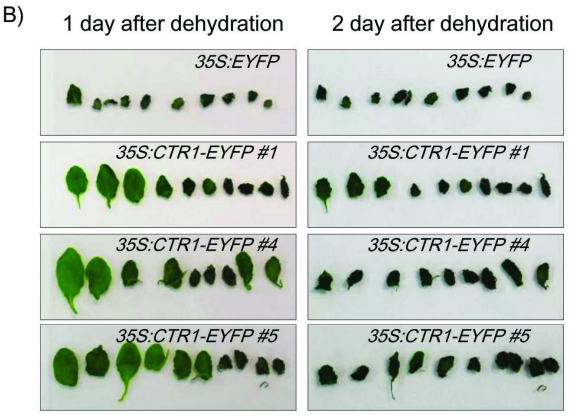

B)
0 μM ABA
0.5 μM ABA
1 μM ABA
Cotyledon greening (%)
35S::EYFP
35S::OsCTR1-EYFP #1
35S::OsCTR1-EYFP #4
35S::OsCTR1-EYFP #5

도면5

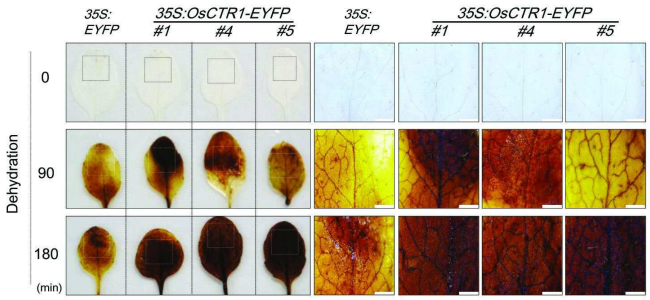

35S:
EYFP
35S:OsCTR1-EYFP
#1
#4
ABA
(μM)
0.0
0.5
1
Stomatal aperture (pore width/length)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Width
Length
35S::EYFP
35S::OsCTR1-EYFP #1
35S::OsCTR1-EYFP #4
ABA
(μM)
0
0.5
1

도면6

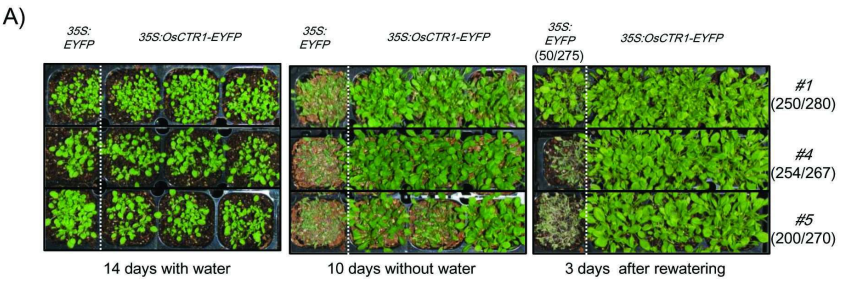

A)
Water content (% initial fresh weight)
100
80
60
40
20
0
60
120
180
240
300
360 (min)
35S::EYFP
35S::OsCTR1-EYFP #1
35S::OsCTR1-EYFP #4
35S::OsCTR1-EYFP #5

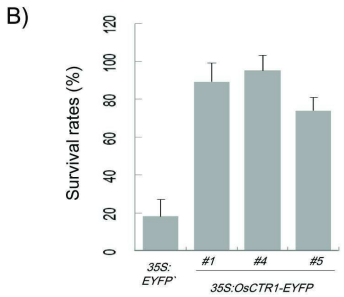

B)
1 day after dehydration
2 day after dehydration
35S:EYFP
35S:CTR1-EYFP #1
35S:CTR1-EYFP #4
35S:CTR1-EYFP #5

도면7



도면8





서 열 목 록

<110> KNU-Industry Cooperation Foundation

<120> OsCTR1 gene from rice for increasing drought stress resistance of plant and uses thereof

<130> PN13085

<160> 17

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 348

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

atgagctacc tcctctccta catctccaag atgctgtgca tcaagattcc gtcggaggcg 60

aggcaagcca gcgaggacgg cggcagcggt ggcctgacgg agtgctccgt ctgtctctcc 120

aggatccgtg tcggcgaggc gacgaggcgt ctgccctgcc ggcatgcgtt ccaccgggac 180

tgcgtcgacc ggtggctcct ctcatgcagg cggacgtgcc cgctttgccg ggtttacgtc 240

gtcgtcgacg gtaacaagcc aggggtggca gcgaagcaca ccggcgagcc gccgctcgct 300

gaagacatgg tgatctggtt ctctgccatg ctcgtccctg gattctga 348

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

acatctccaa gatgctgtgc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

agcatggcag agaaccagat 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

atgataactc gacggatcgc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

cttggatgtg gtagccgttt 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ctctgatccc tcgttgcgtt a 21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

caacacccca gcaccaaact 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ctacgtgcgc cgcgtcttca 20

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

cggctcgaac gacctcttcc tct 23

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

agcccctcgg gttggtcgaa 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

agaaggagtg ggaacggcgg 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

ggtccgtggg gcggaaatgg 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

actgggccat gggttccaga 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

cctgggacac gagcgtgcag 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

tcgctcttct cgcccaccca 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

tgaggtcgag ggggatggcg 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

cggcggcctc gatcttcgtc 20