



등록특허 10-2443895



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월15일

(11) 등록번호 10-2443895

(24) 등록일자 2022년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/8273 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0071134

(22) 출원일자 2020년06월11일

심사청구일자 2020년06월11일

(65) 공개번호 10-2021-0154033

(43) 공개일자 2021년12월20일

(56) 선행기술조사문헌

Seok Keun Cho 등. Plant Physiology. Vol. 157,
페이지 2240-2257 (2011.10.03.)*

GenBank Accession Number NM_124979
(2019.02.14.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김우택

서울특별시 마포구 마포대로 195, 410동 704호(아현동, 마포 래미안 푸르지오)

유성관

경기도 시흥시 은계남로 12, 1305동 2902호(은행동, 시흥은계 호반 씨밋플레이스)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 6 항

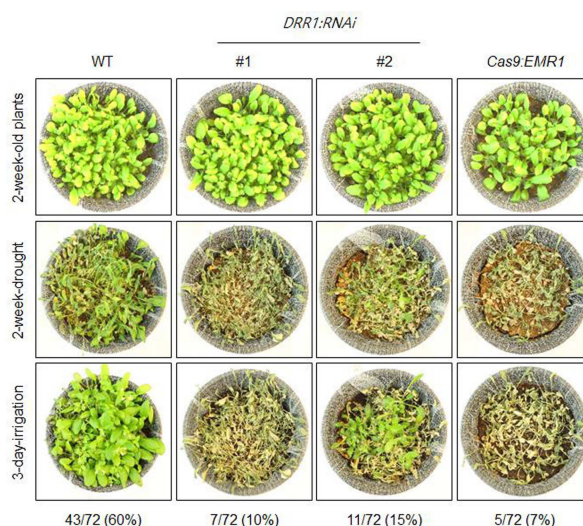
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 식물의 건조 스트레스 내성 반응에 관여하는 신규 유전자 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 식물의 건조 스트레스 내성을 증진시키는 신규 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 DRR1(Drought Responsive RING 1) 단백질 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는, 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물, 상기 조성물로 형질전환된 식물 세포 및 식물체에 관한 것으로서, 본 발명의 식물체 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물은 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성을 증진시키며, 본 발명의 형질전환 식물 세포 및 식물체는 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 식물체의 재배 단계에서 건조 환경 스트레스에 의해 발생하는 작물 생산량 손실을 줄일 수 있는 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C12N 15/8218 (2013.01)

(72) 발명자

조나현

전라북도 무주군 안성면 별묘길 32-11

김중흠

서울특별시 서대문구 연희로 377, 201동 201호(홍은동, 현대아파트)

오태린

경기도 부천시 소사로78번길 81, 101동 103호(소사본동, 두산, 삼성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711111051

과제번호 2020R1A2B5B02001590

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 [통합이지바로]애기장대의 단백질 품질제어 및 공변세포 미세소관 조절을 통한 환경스트레스 내성 반응 메커니즘 연구(1/3)

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 DRR1(Drought Responsive RING 1) 단백질;

또는 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 DRR1 유전자를 포함하는, 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물로서,

상기 DRR1은 식물체 내에서 불용성 단백질의 축적을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 DRR1 단백질 또는 DRR1 유전자는 건조 스트레스 조건에서 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는, 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 DRR1 유전자는 세포 내 소포체(endoplasmic reticulum)에 위치하는 것을 특징으로 하는, 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물 세포.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물체.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 식물체의 건조 스트레스 내성 증진 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 식물의 건조 스트레스 내성 반응에 관여하는 신규 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 DRR1(Drought Responsive RING 1) 단백질 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는, 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물, 상기 조성물로 형질전환된 식물 세포 및 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

늘어나는 인공로 인해 거주 면적이 증가하면서 이에 따른 경작지가 감소되고, 인구를 부양하기 위한 산업화에 결과로써 기후 변화가 실시간으로 진행되고 있다. 이로 인해, 작물 생산량이 감소하여 근 미래에 식량 부족 문제가 대두될 가능성이 높다.

[0003]

작물 생산에 있어서, 식물은 이동이 불가하기 때문에 그들의 일생동안 다양한 환경 요인들인 가뭄, 고염(high salt), 중금속, 냉해, 열충격 및 오존과 같은 스트레스에 직면하게 된다. 이러한 환경적 스트레스는 작물의 생

장과 발달의 제한 요인이 되기 때문에 작물의 생산성을 증가시키기 위해 스트레스 반응 유전자들에 대한 기능 연구가 중요하다. 따라서, 식물의 생산율을 높이기 위해 식물의 스트레스에 대한 내성을 증진시키는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004] 한편, 유비퀴틴은 모든 진핵생물에서 발견되는 76개의 아미노산으로 구성된 단백질로써, E1-E2-E3(유비퀴틴 활성화, 유비퀴틴 결합, 유비퀴틴 연결효소) 연쇄 효소반응에 의해서 다양한 기질 단백질에 공유결합이 되는 특성을 가진다. 유비퀴틴이 붙게 되는 기질 단백질은 매우 다양하여 세포 내의 거의 모든 생리활동에 영향을 주며, 많은 질병이 이러한 기작과 연결되어져 있다는 연구결과들이 잘 밝혀져 있다. 현재까지 밝혀진 유비퀴틴의 주요 기능은 다른 단백질에 결합함으로써 단백질의 분해를 촉진하는 것이었으나 최근 들어 유비퀴틴의 다른 기능들이 속속 밝혀지고 있다.

[0005] 특히, E3 ubiquitin(Ub) ligase는 전 생명체 내에 잘 보존되어 있는 작은 표지 단백질인 ubiquitin을 특정 기질에 결합시킴으로써, 26S proteasome system을 통해 해당 단백질의 분해를 유도하는 단백질로서, 식물의 건조 스트레스 상황에서 다양한 E3 Ub ligase들이 유전자 발현을 조절하는 전사 인자를 포함하는 다양한 세포 내 단백질들의 양 및 기능의 조절을 통해 건조 스트레스 내성 메커니즘에 관여하는 것이 보고된 바 있다(Ryu et al., 2010; Cho et al., 2011).

[0006] 그러나, 최근 연구에 따르면 건조 스트레스 상황에서 식물체 내에 불용성(Insoluble) 단백질이 축적되는 경향이 있어, 이러한 불용성 단백질의 제거에 관여하는 연구의 필요성이 대두되고 있으나, 아직까지 불용성 단백질의 축적과 건조 스트레스의 연관성에 대해 밝힌 연구는 미미한 상태이고, 건조 스트레스에 대한 내성이나 민감성에 관여하는 유전자들의 생물학적 기능들에 대한 지식은 여전히 부족한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Ryu et al(2010), Plant physiology 154: 1983-1997

(비특허문헌 0002) Cho et al(2011), Plant physiology 157: 2240-2257

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위하여, 건조 스트레스 환경에서 작물의 생산성을 향상시키는 방법에 대해 예의 연구한 결과, 건조 조건 하에서 애기장대에 축적되는 불용성 단백질의 양을 조절하여 건조 스트레스 내성에 관여하는 신규한 RING-type E3 ligase인 DRR1(Drought Responsive RING 1)을 선별하고, 상기 DRR1 유전자의 기능을 조절함으로써 식물의 건조 스트레스 내성에 변화를 줄 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 이에, 본 발명의 목적은 DRR1(Drought Responsive RING 1) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는, 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물 세포 및 식물체를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 식물체의 건조 스트레스 내성 증진 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 DRR1(Drought Responsive RING 1) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는, 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물을 제공한다.

- [0015] 본 발명의 일 구현예로, 상기 DRR1(Drought Responsive RING 1) 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 DRR1(Drought Responsive RING 1) 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 식물체 내에서 불용성 단백질의 축적을 억제시킬 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 조성물로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물 세포 및 식물체를 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 식물체의 건조 스트레스 내성 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 식물체 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물은 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성을 증진시키며, 본 발명의 형질전환 식물 세포 및 식물체는 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 식물체의 재배 단계에서 건조 환경 스트레스에 의해 발생하는 작물 생산량 손실을 줄일 수 있는 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 DRR1 유전자의 CDS 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 DRR1 유전자의 mRNA 발현양에 대한 RT-PCR 조사 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 식물 내 소포체 표지자인 BiP1-mRFP-HDEL 단백질과의 Co-localization 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 담배 발현 시스템을 이용한 DRR1 단백질의 Fractionation assay 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 DRR1의 CRISPR-Cas9 기법 기반 기능상실 식물체(*Cas9:DRR1*)의 기능상실 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 DRR1의 RNAi 기법 기반 기능저하 식물체(*DRR1:RNAi*)의 RT-PCR 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 DRR1의 CRISPR-Cas9 기법 기반 기능상실 식물체(*Cas9:DRR1*) 및 RNAi 기법 기반 기능저하 식물체(*DRR1-RNAi* #1, #2)의 건조 스트레스 내성 조사 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 DRR1의 CRISPR-Cas9 기법 기반 기능상실 식물체(*Cas9:DRR1*) 및 RNAi 기법 기반 기능저하 식물체(*DRR1-RNAi* #1, #2)의 건조 스트레스 조건에서의 불용성 단백질 축적량 변화를 나타낸 것이다.
- 도 9는 DRR1의 CRISPR-Cas9 기법 기반 기능상실 식물체(*Cas9:DRR1*) 및 RNAi 기법 기반 기능저하 식물체(*DRR1-RNAi* #1, #2)의 불용성 이상 단백질 유발 스트레스에 대한 내성 조사 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명자들은 건조 조건 하에서 애기장대에 축적되는 불용성 단백질의 양을 조절하여 건조 스트레스 내성에 관여하는 신규한 RING-type E3 ligase인 DRR1(Drought Responsive RING 1)을 선별하고, 상기 DRR1 유전자의 기능을 조절함으로써 식물의 건조 스트레스 내성에 변화를 줄 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0023] 이에, 본 발명은 DRR1(Drought Responsive RING 1) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는, 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어 "건조 스트레스"는 식물체의 일반적인 생육 환경보다 낮은 습도와 수분부족으로 인한 스트레스를 의미하는 것으로, 본 발명에서 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 증진은 건조 상황 하에서 식물의 수분 손실을 최소화 함으로써 식물이 유의적으로 높은 생존율을 보이게끔 하는 것을 의미한다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 DRR1(Drought Responsive RING 1) 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 DRR1 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는

것은 당업자에게 명확하다.

- [0027] 뉴클레오티드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈(예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.
- [0028] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 건조 스트레스 내성 DRR1 단백질(서열번호 1)은 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석하는 경우에, 본 발명에 따른 DRR1(Drought Responsive RING 1) 단백질은 서열번호 1과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 사용되는 용어 “식물(체)”는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 수 있는 식물세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 것을 의미한다.
- [0030] 본 발명에서 상기 식물체는 특별하게 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 식물체는 대부분의 쌍자엽 식물(dicotyledonous plant) 또는 단자엽 식물(monocotyledonous plant)이 모두 이용될 수 있으며, 바람직하게는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 쌀, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕 무우, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 식물체에 적용될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 식물체 내에 불용성 단백질의 축적을 억제시켜 건조 스트레스 내성을 조절할 수 있다.
- [0031] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 DRR1 유전자가 건조 스트레스에 내성이 있으며, 식물체 내에 불용성 단백질의 축적을 억제시켜 건조 스트레스 내성을 조절하는 것을 확인하였다.
- [0032] 보다 상세하게 본 발명의 일 실시예에서는, DRR1 유전자의 기능이 상실되거나 기능이 저하된 식물체를 제작하기 위하여 CRISPR-Cas9 기법에 기반하여 DRR1 유전자 서열을 변화시킨 식물체(*Cas9:DRR1*)를 제작하고, 상기 식물체가 DRR1 유전자의 기능을 상실하였음을 확인하였으며, RNAi 기법에 기반하여 DRR1 유전자 서열을 변화시킨 식물체(*DRR1:RNAi*)를 제작하고, 상기 식물체가 DRR1 유전자의 기능을 저하시키는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0033] 본 발명의 다른 실시예에서는 DRR1 기능상실(*Cas:DRR1*) 및 기능저하(*DRR1-RNAi #1, #2*) 식물체의 건조 스트레스 내성을 조사한 결과, DRR1 기능상실 식물체(*Cas:DRR1*) 및 DRR1 기능저하 식물체(*DRR1-RNAi #1, #2*)의 생존율이 훨씬 낮게 나타나는 것을 확인하였다(실시예 5 참조).
- [0034] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 DRR1 기능상실(*Cas:DRR1*) 및 기능저하(*DRR1-RNAi #1, #2*) 식물체에서 단백질을 추출한 후 원심분리를 통해 불용성 단백질(유비퀴틴화 단백질) 축적량 변화를 분석한 결과, 대조군인 야생종(WT)에 비해 DRR1 기능상실 식물체(*Cas:DRR1*) 및 DRR1 기능 저하 식물체(*DRR1-RNAi*)에서 유비퀴틴화 된 불용성 단백질 양이 증가해 있음을 확인하였으며(실시예 6 참조), 식물체에 불용성 이상 단백질의 축적을 유발하는 약제 AZC를 처리하고, 각 식물체의 생존율을 분석한 결과 AZC의 농도가 높을수록 대조군인 야생종(WT)에 비해 DRR1 기능상실 식물체 및 DRR1 기능저하 식물체의 생존율이 낮아지는 것을 확인하였다(실시예 7 참조).
- [0035] 이러한 본 발명의 실시예 결과는 DRR1 유전자가 건조 스트레스에 대한 내성에 관여한다는 것을 유추할 수 있으며, DRR1 유전자가 건조 스트레스 조건에서 축적되는 불용성 단백질을 제거한다는 것을 입증하는 것이다.
- [0036] 또한, 본 발명의 다른 양태로서 본 발명은 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물로 형질전환된 식물세포 및 식물체를 제공한다.
- [0037] 본 발명의 형질전환 식물세포 및 형질전환 식물체의 제조는 당업계에 일반적으로 공지된 방법에 따라 실시될 수 있다. 외래성 폴리뉴클레오티드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물을 형질전환시킬 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며, 직접 외래성 폴리뉴클레오티드를 식물 세포 내로 도입시켜 식물을 형질전환시킬 수 있다. 예를 들어, T-DNA 부위를 포함하지 않는 벡터를 이용하는 경우에는 전기천공법(electroporation), 입자충격법(microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법

(polyethylene glycol-mediated uptake)을 이용할 수 있다.

[0038] 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이 외래성 폴리뉴클레오티드로 형질전환 된 아그로박테리움 투메페이스언스(Agrobacterium tumefaciens)로 식물 세포나 종자 등을 감염시키는 방법이다(US 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호 참조). 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서 본 발명은 DRR1(Drought Responsive RING 1) 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는, 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 증진용 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 식물체의 건조 스트레스 내성 증진 방법을 제공한다.

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[실시예]

[0044] 실시예 1. DRR1 유전자 분리

[0045] 본 발명자들은 건조 스트레스에 관여하는 새로운 RING-type E3 ligase를 선별하기 위해, 애기장대의 cDNA로부터 건조스트레스 하에서 축적되는 불용성 단백질의 양을 조절하여 식물의 건조 스트레스 내성에 관여하는 DRR1 유전자를 분리 획득하였다.

[0047] 실시예 2. 고온 및 건조 스트레스 조건에서 DRR1 유전자의 증대 확인

[0048] 고온 및 건조 스트레스 조건에서 DRR1 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여, 고열 스트레스 표지유전자로 HSP17.4와 건조 스트레스 표지유전자로 RD29A를 사용하여 37℃ 및 42℃의 고온 스트레스 조건과 건조 스트레스 조건에서 각 mRNA 발현량에 대한 RT-PCR을 수행하였다. PCR은 DRR1 특이적인 합성 DNA 뉴클레오타이드 서열(Forward: 5'-GGGTGTTTCGATTCTAGGTTTGG-3'(서열번호 3); Reverse: 5'-GCAGAGAGGACAACAAGATGATAC-3'(서열번호 4)) 및 Taq 기반 polymerase를 이용하여 95℃ → 55℃ → 72℃의 온도 변화로 총 35회 반복하여 수행되었다.

[0049] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 DRR1 유전자의 발현이 42℃의 고열 및 건조 스트레스 조건에서 증진되는 것을 확인하였다.

[0051] 실시예 3. DRR1 유전자의 세포 내 발현 위치(소포체) 확인

[0052] DRR1 유전자의 세포 내 위치를 확인하기 위해, DRR1 유전자를 GFP로 표지하고 식물 내 소포체 표지자인 BiP1-mRFP-HDEL 단백질과 함께 담배 엽육 세포에서 Co-localization을 진행하였다.

[0053] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 담배 엽육세포에서 GFP로 표지한 DRR1 발현시 BiP1-mRFP-HDEL로 표지되는 소포체에 연결하여 발현되는 양상을 나타내는 것을 확인하였다.

[0054] 이에 더하여, 담배에 DRR1-GFP 재조합 단백질을 발현시킨 후, 내막계 분리 조건인 100,000xg로 초원심분리하고 UGPase는 세포질의 표지단백질로, Calnexin은 소포체의 표지 단백질로 이용하여 전체용액(T), 상층액(S) 및 침전물(M)을 각각 Fractionation assay로 분석하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 GFP로 표지한 DRR1-GFP는 소포체(침전물) 분획(M)에서 검출되는 것을 확인하였다.

[0055] 상기 결과들로부터, DRR1이 세포 내에서 소포체에 위치하는 것임을 유추할 수 있다.

[0057] 실시예 4. DRR1 기능상실 및 기능저하 식물체 제작

[0058] 4-1. CRISPR-Cas9 기법 기반 DRR1 기능저하 식물체(Cas9:DRR1) 제작

[0059] CRISPR-Cas9 기법에 기반하여 DRR1 유전자 서열을 변화시킨 식물체(Cas9:DRR1)를 제작하고 상기 식물체의 기능상실 여부를 확인하였다.

[0060] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 DRR1 CDS 서열을 시퀀싱 하였을 때 87번째 아데닌(Adenine)과 88번째 사이토신(Cytosine) 사이에 추가적인 사이토신(Cytosine)이 삽입되어, 99번 내지 101번 째 서열(Cytosine 삽입 전 기준)이 종결코돈인 TAA로 변하여 조기종결(Early stop)을 발생시키는 것을 확인하였다.

[0062] 4-2. RNAi 기법 기반 DRR1 기능저하 식물체(DRR1:RNAi) 제작

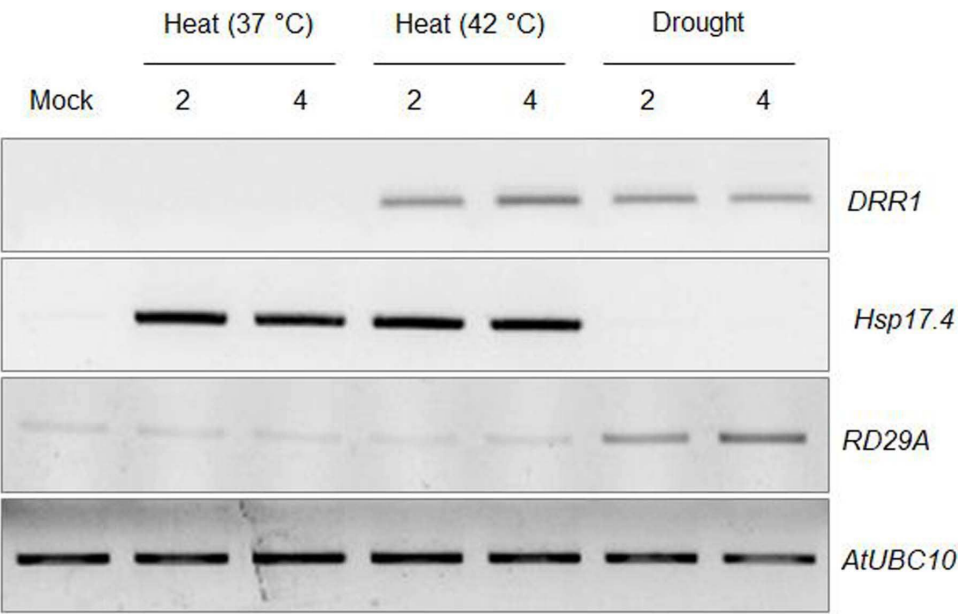
- [0063] RNAi 기법에 기반하여 DRR1 유전자 서열을 변화시킨 식물체(*DRR1:RNAi*)를 제작하고 기능 저하 여부를 확인하였다. 이때, 동량 시료에 대한 대조군으로 UBC10을 사용하였다.
- [0064] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 RNAi 기법으로 DRR1의 기능을 저하시킨 식물체에서 DRR1의 mRNA가 검출되지 않음을 확인하였다.
- [0066] **실시예 5. DRR1 기능상실 및 기능저하 식물체의 건조 스트레스 내성 확인**
- [0067] 상기 실시예 4에서 제작한 CRISPR-Cas9 기법 기반 DRR1 기능상실 식물체(*Cas:DRR1*) 및 RNAi 기법 기반 기능저하 식물체(*DRR1-RNAi #1, #2*)를 2주령 동안 생장(2-week-old plants)시킨 다음, 2주 동안 관수 없이 건조 스트레스 상태를 유도하였다(2-week-drought). 또한, 건조 스트레스가 유도된 각각의 식물체에 3일 동안 재관수를 시행하고(3-day-irrigation) 각 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성을 조사하였다.
- [0068] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 재관수를 시행하였을 때, 대조군인 야생종(WT)의 경우 식물체가 다시 회복되는 양상을 나타냈으나, DRR1 기능상실 식물체(*Cas:DRR1*) 및 DRR1 기능저하 식물체(*DRR1-RNAi #1, #2*)의 생존율이 훨씬 낮은 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 DRR1이 건조 스트레스에 대한 내성에 관여하는 것을 확인할 수 있다.
- [0070] **실시예 6. 건조 스트레스 조건에서 DRR1 기능저하 및 기능상실 식물체의 불용성 단백질 축적량 변화 확인**
- [0071] DRR1이 건조 스트레스 조건에서 불용성 단백질의 축적을 억제시켜 건조 스트레스 내성을 나타낸다는 것을 확인하기 위하여, 정상상태(Mock)와 5일간 관수하지 않은 건조 스트레스 처리구(Drought)의 CRISPR-Cas9 기법 기반 DRR1 기능상실 식물체(*Cas:DRR1*) 및 RNAi 기법 기반 기능저하 식물체(*DRR1-RNAi #1, #2*)의 단백질을 추출하고 원심분리를 통해 불용성 단백질(유비퀴틴화 단백질) 축적량 변화를 분석하였다.
- [0072] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 정상상태(Mock)에 비해 건조 스트레스 조건에서 불용성 단백질 양이 증가해 있음을 확인하였으며, 특히 대조군인 야생종(WT)에 비해 DRR1 기능상실 식물체(*Cas:DRR1*) 및 DRR1 기능저하 식물체(*DRR1-RNAi*)에서 유비퀴틴화 된 불용성 단백질 양이 증가해 있음을 확인하였다. 상기 결과로부터, DRR1이 건조 스트레스 조건에서 축적되는 불용성 단백질을 제거한다는 것을 유추할 수 있다.
- [0074] **실시예 7. DRR1 기능저하 및 기능상실 식물체의 불용성 단백질 유발 스트레스 내성 확인**
- [0075] DRR1 기능상실 또는 기능저하 식물체에서 불용성 이상 단백질 유발 스트레스에 대한 내성을 확인하기 위하여, 식물체에 불용성 이상 단백질의 축적을 유발하는 약제 AZC(azetidine-2-carboxylic acid)를 처리하고, 각 식물체의 생존율을 분석하였다.
- [0076] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 AZC의 농도가 높을수록 대조군인 야생종(WT)에 비해 DRR1 기능상실 식물체 및 DRR1 기능저하 식물체의 생존율이 낮아지는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, DRR1 기능상실 및 기능저하 식물체들의 감소된 건조 스트레스 내성 표현형이 건조 스트레스에 의해 유발되는 불용성 이상 단백질 축적에 대응하지 못하여 발생하는 결과임을 유추할 수 있다.
- [0078] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

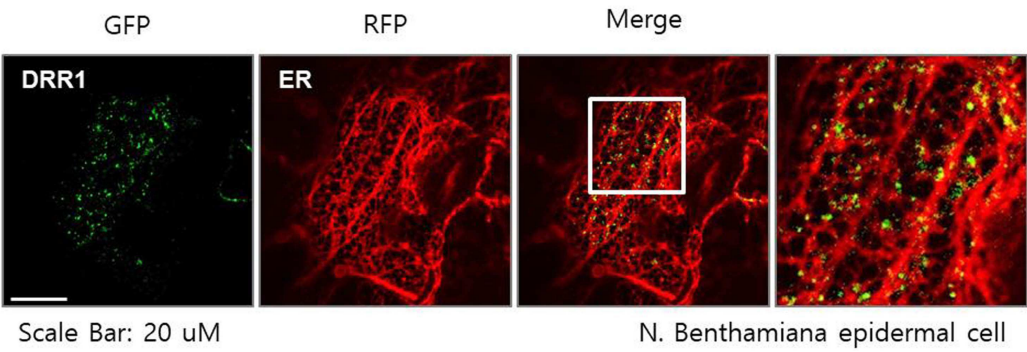
도면1



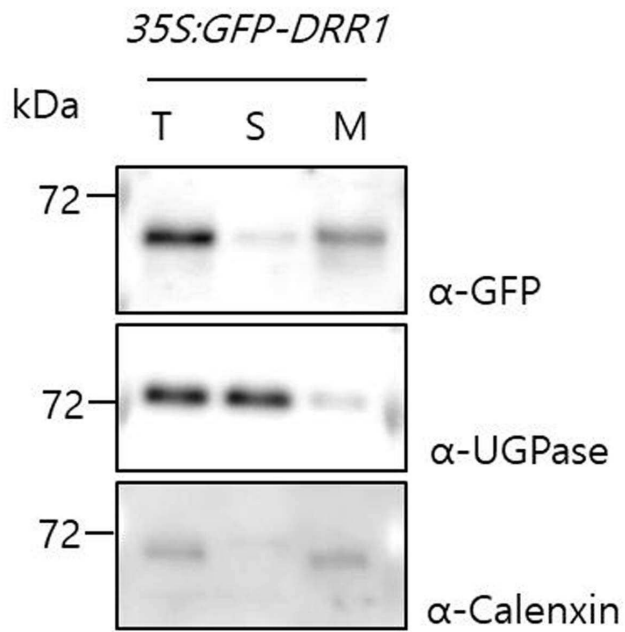
도면2



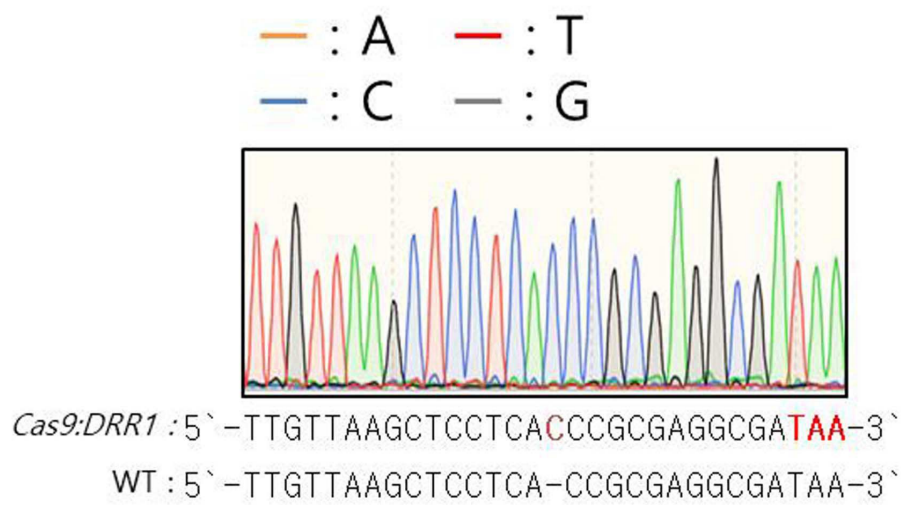
도면3



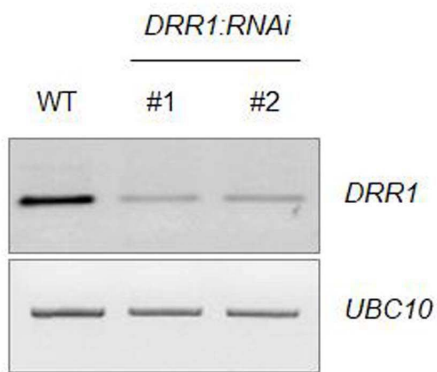
도면4



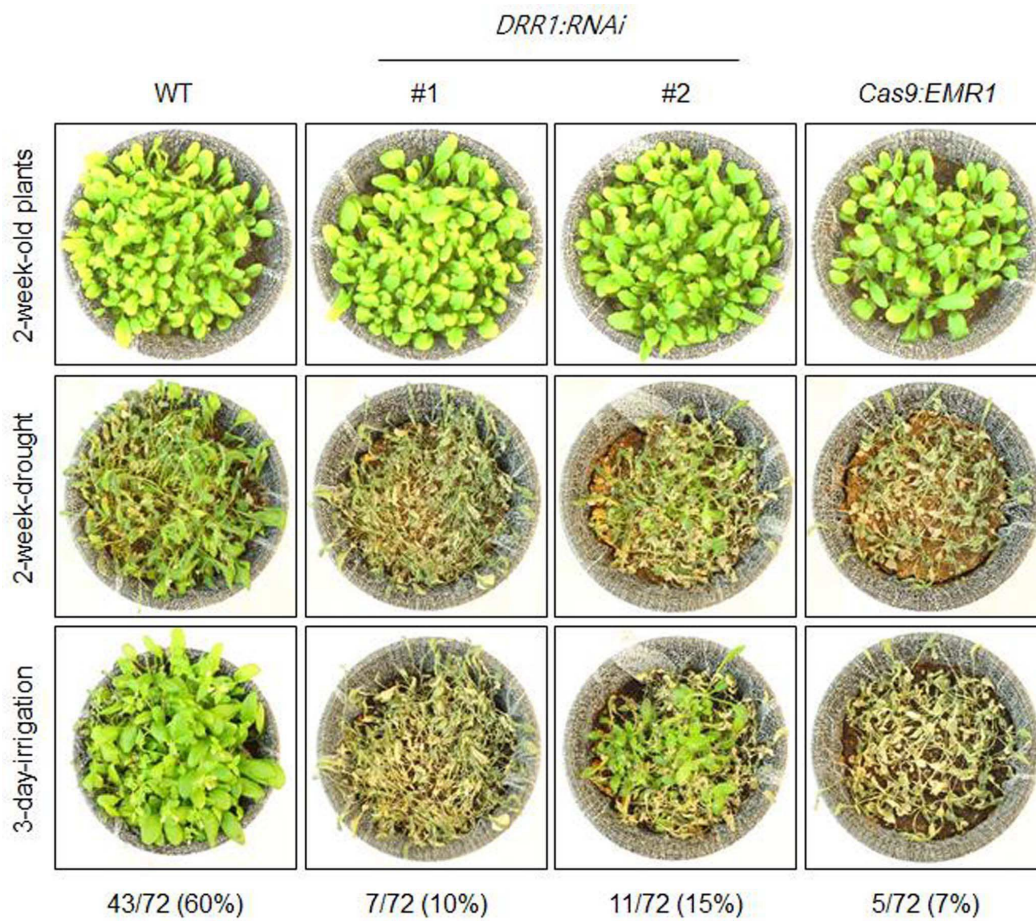
도면5



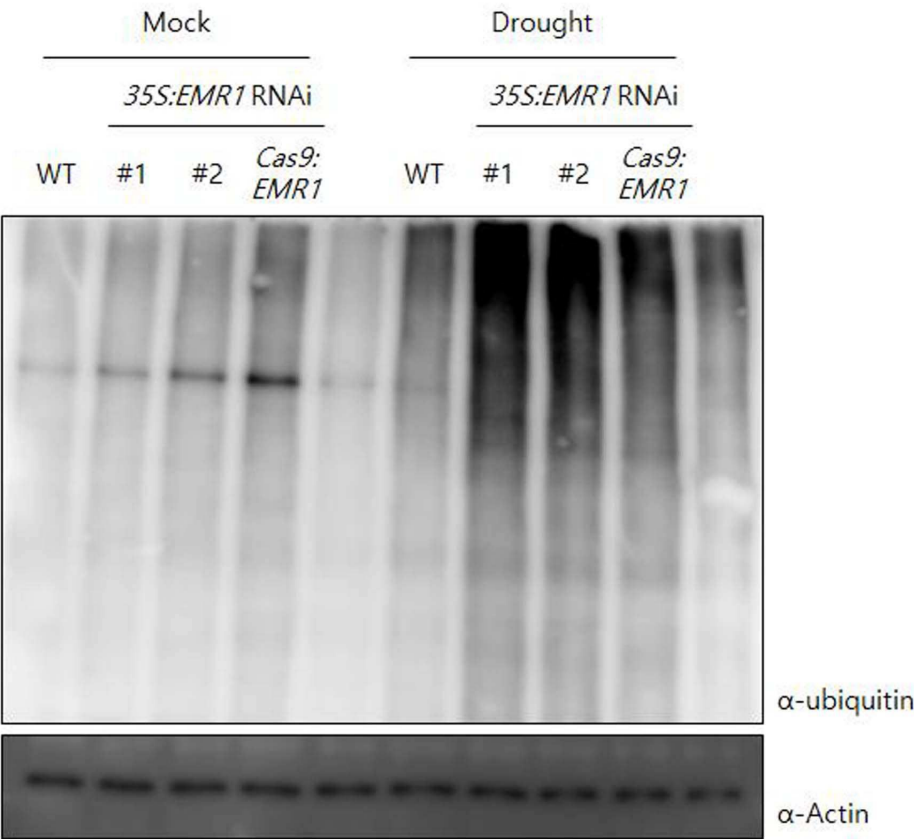
도면6



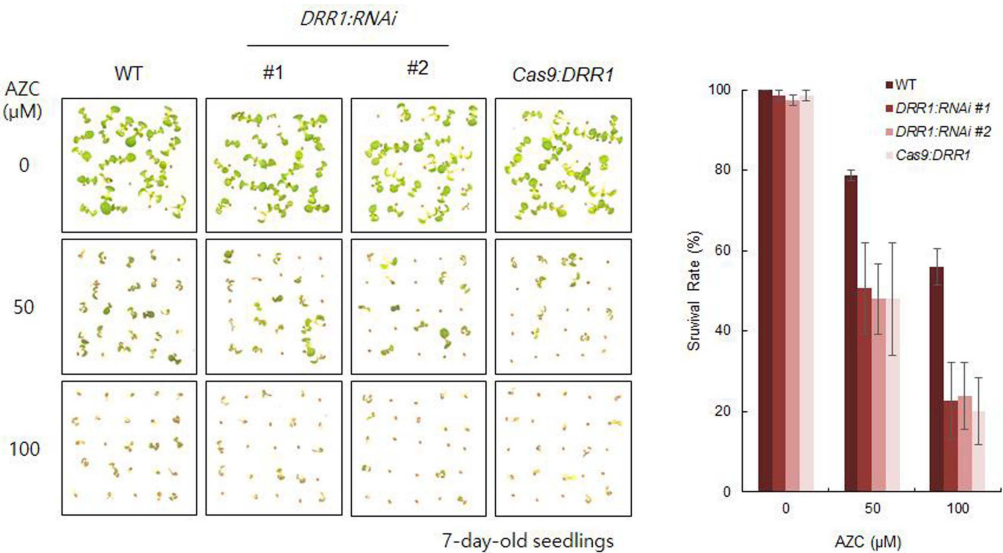
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Novel gene related to plant drought stress tolerance and use thereof

<130> PD20-092

<160> 4

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 343

<212> PRT

<213> DRR1(Drought Responsive RING 1)

<400> 1

Met Asn Thr Arg Tyr Ser Asn Gln Pro Glu Leu Ser Ser Ser Asn Ile

1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Ser Ser Ser Ala Leu Leu Ser Ser Ser Pro Arg Gly

20 25 30

Asp Asn Ser His Val Ala Ala Ala Asn Gly Gln Glu Arg Ser Pro Ser

35 40 45

Ser Phe Tyr Ile Arg Leu Ala Met Lys Val Ser Arg Ala Arg Trp Phe

50 55 60

Ile Phe Leu Arg Arg Val Phe His Tyr Gln Asn Gly Ser Arg Ser Asp

65 70 75 80

Leu Gly Ser Asn Pro Phe Asn Ser Ser Thr Trp Met Met Ser Glu Leu

85 90 95

Ile Ala Leu Leu Val Gln Leu Thr Val Ile Thr Phe Thr Leu Ala Ile

100 105 110

Ser Lys Glu Glu Arg Pro Ile Trp Pro Val Arg Leu Trp Ile Thr Gly

115 120 125

Tyr Asp Val Gly Cys Leu Leu Asn Leu Met Leu Leu Tyr Gly Arg Tyr

130 135 140

Arg Gln Leu Asp Ile Asn Gln Gly Asn Gly Phe Val Leu Gly Asp Val

145 150 155 160

Glu Gln Gln Gln Arg Gly Arg Glu Glu Thr Arg Ser Ser His Leu Met

165 170 175

Asn Lys Cys Arg Thr Ser Leu Glu Leu Phe Phe Ala Ile Trp Phe Val

180 185 190

Ile Gly Asn Val Trp Val Phe Asp Ser Arg Phe Gly Ser Phe His His
195 200 205
Ala Pro Lys Leu His Val Leu Cys Val Ser Leu Leu Ala Trp Asn Ala
210 215 220
Ile Cys Tyr Ser Phe Pro Phe Leu Leu Phe Leu Phe Leu Cys Cys Leu
225 230 235 240
Val Pro Leu Ile Ser Ser Leu Leu Gly Tyr Asn Met Asn Met Gly Ser
245 250 255
Ser Asp Arg Ala Ala Ser Asp Asp Gln Ile Ser Ser Leu Pro Ser Trp
260 265 270
Lys Phe Lys Arg Ile Asp Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
275 280 285
Ala Thr Val Thr Asp Asp Pro Glu Cys Cys Ile Cys Leu Ala Lys Tyr
290 295 300
Lys Asp Lys Glu Glu Val Arg Lys Leu Pro Cys Ser His Lys Phe His

305 310 315 320
Ser Lys Cys Val Asp Gln Trp Leu Arg Ile Ile Ser Cys Cys Pro Leu
325 330 335
Cys Lys Gln Asp Leu Pro Arg

340

<210> 2

<211> 1032

<212> DNA

<213> DRR1(Drought Responsive RING 1)

<400> 2

atgaatacac gttattccaa tcagccggag ttatcttcta gtaatatcac gatcactatt 60

tcacgtctg ctttgtaag ctctcaccg cgaggcgata acagtcatgt tgctgtgct 120

aatggtaag agaggtctcc atcttcgttt tatataaggc tggtatgaa ggtatctaga 180

gctagatggt tcactttctt gagaagagtg ttctactacc agaacggttc aagatctgac 240

cttgggtcta atcctttcaa ttctagcact tggatgatgt ctgagctcat tgctctactt 300

gttcagctca ctgtgataac attcactcta gctatctcca aagaagagag accaatttgg 360

ccagtgaggc tatggatcac aggatacgat gtgggatgtc ttttgaatct catgctgtta 420

tatggtcggt atcgtaact agacattaac caaggaaatg ggtttgcct tggcgatgtt	480
gagcagcaac agagaggcag agaagaaact aggtcctctc acttgatgaa caaatgcaga	540
acgtcgctag agcttttctt tgcgatttgg tttgtgattg gaaatgtttg ggtgttcgat	600
tctaggtttg gtcttttcca ccatgctccc aagcttcacg ttctctgcgt ctctctttta	660
gcttggaacg ctatctgcta ttcttttccc tttcttctct tectcttctt ctgttgcctt	720
gttctctca taagtagcct ccttggatat aacatgaaca tgggacctc agacagagca	780
gcatcagatg accaaatctc tagtctcct agctggaaat tcaaacgaat cgacgatagt	840
gcttctgatt ctgattcaga ttacgtact gtaactgatg atccagagtg ttgtatatgt	900
ttggcaaagt ataaagacaa agaagaagta aggaagcttc catgttcaca taagtttcac	960
tcaaagtgtg tagatcaatg gcttcgtatc atctcttgtt gtcctctctg caaacaagat	1020
cttccaagat ga	1032
<210> 3	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DRR1 specific forward primer	
<400> 3	
gggtgttcga ttctaggttt gg	22
<210> 4	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DRR1 specific reverse primer	
<400> 4	
gcagagagga caacaagaga tgatac	26

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 5

【변경전】

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물 세포.

【변경후】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물 세포.

【식권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6

【변경전】

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물체.

【변경후】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 건조 스트레스 내성이 증진된 식물체.

【식권보정 3】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 7

【변경전】

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 식물체의 건조 스트레스 내성 증진 방법.

【변경후】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 식물체의 건조 스트레스 내성 증진 방법.