



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월19일
(11) 등록번호 10-2230148
(24) 등록일자 2021년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/29 (2006.01) A01H 5/00 (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0149589
(22) 출원일자 2014년10월30일
심사청구일자 2019년07월25일
(65) 공개번호 10-2016-0053106
(43) 공개일자 2016년05월13일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100040939 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
김우택
서울특별시 마포구 마포대로 195 410동 704호 (마포 래미안-푸르지오 아파트)
민혜조
서울특별시 서대문구 연희로36길 26 3동 201호 (연희동, 동진빌라)
(74) 대리인
공병욱

전체 청구항 수 : 총 6 항

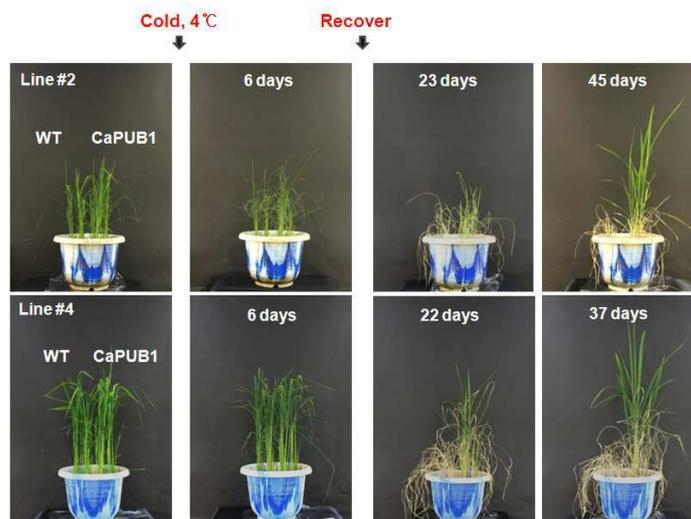
심사관 : 김재현

(54) 발명의 명칭 식물의 저온 스트레스 내성을 증진시키는 조성물 및 이를 이용한 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 식물의 저온 스트레스 저항성을 증가시키는 조성물 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 본 발명의 조성물 또는 방법을 사용함으로써 저온 스트레스(cold stress)에 대하여 식물체의 내성(저항성)을 효과적으로 증진시킬 수 있다.

대표도 - 도3a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008152
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	작물의 ARM-U-box 도메인 유전자 기능 분석을 통한 환경스트레스 내성 신기능 GM 작
물 개발 연구	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2014.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물체의 저온 스트레스 내성 증진용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

(a) 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합(operatively linked)되어 있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 저온 스트레스 내성 증진용 조성물.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 조성물에 의해 형질전환된 형질전환식물세포.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 조성물에 의해 형질전환된 형질전환식물체.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 저온 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법:

- (a) 식물 세포 또는 식물 조직을 서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터로 형질전환하는 단계;
- (b) 형질전환된 식물세포 또는 식물조직을 선별하는 단계; 및
- (c) 상기 형질전환된 식물세포 또는 식물조직으로부터 식물체를 재분화시켜 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물의 저온 스트레스 저항성을 증가시키는 조성물 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물이 저온 스트레스를 받았을 때 작용하는 유전자들에 대한 연구가 많이 이루어졌으며, 저온 스트레스에 대처

하기 위한 식물의 세포학적, 생리학적 반응들도 보고되어지고 있다(Thomashow MF., 2010). 식물의 저온 스트레스 반응 기작에 관여하는 주요한 단백질의 틴-오버에 E3 유비퀴틴 리가아제(ubiquitin ligase)가 기능한다고 밝혀지면서 유비퀴틴화(ubiquitination)-26S 프로테아좀(proteasome) 시스템에 대한 연구의 중요성이 부각되고 있다.

[0003] 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 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, 사탕무, 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, 레드 클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류 등, 경작의 대상이 되는 많은 작물의 경우, 저온에 노출되는 경우, 심각한 피해를 입을 수 있다. 특히 지대가 높은 지역이나 아열대지역은 기온 변화의 폭이 크기 때문에 20℃ 이하의 저온에 자주 노출될 수 있다. 저온은 생장을 저해하고, 광합성 효율을 낮추며, 분얼의 발달 및 벼의 수확량(spike) 발달을 방해하여 곡출(Grain yield)을 크게 감소시킨다(suh J. et al., 2010). 일례를 들면, 실제로 한국에서는 생식 단계(reproductive stage) 동안에 저온 기후가 발생하였던 지난 1971년, 1980년, 그리고 1993년에 전체 벼 생산면적의 각각 17, 18, 20%가 손실을 입었으며, 1980년에는 최대 3.9 t/ha에 해당하는 손실을 기록한 바 있다(Zhang et al., 2013).

[0004] 이러한 저온 스트레스를 해결하기 위한 종래 기술로는 공개특허공보 제10-2005-0117630호 "저온 내성을 증진시키는 저온-유도성 OsAsr1 유전자 및 단백질", 공개특허공보 제10-2014-0043982호 "AtPrx 유전자 도입된 저온 저항성 식물체 및 저온 스트레스에 대한 저항성을 갖는 식물체의 제조방법", 공개특허공보 제10-2009-0032462호 "오이 유래의 저온 스트레스 내성 유도 카이네이스 유전자의 프로모터 및 상기 프로모터를 이용한 형질전환 식물"이 공지되어 있다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 저온 스트레스(cold stress)에 대하여 식물체의 내성(저항성)을 증진시킬 수 있는 방법을 발굴하고자 예의 노력하였다. 그 결과 *Capsicum annum* cv. Pukang으로부터 유래한 *CaPUB1* 유전자를 도입한 식물체의 경우에 저온 스트레스 내성이 증진되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 식물체의 저온 스트레스 내성 증진용 조성물을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상술한 조성물에 의해 형질전환된 형질전환식물세포를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 조성물에 의해 형질전환된 형질전환식물체를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 저온 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물체의 저온 스트레스 내성 증진용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명자들은 저온 스트레스(cold stress)에 대하여 식물체의 내성(저항성)을 증진시킬 수 있는 방법을 발굴하

고자 예의 노력하였다. 그 결과 *Capsicum annuum* cv. Pukang으로부터 유래한 *CaPUB1* 유전자를 도입한 식물체의 경우에 저온 스트레스 내성이 증진되는 것을 확인하였다.

- [0014] 본 명세서에서 용어 "저온 스트레스(cold stress)"는 일반적인 식물 성장 환경에 비하여 낮은 온도를 의미하며, 식물 종에 따라 차이가 발생할 수 있다. 일반적으로 예를 들면, 15℃ 이하, 더 구체적으로 10℃이하, 더욱 더 구체적으로 7℃ 이하, 더욱 더 구체적으로 4℃ 이하의 온도에 의한 스트레스를 의미한다. 이에 따른 식물체의 표현형으로는 잎의 팽창(expansion), 시들음(leaf-wilting), 백화(chlorosis) 및 괴사(necrosis)를 포함하고, 생식기관의 성장 및 발달 저하의 결과를 초래한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것이다. 서열목록 제2서열의 핵산서열은 GenBank Accession number, ABA59556.1에 해당하는 서열이다. 다만, 본 발명에 있어서의 핵산 서열은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열인 것으로 족하며, 서열목록 제2서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.
- [0016] 뉴클레오타이드에서의 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.
- [0017] 본 명세서에서 용어 "핵산(nucleic acids)"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0018] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 저온 스트레스 내성 증진을 위한 *CaPUB1* 단백질을 코딩하는 본 발명의 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대의 대응되도록 얼라인(alignment)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 70% 이상의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80% 이상의 상동성, 보다 더욱더 바람직하게는 90% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트(alignment) 방법은 당업계에 공지되어있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981) Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 본 발명은 ClustalX 및 NJ(neighbor-joining) 알고리즘을 이용한다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST; Altschul, et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NBCI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>에서 접속가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합(operatively linked)되어 있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 저온 스트레스 내성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 명세서에서 용어 "작동적으로 결합(operatively linked)"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독(translation)을 조절하게 된다.
- [0021] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

- [0022] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.
- [0023] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, pL^λ 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, T7 프로모터, *tac* 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli* 가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터(pL^λ 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [0024] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSK349, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예: λgt · λ4B, λ-Charon, λ Δz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 벡터는 그로부터 발현되는 CaPUB1 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타민 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다. 상기 정제를 위한 추가적인 서열 때문에, 숙주에서 발현된 단백질은 친화성 크로마토그래피를 통하여 신속하고, 용이하게 정제된다.
- [0026] 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0027] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이트메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0028] 본 발명의 유전자는 식물에서 분리되었고, 저온 스트레스에 대한 식물체의 내성을 증진하는 작용을 할 수 있으므로, 식물에 대하여 가장 바람직한 유용성을 갖는다. 따라서, 본 발명의 벡터가 식물 세포에 적용되는 경우, 본 발명에 적합한 프로모터는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 칼리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 신타아제(nos) 프로모터, 피그워트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤벨리나 엘로우 모틀 바이러스 프로모터, 리블로오스-1,5-비스-포스페이트 카복실라아제 스몰 서브유닛(ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토졸 트리오스포스페이트 이소머라아제(TPI) 프로모터, 아라비둡시스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(APRT) 프로모터, 옥토파인 신타아제 프로모터, BCB(blue copper binding protein) 프로모터, SP6 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터 및 PM 프로모터를 포함한다. 가장 바람직하게는 본 발명에 적합한 프로모터는 옥수수의 유비퀴틴 프로모터(*pUbi*)이다.
- [0029] 본 발명에 적합한 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널서열은 아그로박테리움 튜메파시엔스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것(NOS 3' end)(Bevan, et al., *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385(1983)), 아그로박테리움 튜메파시엔스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 유전자의 3' 말단 부분, CaMV 35S 터미네이터 및 OCS 터미네이터(octopine synthase terminator)서열을 포함한다. 가장 바람직하게는 본 발명에 적합한 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-말단 폴리 A 시그널 서열은 노팔린합성효소(nopaline synthase) 유전자의 종결서열(Tnos)이다.
- [0030] 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자(예: 루시페라아제 및 -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제(예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 또는 제초제(예: 바스타)에 대한 내성 유전자(예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(*npt*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제(*hpt*), 등)를 포함한다.
- [0031] 본 발명의 식물발현용 재조합벡터의 바람직한 예로는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 바이너리 벡터를 들 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 "바이너리 벡터(binary vector)"는 Ti(tumor inducible) 플라스미드에서 이동에 필요한 부분인 LB(left border)와 RB(right border)를 가지는 플라스미드와 타겟 뉴클레오타이드를 옮기는데 필요한 유전

자를 가진 플라스미드를 두 개로 나누어 놓은 벡터를 말한다. 본 발명의 형질전환용 아그로박테리움은 본 발명의 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적합한 것이면 어느 것이라도 좋고, 특히 본 발명에서 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404가 바람직하다.

- [0033] 본 발명의 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 방법은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있으며, 예를 들면 입자 충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation), 형질감염법(transfection), 리튬아세테이트법(lithium acetate method), 열충격법(heat shock) 및 냉동-해빙법(freezethaw method) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 "식물체"는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 수 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미이다.
- [0035] 본 발명의 식물체는 특별히 제한되지 않으며, 상치, 배추, 감자 및 무를 포함하는 대부분의 쌍자엽 식물(dicotyledonous plant) 및 벼, 보리, 바나나 등의 단자엽 식물(monocotyledonous plant)을 포함한다. 특히 토마토와 같이 과피가 얇아 저온 스트레스에 따른 품질 저하가 급격히 나타나는 식용 채소 또는 과일 그리고 이 주된 상품으로 거래되는 식물 등에 적용할 경우 저온 스트레스에 대한 저항성을 높이는 데 효과적이다.
- [0036] 보다 구체적으로, 본 발명의 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 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, 사탕무, 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, 레드 클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0037] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 조성물에 의해 형질전환된 형질전환 식물세포를 제공한다.
- [0038] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 조성물에 의해 형질전환된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0039] 본 발명의 형질전환 식물세포 및 식물체는 상술한 본 발명의 다른 일 양태인 식물체의 저온 스트레스 내성 증진용 조성물을 이용하여 제조되기 때문에, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.
- [0040] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0041] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 사람 세포(예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 한편, 본 발명의 CaPUB1 유전자는 식물에서 유용성이 크기 때문에, 상기 형질전환체는 세포 뿐만 아니라, 식물 세포 또는 조직으로부터 유래된 캘러스를 포함한다.
- [0042] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecci, M.R., *Cell*, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-

9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

- [0043] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현되며, 이러한 경우에는 다량의 저온 스트레스 내성 증진을 위한 CaPUB1 단백질을 얻게 된다.
- [0044] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 저온 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다:
- [0045] (a) 식물 세포 또는 식물 조직을 서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 벡터로 형질전환하는 단계;
- [0046] (b) 형질전환된 식물세포 또는 식물조직을 선별하는 단계; 및
- [0047] (c) 상기 형질전환된 식물세포 또는 식물조직으로부터 식물체를 재분화시켜 형질전환 식물체를 수득하는 단계.
- [0048] 본 발명의 형질전환 식물체의 제조방법은 상술한 본 발명의 조성물을 이용하여 제조되기 때문에, 이 둘 사이에 공통되는 내용은 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.
- [0049] 본 발명의 형질전환 식물세포 및 형질전환 식물체를 제조하기 위하여 당업계에 일반적으로 공지된 방법(Methods of Enzymology, Vol. 153, (1987))에 따라 실시될 수 있다. 외래성 폴리뉴클레오티드를 플라즈미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물을 형질전환시킬 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며(Chilton, et al., *Cell*, 11:263:271(1977)), 직접 외래성 폴리뉴클레오티드를 식물 세포내로 도입시켜 식물을 형질전환시킬 수 있다(Lorz et al. *Mol. Genet.* 199:178-182;(1985)). 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.
- [0050] 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이 외래성 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)로 식물 세포나 종자 등을 감염시키는 방법이다(참조: 미국 등록특허 제5,004,863호, 제5,349,124호 및 제5,416,011호). 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물 세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 식물체는 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, 사과 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 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, 레드 클로버, 오차드그라스, 알파알파, 툴페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0052] 본 발명에서 이용되는 익스플랜트는 식물 세포 또는 식물 조직이며, 식물 조직을 이용하는 경우에는 캘러스를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0053] 본 발명의 방법에 있어서, 식물세포의 형질전환은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있으며, 이는 전기천공(Neumann, E., et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 입자 밤바드먼트(Yang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 및 아그로박테리움-매개된 형질전환(미국 등록특허 제 5,004,863호, 제5,349,124호 및 제5,416,011호)을 포함한다. 이 중에서, 아그로박테리움-매개된 형질전환이 가장 바람직하다.
- [0054] 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제(예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물 세포는 상술한 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (nptII) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0055] 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜드로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0056] 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다(미국 등록특허 제5,004,863호, 제5,349,124호 및 제5,416,011호).

- [0057] 본 발명에 있어서, 바람직한 형질전환 방법은 아그로박테리움 시스템을 이용하여 실시되며, 보다 바람직하게는 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)-바이너리 벡터 시스템을 이용하여 실시된다.
- [0058] 아그로박테리움 시스템을 이용하는 방법에 있어서, 구체적인 일 실시예는 다음의 단계를 포함한다: (a') 식물 세포의 지놈 DNA에 삽입될 수 있고 다음의 서열을 갖는 벡터가 내재되어 있는 아그로박테리움 튜메파시엔스로 식물체의 익스플랜트를 감염시키는 단계: (i) 본 발명의 OsDREB1D 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합되며 식물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; (iii) 식물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위; (b') 상기 감염된 익스플랜트를 재분화 배지에서 재분화하여 형질전환 식물체를 얻는 단계.
- [0059] 식물 세포의 형질전환은 Ti 플라스미드를 포함하는 아그로박테리움 튜메파시엔스를 가지고 실시된다(Depicker, A., et al., *Plant cell transformation by Agrobacterium plasmids*. In *Genetic Engineering of Plants*, Plenum Press, New York(1983)).
- [0060] 보다 바람직하게는, pBin19, pRD400, pRD320, pGA1611 및 pGA1991과 같은 바이너리 벡터 시스템이 이용된다 (An, G., et al., *Binary vectors*" In *Plant Gene Res. Manual*, Martinus Nijhoff Publisher, New York(1986); An et al., 1988; 및 Lee et al., 1999). 본 발명에 적합한 바이너리 벡터는 (i) 식물에서 작동하는 프로모터; (ii) 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 구조 유전자; 및 (iii) 폴리아데닐화 시그널 서열을 포함한다. 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자(예: 루시페라아제 및 글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 바이너리 벡터에 이용되는 프로모터의 예는 옥수수 유비퀴틴 프로모터, CaMV 35S 프로모터, 1 프로모터, 2 프로모터 및 노팔린 신타아제(nos) 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 아그로박테리움 튜메파시엔스에 의한 익스플랜트의 감염은 당업계에 공지된 방법을 포함한다. 가장 바람직하게는, 상기 감염 과정은 아그로박테리움 튜메파시엔스의 배양물에 익스플랜트를 함침시켜 공동배양하는 과정을 포함한다. 이를 통해 아그로박테리움 튜메파시엔스는 식물내로 감염된다.
- [0062] 아그로박테리움 튜메파시엔스에 의해 형질전환된 익스플랜트는 재분화 배지에서 재분화되며, 이는 최종적으로 형질전환 식물체를 형성한다.
- [0063] 본 발명에 따라 형질전환된 식물은 당업계에 공지된 방법에 의해 형질전환 여부가 확인된다. 예를 들어, 형질전환된 식물의 조직으로부터 얻은 DNA 시료를 이용하여, PCR을 실시하면 형질전환 식물의 지놈에 삽입된 외래 유전자가 규명될 수 있다. 택일적으로, 노던 또는 서던 블롯팅을 실시하여 형질전환 여부를 확인할 수 있다 (Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)).
- [0064] 본 발명의 CaPUB1 유전자 및 단백질은 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성(저항성)을 증진하는 데 매우 유효하다.

발명의 효과

- [0065] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0066] (a) 본 발명은 식물체의 저온 스트레스 내성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0067] (b) 본 발명은 상술한 조성물에 의해 형질전환된 형질전환식물세포를 제공한다.
- [0068] (c) 본 발명은 상술한 조성물에 의해 형질전환된 형질전환식물체를 제공한다.
- [0069] (d) 본 발명은 저온 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0070] (e) 본 발명의 조성물 및/또는 방법을 이용하면 효과적으로 식물체의 저온 스트레스 내성을 증진시킬 수 있다.
- [0071] (f) 본 발명의 조성물 및/또는 방법을 이용하면 저온 스트레스 내성이 증진된 식물체를 제조하여, 식물의 생산성을 효과적으로 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0072] 도 1a는 *CaPUB1* 유전자를 운반하기 위해 해당 유전자를 삽입한 바이너리 벡터 pGA2897의 보더(border) 부분의 모식도를 나타낸다.

도 1b는 형질전환 T0 식물체에서 RNA를 추출하여 역전사 반응을 통해 cDNA를 합성한 후, *CaPUB1*을 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 진행함으로써 *CaPUB1*의 발현을 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 *CaPUB1*을 도입한 형질전환 벼 식물체의 독립 라인 선별을 위해 지노믹 서던 블랏 분석을 수행한 결과를 나타낸다.

도 3a는 *CaPUB1*이 저온 스트레스에 대한 저항성을 변화시키는지 확인하기 위해 저온 스트레스에 대한 저항성을 관찰한 결과를 나타낸다. 야생종 식물체를 대조군으로 사용하였고, *CaPUB1* 과다 발현 T3 식물체를 실험군으로 사용하였다.

도 3b는 야생종 식물체와 *CaPUB1* 과다 발현 T3 식물체에 저온 스트레스를 주고 다시 회복하는 실험을 반복하여, 각각의 식물체의 생존율에 대해 통계 처리한 결과를 보여주는 그래프를 나타낸다.

도 4는 *CaPUB1* 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073] 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.

[0074] **실시예**

[0075] **실시예 1: *Ubi:CaPUB1* 과다발현 형질전환 벼 식물체 제작**

[0076] *CaPUB1*을 과다발현하기 위해 *CaPUB1*의 cDNA를 pENTR SD-TOPO 벡터(Invitrogen)에 삽입한 후, LR 크로나아제 효소(Invitrogen)를 이용하여 운반벡터 pGA2897에 치환하였다. 이를 벼 식물체에 발현시키기 위해 플라스미드를 아그로박테리움 튜메파시엔스 LBA4404에 전기천공법으로 넣어 LBA4404를 형질 전환하였다. *CaPUB1* 유전자를 운반하기 위해 해당 유전자를 삽입한 바이너리 벡터 pGA2897의 경계(border) 부분의 모식도를 도 1에 나타내었다. 도 1에서, 좌측 보더(Left border, LB)와 우측 보더(Right border, RB) 사이에 위치하는 DNA 서열이 아그로박테리아 LBA4404에 의해 야생종 식물체 게놈에 삽입된다. *CaPUB1* 유전자는 유비퀴틴 프로모터(Ubiquitin promoter)에 의해서 항상 발현되도록 조절 받는다.

[0077] 야생종인 동진벼의 종자를 40% 락스(유한-크로락스)에 30분간 살균 처리한 후 멸균한 물로 5회 이상 세척한 후, 1일 동안 저온 처리하였다. 처리된 종자를 3% 수크로스, CHU 배지(4 g/L, Duchedfa Biochem), 카사미노산(casamino acid)(300 mg/L, Duchedfa Biochem), L-프롤린(2.9 g/L, Duchefa Biochem), 2,4-D(2 mg/L, sigma aldrich), 0.002% 겔라이트로 구성된 N6D 배지에 심고 28°C에서 7일 이상 배양하여 배아로부터 캘러스(callus)를 유도하였다. 이 캘러스의 형질전환은 앞서 형질 전환된 아그로박테리움 튜메파시엔스 LBA4404와 4일간 배양하여 수세하고, 히그로마이신 B 항생제를 이용하여 새롭게 자라나는 캘러스를 선별하였다. 선별된 캘러스는 옥신과 사이토키닌이 포함된 재분화 배지에 배양하여(Sohn et al., Korean J. Breed. 38(3) : 173~179 (2006)) T0 식물체를 획득하였다. 제작한 형질 전환 식물체는 흙으로 옮겨 온실에서 키웠다.

[0078] **실시예 2: *Ubi:CaPUB1* 과다발현 형질전환 벼 식물체에서의 *CaPUB1* 유전자 발현 확인**

[0079] 2-1. Total RNA 추출 방법

[0080] 영양생산 단계(vegetative stage)의 야생종과 *CaPUB1* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 잎을 액체질소를 이용해 얼린 후 곱게 갈아서 가루로 만들고 2 ml/g 의 RNA 추출 완충액과 섞어준다. 이어서 200 μl의 클로로포름을 넣어서 다시 섞어준 후, 4°C에서 13000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층의 용액을 동량의 침전 완충액과 섞어준다. 다시 4°C에서 13000 rpm으로 원심 분리하여 RNA를 침전하는 방법으로 총 RNA(total RNA)를 추출하였다.

[0081] 2-2. 역전사 효소(RT)-PCR

[0082] 획득한 RNA를 정량하고, 각 샘플당 2 µg씩의 동량의 총 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사 효소반응을 진행하였다. 올리고 dT₍₁₈₎ 프라이머와 TOPscript 역전사 효소(enzymomics)를 이용하여 총 RNA로부터 단일가닥 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 하여 *CaPUB1*을 특이적으로 증폭시키는 PCR을 진행하였다. 10X Taq 폴리머라아제 완충용액(Intron) 2 µl, dNTP 혼합액(각 1.25 mM) 2 µl, *CaPUB1*에 상보적인 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 각각 10 pmole 씩, 그리고 1 유닛의 Taq DNA 폴리머라아제(intron)를 넣어 반응물의 부피를 20 µl로 만들었다. BIORAD C-1000 DNA 써멀 사이클러로 PCR을 수행하였다. 95°C에서 3분간 변성시킨 후, 95°C에서 30초, 52°C에서 30초, 72°C에서 60초를 반복하는 것을 25회 수행하였고, 마지막 단계에서 72°C에서 3분간 추가로 중합반응을 수행한 반응물을 아가로오스 겔에 걸어 전기 영동으로 전개하여 확인하였다. 본 실험에 사용된 프라이머는 아래의 표 1에 나타내었다.

[0083] 실시예 3: *Ubi:CaPUB1* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 독립라인 선별

[0084] *CaPUB1*을 과다 발현하는 T0 형질전환 벼 식물체와 야생종의 잎을 액체질소를 이용해 얼려서 곱게 간 후, 0.8 ml의 DNA 추출 완충액(CTAB 버퍼; CTAB 2 g, PVP-40 2 g, 아스코르브산 0.08 g, 5 M NaCl 28.4 ml, 0.5 M EDTA(pH 8.0) 4 ml, 1 M Tris-Cl(pH 8.0)/100 ml)을 넣고 섞어주었다. 65°C에서 10분 동안 배양(incubation)하고 클로로포름을 0.8 ml 넣어 섞어준 후, 4°C에서 13000 rpm으로 원심 분리하여 상층의 용액을 동량의 침전 완충액과 섞어주었다. 다시 4°C에서 13000 rpm으로 원심 분리하여 침전하는 방법으로 지노믹 DNA를 추출하였다. 분리한 지노믹 DNA를 EcoRI 제한효소로 12시간 동안 충분히 잘랐다. 이를 0.8% 아가로오스 겔에 걸어 전기 영동으로 전개한 후 모세관 수송(capillary transfer) 방법을 이용해 나일론 멤브레인(membrane)에 옮긴다. 이 멤브레인에 *hph*에 상보적이며 32^p로 표지된 프로브를 사용하여 16시간 동안 혼성화(hybridization)를 진행하고, 2X SSPE 완충액으로 20분씩 2번, 1X SSPE 완충액으로 10분씩 2번 씻어준다. 마지막으로 멤브레인을 IP판에 감광하여 독립 라인을 선별하였다. 프로브합성에 사용한 프라이머는 표1에 나타내었다.

표 1

프라이머	서열
RT-PCR	
<i>OsUBQ10</i> RT FW	5'-ATGCAGATCTTTGTGAAGAC-3'
<i>OsUBQ10</i> RT RV	5'-TTACTGACCACCACGGAGGC-3'
<i>CaPUB1</i> RT FW	5'-CAATCCCTTACGAGCATAGAG-3'
<i>CaPUB1</i> RT RV	5'-TTGGTAGTGTGGATGCTTCG-3'
genomic Southern blot assay probe 합성	
<i>Hph</i> probe FW	5'-GAGCCTGACCTATTGCATCTC-3'
<i>Hph</i> probe RV	5'-AGTACTTCTACACAGCCATCGG-3'

[0085]

[0086] 실시예 4: *Ubi:CaPUB1* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 저항성 표현형 분석

[0087] *CaPUB1*을 벼에 도입하였을 때 저온 스트레스에 대한 저항성이 변화되는지 확인하기 위해 야생종 식물체와 *CaPUB1* 과다 발현 T3 식물체의 종자를 40% 락스(유한-크로락스)에 30분간 소독한 후, 4°C에 1일 동안 저온 처리하였다. 처리한 종자를 각각 0.7% 파이토아가(phytoagar)가 포함된 표MS 배지(MS medium 2.2 g/L(duchefa), 3% 수크로스)에 심어서 28°C 챔버에서 발아시키고, 2일이 지난 후 *CaPUB1* 과다발현 식물체는 히그로마이신 B 항생제(Duchefa)가 40 mg/L 농도로 포함된 표MS 배지(비타민들을 함유하는 MS 배지 2.2 g/L(Duchefa), 3% 수크로스

스, 파이토아가 7 g/1 L)로 옮긴다. 발아일로부터 7일이 지나면 하나의 화분에 야생종과 *CaPUB1* 과다 발현 식물체를 구분하여 심어주고 28℃ 배양실에서 4주 동안 성장시켰다(16시간 광 조건/8시간 암 조건). 위 화분을 4℃ 챔버에 넣어 저온 환경스트레스에 6일간 노출시킨 후, 다시 28℃ 배양실로 옮겨주었다. 생존율은 생장을 재개하거나 회복 시점으로부터 10일 이상이 지났을 때에도 줄기 부분에 세포 사멸 등이 진행되지 않아 초록색을 띠는 것을 기준으로 분석하였다. 야생종 식물체의 경우 0%에 가까운 생존율을 보였으나 *CaPUB1* 과다발현 식물체(#2, 4)의 경우 70%에 달하는 생존율을 나타내었다. 이러한 결과를 통해 *CaPUB1*을 벼에 도입하였을 때 저온 스트레스에 대한 저항성이 월등히 향상되는 것을 확인하였다.

[0088] **결과**

[0089] **1. 아그로박테리아를 이용하여 *CaPUB1* 유전자를 벼에 도입하는 조직 배양 실험**

[0090] 아그로박테리아를 이용해 *CaPUB1* 유전자를 벼에 도입하는 조직 배양 실험을 수행하였다. 야생종 벼의 캘러스를 아그로박테리아가 감염시키도록 3일간 암 조건에서 배양한 이후, 히그로마이신 B가 함유된 배지에서 배양하여 보더(border) 시퀀스가 삽입된 캘러스를 선별하였다. 선별된 캘러스로부터 재분화 과정을 거쳐 *CaPUB1*을 과다 발현하는 식물체를 제작하였다. 획득한 형질전환 T0 식물체에서 RNA를 추출하여 역전사 반응을 통해 cDNA를 합성한 후, *CaPUB1*을 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 진행함으로써 *CaPUB1*의 발현을 확인하였다. 야생종에서는 *CaPUB1*이 발현되지 않고, 형질전환 식물체에서 *CaPUB1*이 mRNA 수준에서 발현되고 있음을 확인하였다(참조: 도 1b).

[0091] **2. *CaPUB1*을 도입한 형질전환 벼 식물체의 독립 라인 선별**

[0092] *CaPUB1*을 도입한 형질전환 벼 식물체의 독립 라인 선별을 위해 지노믹 서던 블랏 분석을 수행하였다. 야생종과 *CaPUB1* 과다발현 식물체의 잎에서 지노믹 DNA를 추출한 후, EcoRI 제한효소로 충분히 자른다. 처리한 지노믹 DNA를 아가로오스 겔에 걸어 전기 영동으로 전개한 후 나일론 멤브레인에 옮겨서 hph에 상보적이며 32^P로 표지된 프로브를 사용하여 혼성화를 진행함으로써 독립 라인을 선별하였다(참조: 도 2).

[0093] **3. 저온 스트레스에 대한 저항성 관찰**

[0094] *CaPUB1*이 저온 스트레스에 대한 저항성을 변화시키는지 확인하기 위해 저온 스트레스에 대한 저항성을 관찰하였다. 야생종 식물체와 *CaPUB1* 과다 발현 T3 식물체를 28℃ 챔버에서 발아시켜 7일 키운 후, 하나의 화분에 야생종 식물체와 *CaPUB1* 과다 발현 식물체를 옮겨 심는다. 28℃에서 4주 동안 추가로 키운 다음, 4℃ 저온 챔버에 넣어 저온 스트레스를 6일간 준 후, 다시 28℃ 배양실로 옮겨 생장이 회복되는지 확인하였다. 야생종 식물체의 경우 저온 스트레스로부터 회복한 지 한 달이 지난 후에도 거의 모든 개체가 살지 못하였다. 반면, *CaPUB1* 과다발현 식물체(#2, 4)의 경우 야생종에 비해 훨씬 많은 개체가 생존하였으며, 저온 스트레스로 인해 정지되었던 생장이 회복 이후에 다시 진행되는 표현형을 나타내었다(참조: 도 3a).

[0095] 야생종 식물체와 *CaPUB1* 과다 발현 T3 식물체에 저온 스트레스를 주고 다시 회복하는 실험을 반복하여 각각의 식물체의 생존율을 통계 처리를 하여 생존율 그래프로 나타내었다. #2의 경우 3번의 실험을 반복 수행하였고(참조: 표 2), #4의 경우 4번의 실험을 반복 수행하였다(참조: 표 3). *CaPUB1* 과다 발현 형질전환 식물체가 저온 스트레스에 저항성이 있음을 확인할 수 있었다(참조: 도 3b).

표 2

반복 실험	야생형(Wild-type)			CaPUB1 #2		
	실험에 사용된 개체 수	생존한 식물체 개수	생존율 (%)	실험에 사용된 개체 수	생존한 식물체 개수	생존율 (%)
1	8	0	0	8	4	50
2	9	0	0	9	0	100
3	6	0	0	6	3	50

[0096]

표 3

반복 실험	야생형(Wild-type)			CaPUB1 #4		
	실험에 사용된 개체 수	생존한 식물체 개수	생존율 (%)	실험에 사용된 개체 수	생존한 식물체 개수	생존율 (%)
1	4	0	0	4	3	75
2	7	1	14.2	7	4	57.1
3	8	0	0	8	7	87.5
4	9	0	0	9	7	77.7

[0097]

[0098]

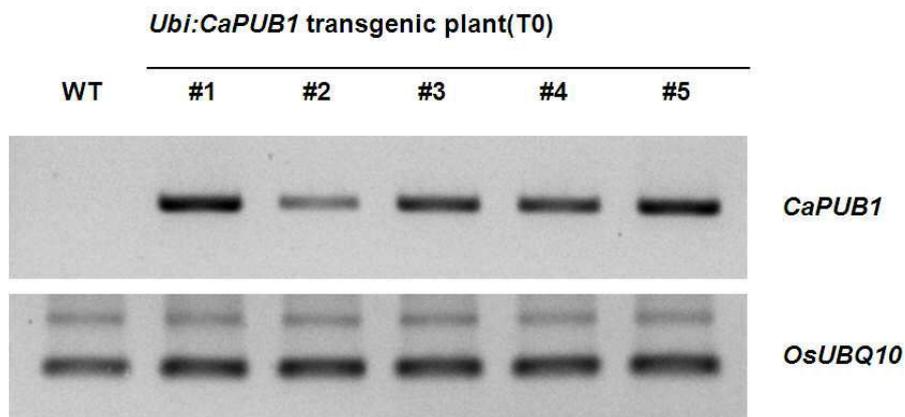
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

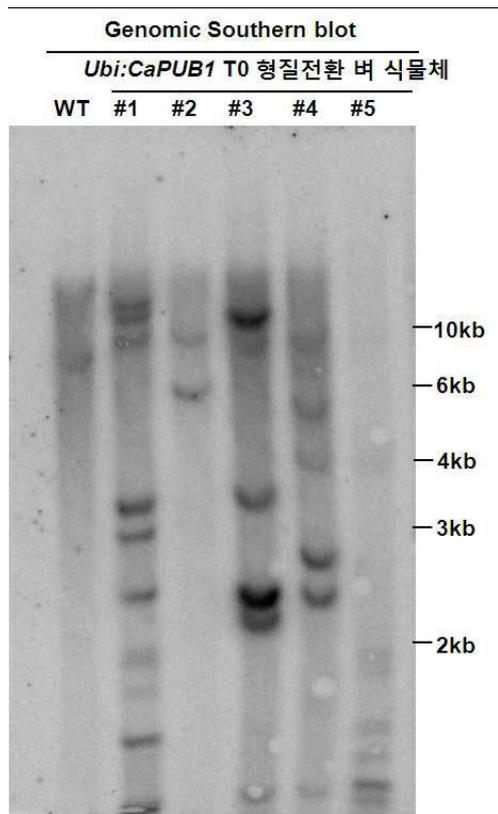
도면1a



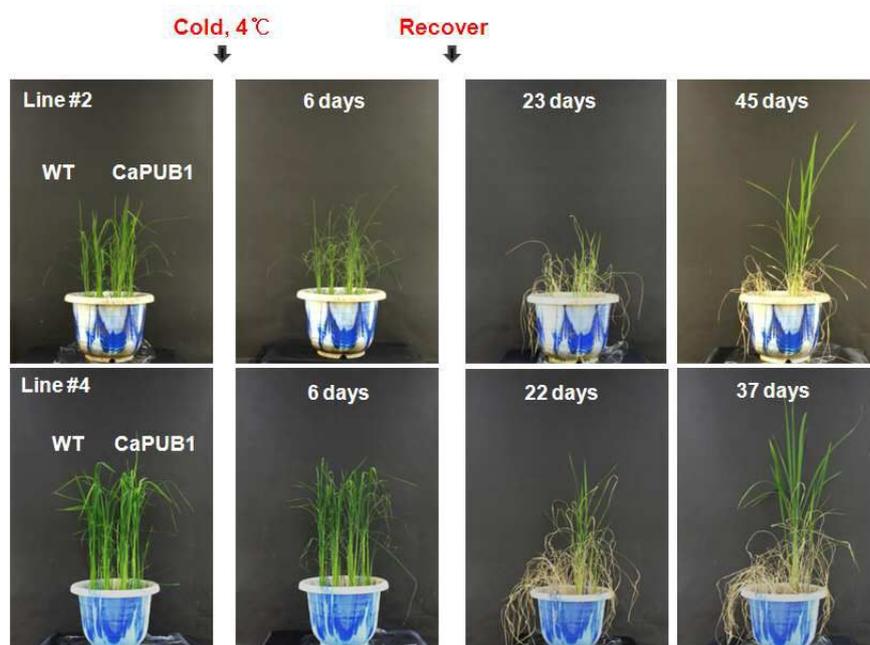
도면1b



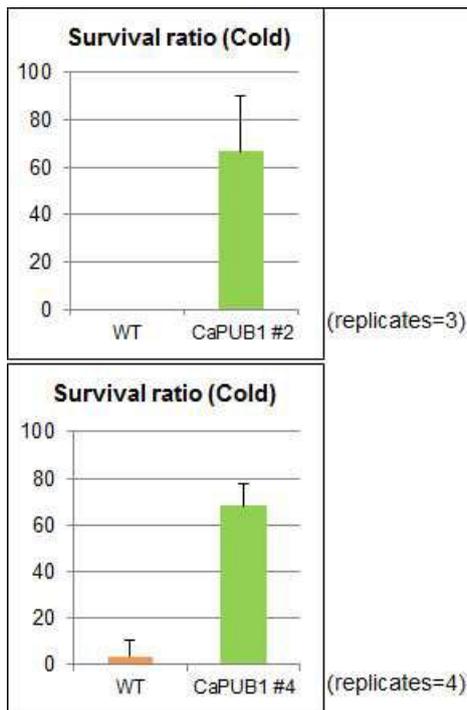
도면2



도면3a



도면3b



도면4



```

1  gggatccggc acgaggcttg ttttagtca tatttgcaat ctttcttata agattctcct
61  ccttcgaata atcttgaaaa attttcaaag tacaaatgga agaaattcaa gtaccacctt
121 atttctctg tccgatttca ctggagatga tgaaagatcc agtcacgac tcgactggaa
181 taacatacga tcgagagaac atcgagagat ggatattctc agctaagaac aatacgtgtc
241 cggttacgaa gcaatccctt acgagcatag agttgacccc taatgtcact ctacgacgat
301 tcatccaate gtgggttact ctaaatgctg cccatggcat cgagaggttc cctacaccga
361 agcctccggg cagcaaagct caaatcttaa agctcatgaa agaagcgaaa tcgcgcgaaa
421 tgcaaatgaa atcactcaac acacttagat ccatagcttc tgtgaacga gctacaagc
481 gttgcatgga gtctgcgggc gcagcggagt tcttagcctc tgttggtatt gattcgagtg
541 atgtgttggg tgaagagggg tcatgagta ctaaagatga agcattaagc atcctctacc
601 aactcaagtt atcagaagat ggattgaggt cactcatcac gagtggaaat ggtgaattca
661 tcgagtcact gacacgcgtc atgcagcgtg ggagctatga gtcaagggct tacgcggtga
721 tgctgatgaa agacatgttc gaagcatcca cactaccaac tctatttctg agcttgaaga
781 aagagttctt cgctcaagtg gttcagatct tgagggatga gatctctcaa aaggccacca
841 aagcgtcatt gcaagtgtca gcgcacgcgt gtccatttgg gaggaacaga gtgaaagcag
901 ctgaggcagg agccgttagg gttttgttg accttctgct cgattcatcc gagaaaagga
961 cctgcgaact gatgctaate ttgctggatc aaattgtca gagcgcagaa gggagagccg
1021 agctgtttaa tcatccggga gggttagcca tcgtctcga gaaaatactt agggtttca
1081 aagttagggg cgaaggggca atcaagatat tgcattcgat atcaaagttt tcatcaaac
1141 aaagtgttgt tcaagagatg ttgagtttgg gtgttgggc aaagcttgt ttggtactc
1201 aagttgattg tgaagtaaa gctaaggata gagctagaga tatttcaaaa attcattgcaa
1261 aggcattggg gaattctctt tgtataccta tgaattattt atcttcatat ccatttttag
1321 aaaataggac caaaagagca aacaattgta atgatttgat agaatatgga aacacaaaaa
1381 agaatacagt aatgatttg gtac
    
```

서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Compositions for Enhancing Cold Stress Tolerance and Transgenic

Plants Using the Same

<130> PN140524
 <160> 2
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Capsicum annuum cv. Pukang
 <400> 1

Met Glu Glu Ile Gln Val Pro Pro Tyr Phe Leu Cys Pro Ile Ser Leu
 1 5 10 15
 Glu Met Met Lys Asp Pro Val Thr Ile Ser Thr Gly Ile Thr Tyr Asp
 20 25 30
 Arg Glu Asn Ile Glu Arg Trp Ile Phe Ser Ala Lys Asn Asn Thr Cys
 35 40 45
 Pro Val Thr Lys Gln Ser Leu Thr Ser Ile Glu Leu Thr Pro Asn Val
 50 55 60
 Thr Leu Arg Arg Phe Ile Gln Ser Trp Cys Thr Leu Asn Ala Ser His
 65 70 75 80
 Gly Ile Glu Arg Phe Pro Thr Pro Lys Pro Pro Val Ser Lys Ala Gln
 85 90 95

Ile Leu Lys Leu Met Lys Glu Ala Lys Ser Arg Glu Met Gln Met Lys
 100 105 110
 Ser Leu Asn Thr Leu Arg Ser Ile Ala Ser Val Asn Asp Ala Asn Lys
 115 120 125
 Arg Cys Met Glu Ser Ala Gly Ala Ala Glu Phe Leu Ala Ser Val Val
 130 135 140
 Ile Asp Ser Ser Asp Val Leu Gly Glu Glu Gly Phe Met Ser Thr Lys
 145 150 155 160
 Asp Glu Ala Leu Ser Ile Leu Tyr Gln Leu Lys Leu Ser Glu Asp Gly
 165 170 175
 Leu Arg Ser Leu Ile Thr Ser Gly Asn Gly Glu Phe Ile Glu Ser Leu

<213> Capsicum annuum cv. Pukang

<400> 2

gggatccggc acgaggcttg tttttagtca tttttgcaat ctttcttata agattctcct	60
ccttcgaata atcttgaaaa attttcaaag tacaaatgga agaaattcaa gtaccacctt	120
atctcctctg tccgatttca ctggagatga tgaagatcc agtcacgatc tcgactggaa	180
taacatacga tcgagagaac atcgagagat ggatattctc agctaagaac aatacgtgtc	240
cggttacgaa gcaatccctt acgagcatag agttgacccc taatgtcact ctacgacgat	300
tcaccaatc gtggtgtact ctcaatgcgt cccatggcat cgagaggttc cctacaccga	360
agcctccggt cagcaaagct caaatcttaa agctcatgaa agaagcgaaa tcgcgcgaaa	420
tgcaaatgaa atcactcaac acacttagat ccatagcttc tgtgaacgat gctaacaagc	480
gttgcattga gtctcggggc gcagcggagt tcttagcctc tgttgtgatt gattcgagtg	540
atgtgttggg tgaagagggt ttcatgagta ctaaagatga agcattaagc atcctctacc	600
aactcaagtt atcagaagat ggattgaggt cactcatcac gagggaaat ggtgaattca	660
tcgagtcact gacacgcgtc atgcagcgtg ggagctatga gtaagggtc tacgcggtga	720
tgctgatgaa agacatgttc gaagcatcca cactaccaac tctatcttcg agcttgaaga	780
aagagtctt cgtcaagtg gttcgagtct tgaggatga gatctctcaa aaggccacca	840
aagcgtcatt gcaagtgcta gcgcacgcgt gtccatttgg gaggaacaga gtgaaagcag	900
ctgaggcagg agccgttagg gttttggtgg accttctgct cgattcatcc gagaaaagga	960
cctgcgaact gatgctaac ttgctggatc aaatttgtca gagcgcagaa gggagagccg	1020
agctgttgaa tcacccggga gggttagcca tcgtctcgaa gaaaatactt agggtttcga	1080
aagtagggag cgaagggca atcaagatat tgcattcgat atcaaagttt tcatcaacac	1140
aaagtgttgt tcaagagatg ttgagtttgg gtgttgggc aaagctttgt ttggtacttc	1200
aagttgattg tggaagtaaa gctaaggata gagctagaga tattctcaa atctatgcaa	1260
aggcatggag gaattctcct tgtataccta tgaatttatt atcttcatat ccattttagg	1320
aaaataggac caaaagagca aacaattgta atgatttgat agaaatagga aacacaaaaa	1380
agaaatcagt aaatgattg tgtac	1405