



등록특허 10-2126347



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월24일

(11) 등록번호 10-2126347

(24) 등록일자 2020년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/8273 (2013.01)
C12N 9/93 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0074873

(22) 출원일자 2018년06월28일

심사청구일자 2018년06월28일

(65) 공개번호 10-2020-0001845

(43) 공개일자 2020년01월07일

(56) 선행기술조사문헌

W02008142036 A2*

*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)

안민용

경기도 군포시 광정로 119, 726동 403호 (산본동, 솔거(대림)아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 11 항

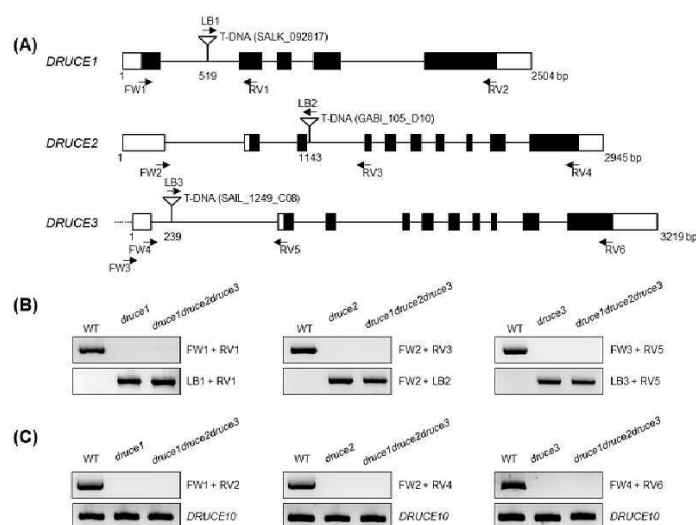
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 식물의 건조 스트레스 내성과 관련된 신규 유전자, 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 식물체 내 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 또는 *AtDRUCE3* 유전자의 발현을 억제시키는 단계;를 포함하는 건조 저항성 증진 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12Y 603/02019 (2013.01)

(72) 발명자

오태린

경기도 부천시 소사로78번길 81, 102동 101호 (소사본동, 두산,삼성아파트)

서동혜

경기도 용인시 기흥구 신갈로 102, 103동 1203호 (신갈동, 원대마을 신갈한신아파트)

김중흠

서울특별시 서대문구 연세로4길 66-3, 401호 (창천동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711067787

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 메커니즘 연구
연구과제명 아기장대의 환경스트레스에 의한 단백질 이상 스트레스(proteotoxics stress) 대응 조절

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

AtDRUCE1(Drought-Related Ubiquitin-Conjugating Enzyme1),

AtDRUCE2(Drought-Related Ubiquitin-Conjugating Enzyme2) 및

AtDRUCE3(Drought-Related Ubiquitin-Conjugating Enzyme3)의 발현을 억제하는 식물체의 건조 저항성 증진용 조성물로서,

상기 AtDRUCE1는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것이며,

상기 AtDRUCE2는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것이며,

상기 AtDRUCE3는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것인 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 AtDRUCE1, AtDRUCE2 및 AtDRUCE3의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 핵산 분자는 AtDRUCE1, AtDRUCE2 및 AtDRUCE3을 암호화하는 핵산 서열 또는 이와 상보적인 핵산 서열의 발현을 억제하는 분자로서,

상기 AtDRUCE1을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 4로 이루어지고,

상기 AtDRUCE2를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 5로 이루어지며,

상기 AtDRUCE3을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 6으로 이루어진 것인 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 핵산 분자는 T-DNA, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고핵산인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 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 특용 작물류; 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 사료작물류;로 이루어진 군에서 선택된 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

AtDRUCE1, AtDRUCE2 및 AtDRUCE3을 암호화하는 핵산 서열 또는 이와 상보적인 핵산 서열에 결합하여 발현을 억제하는 핵산 서열; 및 이와 작동 가능하게 연결된(operably linked) 프로모터;를 포함하는 재조합 벡터를 포함하는 조성물로서,

상기 AtDRUCE1을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 4로 이루어지고,

상기 AtDRUCE2를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 5로 이루어지며,

상기 AtDRUCE3을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 6으로 이루어진 것인 조성물.

청구항 8

제1항 및 제3항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 건조 저항성이 증진된 식물체.

청구항 9

AtDRUCE1, AtDRUCE2, 및 AtDRUCE3의 발현이 억제된 건조 저항성이 증진된 식물체로서,

상기 AtDRUCE1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것이며,

상기 AtDRUCE2는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것이며,

상기 AtDRUCE3은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것인 식물체.

청구항 10

삭제

청구항 11

게놈 DNA에 존재하는 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2* 및 *AtDRUCE3* 유전자의 발현을 억제시키는 단계; 를 포함하는 식물체의 건조 저항성 증진 방법으로서,

상기 *AtDRUCE1* 유전자는 서열번호 4의 핵산 서열로 이루어진 것이며,

상기 *AtDRUCE2* 유전자는 서열번호 5의 핵산 서열로 이루어진 것이며,

상기 *AtDRUCE3* 유전자는 서열번호 6의 핵산 서열로 이루어진 것인 식물체의 건조 저항성 증진 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 유전자의 발현을 억제시키는 단계는 (a) 상기 유전자를 구성하는 하나 또는 그 이상의 핵산 서열을 다른 서열로 치환시키거나 결실시키는 단계; (b) 상기 유전자를 구성하는 핵산 서열에 다른 서열을 삽입시키는 단계; 또는 (c) 상기 유전자를 구성하는 하나 또는 그 이상의 핵산 서열을 이동(frame shift)시키는 단계;를 포함하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 유전자의 발현을 억제시키는 단계는 (d) 상기 유전자로부터 전사된 mRNA를 불활성화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물의 건조 스트레스 내성과 관련된 신규 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 고등식물은 그들의 고착형 생활 특성상 일생 동안 다양한 환경 요인들, 가뭄, 고염, 냉해, 중금속과 같은 다양한 환경적 스트레스에 직면한다.
- [0003] 환경적 스트레스는 작물의 생장에 큰 영향을 끼치며, 특히 물의 부족으로 생기는 건조 스트레스는 작물생산 감소의 주요 요인으로 손꼽힌다(Boyer, 1982; Ahuja et al., 2010).
- [0004] 산업화로 인한 온실 가스 증가와 산림 파괴로 인해 지구의 평균기온이 상승하면서 이상 기후 현상이 심화되고 있다.
- [0005] 이상 기후로 인해 작물들의 생산량이 감소하고 있으며, 이는 곧 식량문제로 이어질 가능성이 있다. 지구 온난화로 인한 이상 기후 현상 중에서도 물 부족은 작물의 생산량과 직결될 수 있다.
- [0006] 최근 분자생물학 및 유전체학 연구를 통해 환경 스트레스에 관련된 다양한 유전자 군들이 발견 및 분리되고 있다. 또한 스트레스로 인한 식물체의 유전 및 세포학적 반응들도 많이 알려지고 있다.
- [0007] 그러나 고등식물에 있어서 스트레스에 대한 내성이나 민감성에 관여하는 스트레스 관련 유전자들의 생물학적 기능에 대한 지식은 여전히 미흡하며, 작물의 생산성을 증가시키기 위해 스트레스 반응 유전자들에 대한 연구는 매우 중요하다.
- [0008] 이와 관련하여 세계적인 기후 변화로 인한 물자원의 수급 불균형에 대비하기 위해 식물의 단기적 또는 장기적인 물 부족에 대한 반응 연구와 스트레스 저항성 식물체 연구가 활발히 진행되고 있으며 ubiquitination-26S proteasome 시스템을 통한 단백질 턴-오버 과정이 가뭄 스트레스에 중요하게 작용하는 것으로 알려지고 있다.
- [0009] 유비퀴틴화(Ubiquitination) 과정은 각각 E1 ubiquitin-activating enzyme, E2 ubiquitin conjugase, E3 Ubiquitin ligase라 분류된 세 가지의 효소에 의한 연속적인 반응으로 이루어진다.
- [0010] 현재 다양한 E3 ubiquitin ligase에 의한 환경스트레스 반응 기작이 밝혀졌으나 상위 단계인 E2 ubiquitin conjugase의 환경스트레스 반응에 대한 연구는 미흡한 실정이다.
- [0011] 본 발명자들은 식물연구의 모델 기본 식물체인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 새로운 스트레스 관련 유전자를 발굴하고, 형질전환 식물체 제작을 통해 유전자 기능을 최초로 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 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

- [0013] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 건조 스트레스와 관련된 유전자의 기능을 밝히고, 건조 스트레스에 대한 내성을 증진하는 방법 및 이로 인해 내성이 증진된 식물체를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 측면에 따르면, AtDRUCE1, AtDRUCE2, 및 AtDRUCE3으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 발현을 억제하는 식물체의 건조 저항성 증진용 조성물이 제공된다.
- [0015] 일 실시예에 있어서, 상기 AtDRUCE1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 AtDRUCE2는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 AtDRUCE3은 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 상기 AtDRUCE1, AtDRUCE2, 및 AtDRUCE3으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [0017] 일 실시예에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 4 내지 6으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 핵산 서열 또는 이와 상보적인 핵산 서열의 발현을 억제할 수 있다.
- [0018] 일 실시예에 있어서, 상기 핵산 분자는 T-DNA, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고핵산일 수 있다.

- [0019] 일 실시예에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 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 특용 작물류; 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 사료작물류;로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0020] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열 또는 이와 상보적인 핵산 서열에 결합하여 발현을 억제하는 핵산 서열; 및 이와 작동 가능하게 연결된(operably linked) 프로모터;를 포함하는 재조합 벡터를 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물로 형질전환된 건조 저항성이 증진된 식물체가 제공된다.
- [0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, AtDRUCE1, AtDRUCE2, 및 AtDRUCE3으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 발현이 억제된 건조 저항성이 증진된 식물체가 제공된다.
- [0023] 일 실시예에 있어서, 상기 식물체는 변이된 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 또는 *AtDRUCE3* 유전자를 발현할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 게놈 DNA에 존재하는 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 또는 *AtDRUCE3* 유전자의 발현을 억제시키는 단계;를 포함하는 식물체의 건조 저항성 증진 방법이 제공된다.
- [0025] 일 실시예에 있어서, 상기 유전자의 발현을 억제시키는 단계는 (a) 상기 유전자를 구성하는 하나 또는 그 이상의 핵산 서열을 다른 서열로 치환시키거나 결실시키는 단계; (b) 상기 유전자를 구성하는 핵산 서열에 다른 서열을 삽입시키는 단계; 또는 (c) 상기 유전자를 구성하는 하나 또는 그 이상의 핵산 서열을 이동(frame shift)시키는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0026] 일 실시예에 있어서, 상기 유전자의 발현을 억제시키는 단계는 (d) 상기 유전자를 구성하는 억제하는 단계; 또는 (e) 상기 유전자로부터 전사된 mRNA를 불활성화시키는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명의 일 측면에 따르면, 건조 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 유전자 발현을 저하시킴으로써 이상 기후 후에 따른 작물의 생존율을 증진시키고, 작물 생산량 증가에 기여할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정된 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 AtDRUCE 단백질의 구조 및 서열을 분석한 것이다.
- 도 2는 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, *AtDRUCE3* 유전자가 암호화하는 단백질의 E2 ubiquitin conjugase 활성을 분석한 것이다. 별표는 항-Myc, 항-유비퀴틴 항체를 이용한 DRUCE-유비퀴틴 어덕트를 의미한다.
- 도 3은 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, *AtDRUCE3*의 세포 내 위치를 분석한 것이다.
- 도 4는 *DRUCE1*, *DRUCE2*, *DRUCE3*의 T-DNA 기능 상실(loss-of-function) 돌연변이 대립 유전자를 도식화한 것이다. 도 4(A)는 *DRUCE1*, *DRUCE2*, *DRUCE3*의 유전자 구조 모식도 및 T-DNA 삽입 위치를 나타낸 것으로, Inverted triangles는 T-DNA insertion sites를 의미한다. 도 4(B)는 단일 및 3중 기능 상실 돌연변이 식물체의 Genotyping PCR 결과이다. 도 4(C)는 야생종(Wild-type), 및 돌연변이 식물체에서 *DRUCE1*, *DRUCE2*, *DRUCE3* 전사 수준을 분석하기 위한 RT-PCR 결과이다. *DRUCE10*은 로딩 대조군으로 사용되었다.
- 도 5는 건조 스트레스에 따른 야생형 및 형질전환 식물체의 기공개폐를 관찰한 것이다.
- 도 6은 건조 스트레스에 따른 야생형 및 형질전환 식물체의 표현형을 분석한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하

게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

- [0031] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0032] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고서에 기술되어 있다.
- [0033] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.
- [0034] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사건이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0036] 본 발명자들은 건조 스트레스와 관련된 유전자를 규명하고자 예의 노력한 결과 종래 밝혀지지 아니한 신규 유전자가 건조 스트레스에 대해 음성 조절인자로서 작용함을 확인하였다.
- [0037] 상기 “건조 스트레스”는 생물학적 스트레스 중 물 부족으로 인한 스트레스를 의미하며 작물 수확량을 감소시키는 대표적인 스트레스에 해당한다.
- [0038] 상기 유전자는 건조 스트레스 상황에서 발현이 증가하고, 상기 유전자의 번역 단백질은 E2 ubiquitin conjugase 효소활성을 가지는 단백질로서, 본 발명자들은 상기 유전자를 “*AtDRUCE*(Drought-Related Ubiquitin-Conjugating Enzyme)”로 명명하였다.
- [0039] 상기 *AtDRUCE1*은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 *AtDRUCE2*는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 *AtDRUCE3*은 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [0040] 또한, 상기 *AtDRUCE1* 유전자는 서열번호 4의 핵산 서열로 암호화되고, 상기 *AtDRUCE2* 유전자는 서열번호 5의 핵산 서열로 암호화되고, 상기 *AtDRUCE3* 유전자는 서열번호 6의 핵산 서열로 암호화될 수 있다.
- [0041] 상기 유전자를 과다 발현시킨 식물체는 건조 스트레스에 대한 저항성이 감소된 반면, 상기 유전자의 발현이 저하된 식물체는 건조 스트레스에 대해 강한 저항성을 나타내었다.
- [0042] 상기 유전자의 발현 억제제는 게놈 DNA에 내재적으로 존재하는 유전자를 DNA 수준, mRNA 수준 및 단백질 수준에서 불활성화시켜서 수행할 수 있고, 식물체의 특성을 고려할 때 DNA 수준 및 mRNA 수준에서 불활성화할 수 있다.
- [0043] DNA 수준에서 유전자를 불활성화시키는 방법으로서 (a) 상기 유전자를 구성하는 하나 또는 그 이상의 핵산 서열을 다른 서열로 치환시키거나 결실시키는 단계; (b) 상기 유전자를 구성하는 핵산 서열에 다른 서열을 삽입시키는 단계; 또는 (c) 상기 유전자를 구성하는 하나 또는 그 이상의 핵산 서열을 이동(frame shift)시키는 단계를 포함하는 통상적인 돌연변이 유발 방법을 이용할 수 있다.
- [0044] RNA 수준에서 유전자를 불활성화시키는 방법으로서 (d) 상기 유전자를 구성하는 억제하는 단계; 또는 (e) 상기 유전자로부터 전사된 mRNA를 불활성화시키는 단계;를 포함하는 방법을 이용할 수 있다.
- [0045] 상기 유전자를 불활성화시키는 구체적인 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 돌연변이 방법을 제한 없이 사용할 수 있고, 예컨대, 재조합 벡터를 이용한 상동재조합 방법, 단일교차 재조합 방법, T-DNA 삽입방법 등을 사용할 수도 있다.
- [0046] 본 발명의 일 측면은 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 및 *AtDRUCE3*으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 발현을 억제하는 식물체의 건조 저항성 증진용 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 상기 단백질의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 조성물은 상기 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 및 *AtDRUCE3*으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 발현을 억제시킴으로써 식물체의 건조 저항성을 효과적으로 증진시킬 수 있다.

- [0048] 상기 “핵산 분자(nucleic acids)”는 DNA(gDNA, cDNA 및 CDS) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함할 수 있다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).
- [0049] 구체적으로, 상기 핵산 분자는 T-DNA, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고핵산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 상기 “T-DNA(Tranferred DNA)”는 Ti 플라스미드를 갖춘 토양세균인 *Agrobacterium tumefaciens*가 식물에 감염할 때 식물세포에 이행하는 Ti 플라스미드의 영역으로서 양 끝이 25 염기쌍의 불완전한 직열반복배열(경계배열, border sequence)로 둘러싸여 있으며, T-DNA상에는 *Agrobacterium*에 의한 식물세포의 종양화에 관계하는 시토키인 합성유전자, 옥신합성 유전자 또는 오피오피인 유전자 등이 존재한다.
- [0051] 상기 “siRNA(small interfering RNA)”는 RNA 간섭 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 약 20 뉴클레오타이드 크기의 작은 핵산 분자를 의미한다.
- [0052] 상기 siRNA가 세포 내에 도입되면 다이스어(dicer) 단백질에 의해 인지되어 상기 바이오마커 유전자를 분해하여 결국 유전자의 발현을 저해할 수 있다. 상기 siRNA는 공지된 siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법(Sui G 등, (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:5515-5520), 실험적 환경에서 전사를 이용한 siRNA의 합성법(Brummelkamp TR 등, (2002) Science 296:550-553)에 의해 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 상기 “shRNA(short hairpin RNA)”는 siRNA 타겟 서열의 센스 및 안티센스 서열이 5-9개의 염기로 구성된 루프(loop)를 사이에 두고 위치한 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA)를 의미한다.
- [0054] 상기 shRNA는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소의 프로모터로부터 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 상기 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도할 수 있다.
- [0055] 상기 “miRNA(micro RNA)”는 생물의 유전자 발현을 제어하는 역할을 하는 RNA로서 통상의 mRNA가 수천개의 뉴클레오타이드(nucleotide)로 이루어진 데 반해 상기 miRNA는 20 내지 25개의 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다.
- [0056] 상기 “리보자임(ribozyme)”은 RNA 스플라이싱(splicing), tRNA합성, 단백질 합성 등의 생화학 반응을 촉매하는 효소의 기능을 가진 RNA를 의미한다.
- [0057] 상기 “PNA(peptide nucleic acids)”는 DNA의 생화학적 불안정성을 보완하기 위해 유기합성으로 개발된 인공 DNA를 의미한다.
- [0058] 상기 “안티센스”는 안티센스 올리고머라고도 하며, 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어 표적 서열 내에서 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체를 형성할 수 있는 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다.
- [0059] 상기 안티센스는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있고, mRNA의 번역을 차단 또는 저해하며, mRNA의 스플라이스 변이체를 생산하는 mRNA의 프로세싱 과정을 변화시킬 수 있다.
- [0060] 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 상기 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0061] 상기 실질적인 동일성은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(alignment)하고, 당업계에 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우 최소 60%의 상동성, 일 구현예에 따르면 70%의 상동성, 어떠한 구현예에 따르면 80%의 상동성, 특정 구현예에 따르면 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미할 수 있다.
- [0062] 서열비교를 위한 얼라인먼트(alignment) 방법은 당업계에 공지되어 있다. 상기 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 있다.

- [0063] NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다.
- [0064] 상기 조성물은 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열 또는 이와 상보적인 핵산 서열에 결합하여 발현을 억제하는 핵산 서열; 및 이와 작동 가능하게 연결된 (operably linked) 프로모터;를 포함하는 재조합 벡터를 포함할 수 있다.
- [0065] 상기 "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 의미한다.
- [0066] 상기 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 의미한다. 또한, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0067] 상기 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 의미한다.
- [0068] 상기 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 상기 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입될 수 있다.
- [0069] 상기 "재조합 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. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소 (translation control element)를 포함할 수 있다.
- [0070] 상기 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 또는 *AtDRUCE3* 유전자는 식물(예컨대, 애기장대)에서 분리되었고, 특정 스트레스에 대한 식물체의 내성을 증진하는 작용을 할 수 있으므로, 식물에 대하여 가장 바람직한 유용성을 가질 수 있다.
- [0071] 상기 벡터가 식물 세포에 적용되는 경우, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예컨대, SP6 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, PM 프로모터, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 컬리폴라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 신타아제(nos) 프로모터, 피그위트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤멜리나 엘로우 모틀 바이러스 프로모터, 리볼로오스-1,5-비스-포스페이트 카복실라아제 스몰 서브유닛(ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토솔 트리오포스페이트 이소머라아제(TPI) 프로모터, 아라비도시스스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(APRT) 프로모터 및 옥토파인 신타아제 프로모터를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 상기 재조합 벡터는 마커 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자, 제초제 저항성 유전자, 대사관련 유전자, 발광 유전자, GFP(green fluorescence protein) 유전자, GUS(β glucuronidase) 유전자 및 GAL(β 유전자로부터 선택될 수 있다.
- [0073] 예컨대, 상기 마커 유전자는 제초제 저항성 Bar 유전자, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(NPT II) 유전자, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자, 포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자, 또는 다이하이드로폴레이트 환원효소 유전자를 포함할 수 있다.
- [0074] 상기 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 있다.
- [0075] 상기 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(ex. pGA2897, pSK349, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pH79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(ex. λ 4B, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(ex. SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0076] 일 실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 바이너리 벡터일 수 있다.

- [0077] 상기 “바이너리 벡터”는 Ti(tumor inducible) 플라스미드에서 이동에 필요한 부분인 LB(left border)와 RB(right border)를 가지는 플라스미드 및 타겟 핵산을 옮기는데 필요한 유전자를 가진 플라스미드를 두 개로 분할한 벡터를 의미한다. 상기 아그로박테리움은 상기 핵산 서열의 발현에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않는다.
- [0078] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물로 형질전환된 건조 저항성이 증진된 식물체가 제공된다.
- [0079] 상기 “형질전환”은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 형질전환 방법은 반드시 재생 또는 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다.
- [0080] 상기 형질전환은 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이며, 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다.
- [0081] 상기 형질전환 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 선택할 수 있다.
- [0082] 상기 벡터가 도입되는 식물 세포는 식물로 재생될 수 있는 한 특정한 형태로 제한되는 것은 아니다. 예컨대, 상기 세포는 배양된 세포 부유물, 원형질체(protoplast), 잎 절편(leaf section) 및 캘러스(callus)를 포함할 수 있다.
- [0083] 상기 식물세포는 통상적인 방법에 따라 배양되어 액체 배양물, 캘러스, 원형질 배양물이 될 수 있으며, 분화되어 식물의 조직 또는 식물이 될 수 있다.
- [0084] 상기 재조합 벡터가 도입된 형질전환 세포들은 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 캘러스 유도, 발근 및 토양 순화와 같은 과정을 거쳐 식물체로 재분화시킬 수 있으며, 꺾꽂이, 접붙이기 등과 같은 무성번식방법 및 종자를 이용하여 유성번식방법에 의해 생산할 수 있다.
- [0085] 상기 식물세포의 배양은 식물의 일부를 모체로부터 분리하여 적당한 조건 아래에서 무균적으로 배양하여 생육시키는 것으로 조직 절편의 액체 배양, 조직 절편의 캘러스 배양, 원형질체 배양 등 당업자에게 공지된 어떠한 방식의 것에 의할 수 있으며, 그 배양 조건 및 방법은 당업자에게 공지된 조건 및 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0086] 상기 배양된 식물세포를 식물로 분화시키는 것은 캘러스, 원형질체 형태의 배양된 식물세포를 적당한 조건아래에서 분화를 유도하여 식물의 조직 또는 식물로 분화시키는 것으로 분화 조건 및 방법은 당업자에게 공지된 조건 및 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0087] 구체적으로 상기 형질전환 식물체는 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 또는 *AtDRUCE3* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환시킨 후 통상적인 방법에 따라 캘러스의 유도, 발근 및 토양 순화의 과정을 통해 수득할 수 있다.
- [0088] 즉, 상기 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 또는 *AtDRUCE3* 유전자가 포함된 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입시키고 상기 아그로박테리움을 이용하여 캘러스에 형질전환 시킬 수 있으며, 제초제에 생존하는 개체를 선발하여 형질전환 식물체를 수득할 수 있다.
- [0089] 본 발명의 다른 측면에 따르면, *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 및 *AtDRUCE3*으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 발현이 억제된 건조 저항성이 증진된 식물체가 제공되고, 상기 식물체는 변이된 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 또는 *AtDRUCE3* 유전자를 발현할 수 있다.
- [0090] 상기 식물체는 변이된 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 또는 *AtDRUCE3* 유전자를 발현하므로 야생형과 비교하여 건조 스트레스가 현저히 증진될 수 있다.
- [0091] 상기 “식물체”는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직, 식물 세포 또는 조직으로부터 유래된 캘러스 및 식물의 종자 등을 모두 포함할 수 있다.
- [0092] 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 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 특용 작물류; 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 사료작물류를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0093] 특정 뉴클레오타이드 또는 이를 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 식물세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 실시될 수 있다.
- [0094] 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물 세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.
- [0095] 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜드로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 상기 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다(참조: 미국특허 제5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).
- [0096] 상기 식물체는 당업계에 공지된 방법에 의해 형질전환 여부를 확인할 수 있다. 예컨대, 상기 식물체의 조직으로부터 얻은 DNA 시료를 이용하여, PCR을 실시하면 형질전환 식물체의 게놈에 삽입된 외래 유전자가 규명될 수 있다.
- [0097] 택일적으로, 노던 또는 서던 블롯팅을 실시하여 형질전환 여부를 확인할 수 있다(Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory).
- [0098] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 기술한다.

[0099] 실험예 1 : 유전자의 분리 획득

- [0100] 본 발명자들은 ABA 호르몬 및 비생물학적 스트레스에 의해서 유도되는 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 및 *AtDRUCE3* 유전자를 애기장대의 cDNA로부터 분리 획득하였다.
- [0101] 10일된 야생형 애기장대의 유묘를 액체 질소를 사용하여 막자 사발에서 파우더로 분쇄하였다.
- [0102] 1g 당 2ml의 추출 완충액(4M 구아니딘-HCl 20mM, 10mM EDTA, 10mM EGTA(USB), 0.5% 사르코실(SIGMA, pH 9)과 β-머캅토에탄올(SIGMA-ALDRICH)을 이용하여 추출한 후 코니칼 튜브로 옮기고 동량의 PCI(페놀 : 클로로포름 : 이소아밀알콜 = 25 : 24 : 1)와 혼합하여 5분간 흔들어 준 후 3,500 rpm에서 25분간 원심분리(한일 원심분리기, HA-1000-3)하였다.
- [0103] 원심분리 후 상층의 유기 용매층을 제거하고, 동량의 PCI를 혼합한 후 원심 분리하는 과정을 2회 반복하고, 형성된 하부 수용액 층을 2회 에탄올 침전 및 1회 LiCl 침전 방법을 사용하여 RNA를 분리하였다.
- [0104] 정량을 통해 2 μg의 RNA를 올리고 dT 프라이머 및 MMLV 역전사효소(Fermentas)를 이용하여 단일가닥 cDNA를 합성하였다.
- [0105] PCR 수행을 위해 주형으로 20ng의 cDNA를 사용하였으며 두 종류의 프라이머를 각각 10 pmole 씩, 10 x Taq 폴리머라제 완충용액(Takara) 5 μl, dNTP 혼합액(각 1.25 mM) 8 μl 및 1 유닛의 Taq DNA 폴리머라제(Takara)를 넣어 총 부피를 50 μl로 만들었다.
- [0106] Perkin Elmer DNA 썬멀 사이클러로 PCR을 수행하였다. 94℃에서 2분간 변성시킨 후, 94℃에서 30초, 52℃에서 30초, 72℃에서 1분을 반복하고, 본 과정을 30회 수행하였다.
- [0107] 30회 반복이 끝난 후 72℃에서 5분간 추가로 중합반응을 수행하고 전기영동 방법을 이용하여 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, 및 *AtDRUCE3* 유전자의 증폭을 확인하였고, 상기 DNA를 시퀀싱하여 재차 확인하였다.

[0108] 실험예 2 AtDRUCE 단백질의 구조 및 서열 비교 분석

- [0109] AtDRUCE 단백질의 구조를 도식화하고, 유사체에 대한 다중 열라인(Multiple alignment)을 수행하였다.
- [0110] 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) DRUCE1, DRUCE2, DRUCE3, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) DRUCE6, 및 인간(homo sapiens) DRUCE6e를 ClustalW 를 이용해 열라인하였다.
- [0111] SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 및 SMS (http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)를 이용해 도메인 및 유사성을 분석하였다.
- [0112] 도 1을 참조하면, 상기 3종의 단백질은 DRUCE XIV group에 속하는 E2로서(Kraft et al. (2005)), 보존된 DRUCE

도메인 및 막관통 도메인(transmembrane domain)을 포함한다.

[0113] 상호 단백질 서열의 유사성 분석 결과, 효소활성을 가지는 DRUCE 도메인의 경우 DRUCE1 및 DRUCE2는 49.7%, DRUCE1 및 DRUCE3는 50.9%, DRUCE2 및 DRUCE3은 96.2%의 유사성이 확인되었다

[0114] 상기 단백질 서열의 상동성은 3종의 유전자 간 상호 보완적인 기능을 시사한다.

[0115] 실험예 3 : 단백질의 활성 분석

[0116] *In vitro* E2 activity assay를 통해 *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, *AtDRUCE3* 유전자가 암호화하는 단백질이 E2 ubiquitin conjugase로서 기능하는지 확인하였다.

[0117] C-말단 막관통 도메인을 잘라낸 Myc-DRUCE1 Δ C¹⁻²⁷³, His-Myc-DRUCE2 Δ C¹⁻²¹⁸, His-Myc-DRUCE3 Δ C¹⁻²¹²을 대장균에서 발현시켜 정제한 후, wheat UBA1(E1) 및 유비퀴틴(ubiquitin)을 투입하고 반응시켰다.

[0118] 도 2를 참조하면, 반응 결과 각 단백질에서 유비퀴틴-DRUCE 어덕트(adducts)가 생성된 반면, 환원제(reducing reagent)인 DTT를 넣고 가열하였을 때 상기 어덕트가 제거되었다.

[0119] 상기 결과는 상기 3종의 단백질이 모두 실제 E2 ubiquitin conjugase 로서 활성을 가짐을 시사한다.

[0120] 실험예 4 : 단백질의 세포 내 위치 분석

[0121] 도 3은 *N. benthamiana* 세포에서 일과성 발현(transient expression) 동안 DRUCE1, DRUCE2, DRUCE3의 세포 내 국지화(localization)를 나타낸 것이다.

[0122] *35S:DRUCE1-GFP*, *35S:DRUCE2-GFP*, *35S:DRUCE3-GFP* construct를 *35:SP-mRFP-HDEL*와 함께 담배 잎에 공동-형질 주입(co-transfected)한 후 프로토플라스트(protoplast)를 추출하여 관찰하였다.

[0123] SP-mRFP-HDEL은 소포체 마커 단백질로 사용되었으며 단일 펩타이드의 BIP1(SP), monomeric RFP(mRFP), ER retention signal motif, HDEL로 이루어져 있다(Bars = 20 nm).

[0124] AtDRUCE 단백질의 유사체인 ScDRUCE6(효모), HsDRUCE6e(인간)는 이미 소포체에서 작용하는 ERAD(Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation)의 구성 단백질로 알려져 있으며(Sommer and Jentsch, 1993; Oh et al., 2006), 애기장대 DRUCE1 역시 소포체에서의 위치가 확인된 바 있다(cui et al., 2012).

[0125] 담배(*Nicotiana benthamiana*) 및 agrobacteria system을 이용해 형광단백질이 결합된 DRUCE를 발현시킴으로써 상기 단백질의 동일 세포 내 위치를 분석하였다.

[0126] 도 3을 참조하면, AtDRUCE1, AtDRUCE2, 및 AtDRUCE3 모두 소포체에 존재하였으며, 동일한 세포소기관에서 상호 보완적인 기능을 할 것으로 추정되었다.

[0127] 실험예 5 : 유전자의 구조 분석 및 돌연변이 식물체 확보

[0128] 건조 스트레스에 따른 상기 유전자들의 표현형을 분석하기 앞서 AtDRUCE1, AtDRUCE2, AtDRUCE3 유전자의 구조를 분석하고 T-DNA 도입 돌연변이 식물체를 확보하였다.

[0129] 상기 3종의 유전자에 T-DNA가 삽입된 대립 형질(allele)의 종자를 각 한 종류씩 ABRC를 통해서 수득하였다(도 4).

[0130] genotyping PCR(도 4B) 및 RT-PCR 실험(도 4C)을 통해 *DRUCE1*, *DRUCE2*, *DRUCE3* 돌연변이체의 기능 상실(loss-of-function) 여부를 확인하였다.

[0131] 또한, 상기 3종의 단백질이 상호 보완적인 기능을 가진다면, *AtDRUCE1*, *AtDRUCE2*, *AtDRUCE3* 유전자의 기능이 모두 상실된 3중 기능 상실(triple loss-of-function) 돌연변이 식물체에서 더 강한 기능 억제가 일어날 확률이 높으므로 돌연변이들을 상호 교배하여 순종의 3중 기능 상실 돌연변이 식물체를 확보하였다.

[0132] 실험예 6 : 건조 스트레스에 따른 기공개폐(stomatal aperture) 측정

[0133] 상기 유전자들의 기능 분석을 위해 표현형을 관찰하였다.

[0134] 식물의 스트레스 호르몬으로 잘 알려진 ABA(abscisic acid)를 처리한 후 기공개폐의 관찰을 통해 야생종 및 돌연변이체들의 ABA에 대한 민감성을 분석하였다.

[0135] 도 5를 참조하면, Opening solution을 이용해 기공을 완전히 개방시킨 후 ABA를 처리하였을 때, DRUCE1,

DRUCE2, DRUCE3 기능 상실 돌연변이체의 기공이 야생종에 비해 더 많이 폐쇄되었다.

DRUCE1DRUCE23DRUCE3 3중 기능 상실 돌연변이체의 경우 기공 폐쇄 효과가 더욱 증가하였다.

상기 결과는 단일 혹은 3중 기능 상실 돌연변이체의 ABA에 대한 민감도가 증가하였음을 시사하며, ABA는 여러 비생물학적 스트레스에 의해서 생성되므로 돌연변이체는 건조 스트레스에 대한 저항성이 증가할 것으로 예측되었다.

실험예 7 : 건조 스트레스에 따른 표현형 분석

야생종과 돌연변이체에 건조 스트레스를 표현형의 차이를 관찰하였다.

야생종, 및 DRUCE1, DRUCE2, DRUCE3, DRUCE1DRUCE23DRUCE3 돌연변이체를 약 3주 간 생장시킨 후 12일 동안 수분의 공급을 중단하였다.

다시 물을 공급하고 2일 후 표현형을 관찰한 결과, DRUCE1, DRUCE2, DRUCE3 돌연변이체에서 가뭄 저항성이 증가하였다(도 6A).

특히 DRUCE1DRUCE23DRUCE3 3중 기능 상실 돌연변이체는 야생종에 비해 약 5배 이상 가뭄 저항성이 큰 폭으로 증가하였다.

도 6B를 참조하면, 단일, 3중 기능 상실 돌연변이체의 경우 야생종에 비해 상대적으로 수분 손실에 따른 질량의 감소량이 적은 수준으로 분석되었다.

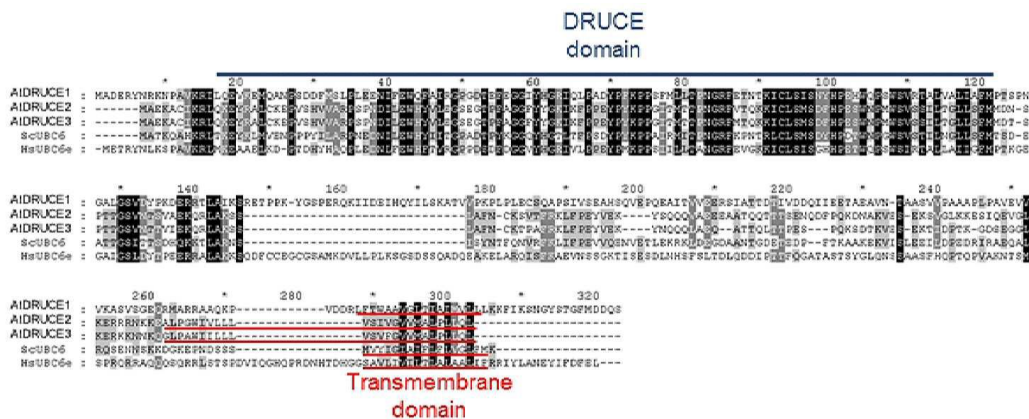
상기 결과는 애기장대의 group XIV E2 conjugase인 *AtDRUCE1*(At3g17000), *AtDRUCE2*(At5g50430), 또는 *AtDRUCE3*(At1g17280) 유전자 발현이 사라진 단일 기능 상실 돌연변이 식물체의 경우 야생종에 비해서 가뭄 저항성이 증가하고, 특히, 3중 기능 상실 돌연변이체는 더욱 강한 가뭄 저항성을 가지므로, 상기 유전자의 돌연변이 식물체가 가지는 강한 가뭄 저항성을 각종 식용 작물에 도입함으로써 용수량이 부족한 지역에 적합한 작물 개발이 가능함을 시사한다.

전술한 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. 예컨대, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

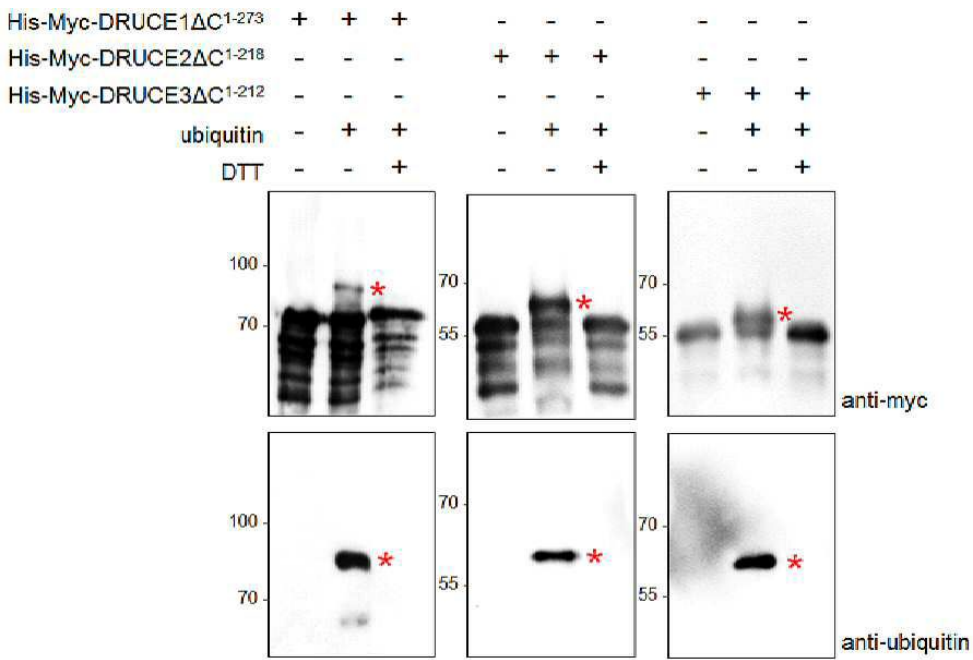
본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

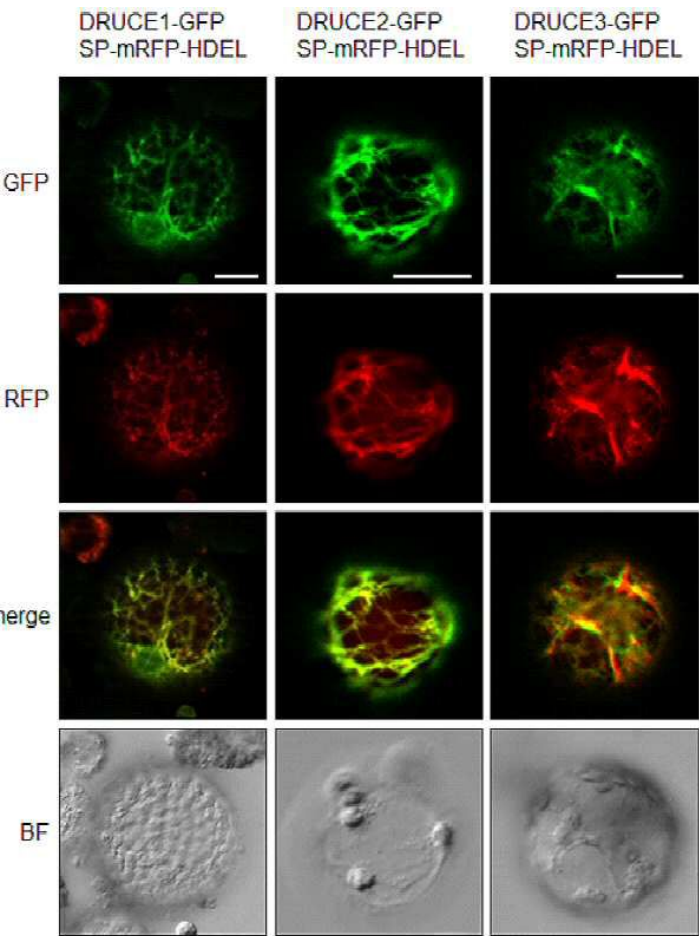
도면1



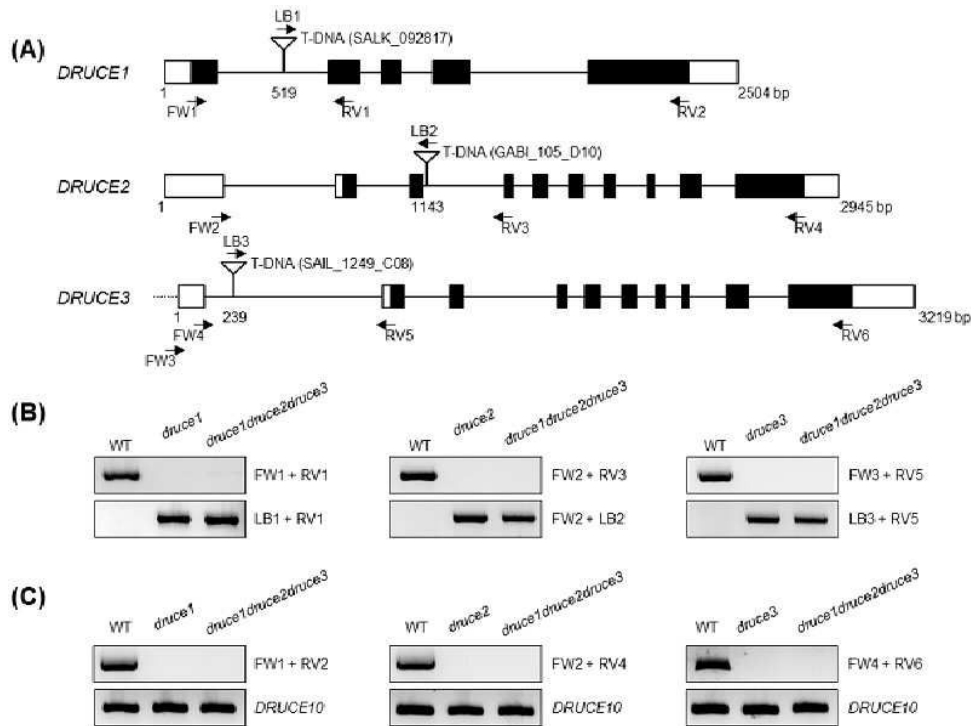
도면2



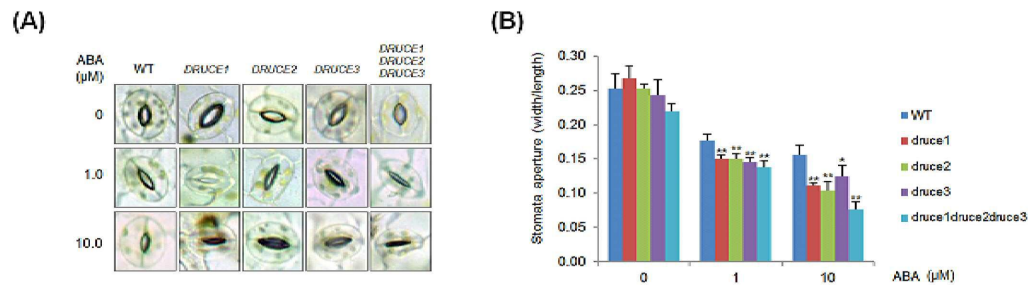
도면3



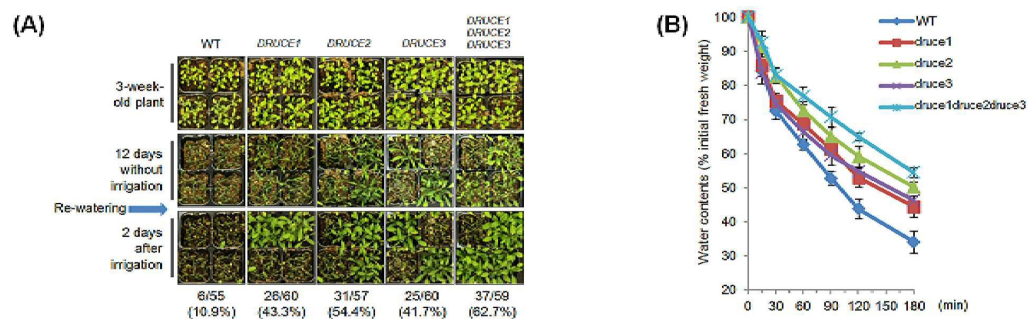
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> YONSEI UNIVERSITY

<120> A NOVEL GENE RELATED TO PLANT DROUGHT STRESS TOLERANCE AND USE

THEREOF

<130> 18PP10489

<160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 309

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Ala Asp Glu Arg Tyr Asn Arg Lys Asn Pro Ala Val Lys Arg Ile

1 5 10 15

Leu Gln Glu Val Lys Glu Met Gln Ala Asn Pro Ser Asp Asp Phe Met

20 25 30

Ser Leu Pro Leu Glu Glu Asn Ile Phe Glu Trp Gln Phe Ala Ile Arg

35 40 45

Gly Pro Gly Asp Thr Glu Phe Glu Gly Gly Ile Tyr His Gly Arg Ile

50 55 60

Gln Leu Pro Ala Asp Tyr Pro Phe Lys Pro Pro Ser Phe Met Leu Leu

65 70 75 80

Thr Pro Asn Gly Arg Phe Glu Thr Asn Thr Lys Ile Cys Leu Ser Ile

85 90 95

Ser Asn Tyr His Pro Glu His Trp Gln Pro Ser Trp Ser Val Arg Thr

100 105 110

Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Phe Met Pro Thr Ser Pro Asn Gly Ala

115 120 125

Leu Gly Ser Val Asp Tyr Pro Lys Asp Glu Arg Arg Thr Leu Ala Ile

130 135 140

Lys Ser Arg Glu Thr Pro Pro Lys Tyr Gly Ser Pro Glu Arg Gln Lys

145 150 155 160

Ile Ile Asp Glu Ile His Gln Tyr Ile Leu Ser Lys Ala Thr Val Val

165 170 175

Pro Lys Pro Leu Pro Leu Glu Cys Ser Gln Ala Pro Ser Ile Val Ser

180 185 190
 Glu Ala His Ser Gln Val Glu Pro Gln Glu Ala Ile Thr Val Val Glu
 195 200 205
 Glu Arg Ser Ile Ala Thr Thr Asp Thr Ile Val Asp Asp Gln Ile Ile
 210 215 220
 Glu Glu Thr Ala Glu Ala Val Asn Thr Ala Ala Ser Val Val Pro Ala
 225 230 235 240
 Ala Ala Pro Leu Pro Ala Val Glu Val Val Val Lys Ala Ser Val Ser

 245 250 255
 Gly Glu Gln Arg Met Ala Arg Arg Ala Ala Gln Lys Pro Val Asp Asp
 260 265 270
 Arg Leu Phe Thr Trp Ala Ala Val Gly Leu Thr Ile Ala Ile Met Val
 275 280 285
 Leu Leu Leu Lys Lys Phe Ile Lys Ser Asn Gly Tyr Ser Thr Gly Phe
 290 295 300
 Met Asp Asp Gln Ser
 305
 <210> 2
 <211> 243
 <212> PRT
 <213>
 > Arabidopsis thaliana
 <400> 2
 Met Ala Glu Lys Ala Cys Ile Lys Arg Leu Gln Lys Glu Tyr Arg Ala
 1 5 10 15
 Leu Cys Lys Glu Pro Val Ser His Val Val Ala Arg Pro Ser Pro Asn
 20 25 30
 Asp Ile Leu Glu Trp His Tyr Val Leu Glu Gly Ser Glu Gly Thr Pro
 35 40 45
 Phe Ala Gly Gly Phe Tyr Tyr Gly Lys Ile Lys Phe Pro Pro Glu Tyr
 50 55 60

 Pro Tyr Lys Pro Pro Gly Ile Thr Met Thr Thr Pro Asn Gly Arg Phe
 65 70 75 80

Val Thr Gln Lys Lys Ile Cys Leu Ser Met Ser Asp Phe His Pro Glu
85 90 95
Ser Trp Asn Pro Met Trp Ser Val Ser Ser Ile Leu Thr Gly Leu Leu
100 105 110
Ser Phe Met Met Asp Asn Ser Pro Thr Thr Gly Ser Val Asn Thr Ser
115 120 125
Val Ala Glu Lys Gln Arg Leu Ala Lys Ser Ser Leu Ala Phe Asn Cys
130 135 140
Lys Ser Val Thr Phe Arg Lys Leu Phe Pro Glu Tyr Val Glu Lys Tyr
145 150 155 160
Ser Gln Gln Gln Val Ala Glu Glu Glu Ala Ala Thr Gln Gln Thr Thr
165 170 175
Thr Ser Glu Asn Gln Asp Phe Pro Gln Lys Asp Asn Ala Lys Val Glu
180 185 190
Ser Glu Lys Ser Val Gly Leu Lys Lys Glu Ser Ile Gln Glu Val Gly
195 200 205
Leu Lys Glu Arg Arg Arg Asn Lys Lys Glu Ala Leu Pro Gly Trp Ile
210 215 220
Val Leu Leu Leu Val Ser Ile Val Gly Val Val Met Ala Leu Pro Leu
225 230 235 240
Leu Gln Leu

<210> 3

<211> 237

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

Met Ala Glu Lys Ala Cys Ile Lys Arg Leu Gln Lys Glu Tyr Arg Ala
1 5 10 15
Leu Cys Lys Glu Pro Val Ser His Val Val Ala Arg Pro Ser Pro Asn
20 25 30
Asp Ile Leu Glu Trp His Tyr Val Leu Glu Gly Ser Glu Gly Thr Pro

35 40 45
 Phe Ala Gly Gly Phe Tyr Tyr Gly Lys Ile Lys Phe Pro Pro Glu Tyr
 50 55 60
 Pro Tyr Lys Pro Pro Gly Ile Thr Met Thr Thr Pro Asn Gly Arg Phe
 65 70 75 80
 Met Thr Gln Lys Lys Ile Cys Leu Ser Met Ser Asp Phe His Pro Glu
 85 90 95

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

 165 170 175
 Glu Ser Pro Gln Lys Ser Asp Thr Lys Val Glu Ser Glu Lys Thr Ile
 180 185 190
 Asp Pro Thr Lys Gly Asp Ser Glu Gly Gly Leu Lys Glu Arg Lys Lys
 195 200 205
 Asn Asn Lys Gln Gly Leu Pro Ala Trp Ile Ile Leu Leu Leu Val Ser
 210 215 220
 Val Phe Gly Val Val Met Ala Leu Pro Leu Leu Gln Leu
 225 230 235

<210> 4

<211> 930

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

atggcggatg agaggtataa tcggaagaat ccggcgggtga agaggatttt gcaggaggtt 60

aaggagatgc aagctaattcc gtctgatgat tttatgtctc ttcctcttga ggagaatatc 120

| | |
|--|-----|
| tttgagtggc aattcgccat ccgaggtcct ggtgatactg aattcgaggg cgggatttat | 180 |
| catgggagaa ttcagttgcc tgcagattat ccattcaaac ctccttcatt catgttattg | 240 |
| accctaacg ggcgctttga aactaacacc aagatttgc tgcagatttc aaactaccac | 300 |
| cctgagcatt ggcaaccttc atggagtgtt cggactgctt tgggtgctct cattgcattt | 360 |
| | |
| atgccacaa gtccaatgg agcactgggc tcagtagatt atccaaagga tgagagacgt | 420 |
| acactagcca ttaaatcacg tgagacacca cctaagtatg gctctcctga acggcaaaaa | 480 |
| attattgatg agattcatca gtacatcctt agcaaagcaa ccgtggttcc aaaacctctt | 540 |
| cctctggaat gtagccaagc accttccatc gtatcagaag ctcactccca agttgagcca | 600 |
| caggaagcga taactgtagt agaagagcgg tccatcgcta caacagacac catagttagt | 660 |
| gatcaaatca tagaagagac agctgaagca gtcaatacag cagctagtgt ggttcccgt | 720 |
| gcagcacctt taccagcgg tgaagttgtg gtcaaagctt ctgtaagtgg tgagcaaagg | 780 |
| | |
| atggccagaa gagcggctca gaagccagtc gatgacagac tcttcacgtg ggccggcggtt | 840 |
| gggctcacia tcgtatcat ggttcttctt ctgaagaagt tcataaaatc aaatggttac | 900 |
| agtactgggt ttatggatga tcagtcttga | 930 |
| <210> 5 | |
| <211> 732 | |
| <212> DNA | |
| <213> Arabidopsis thaliana | |
| <400> 5 | |
| atggcagaaa aagcttgtat aaagcgtctt caaaaagaat acagagcgt ttgcaaggaa | 60 |
| ccagctctgc atgttgtgc tcgtccttcc ccaaatgaca ttcttgaatg gcattatgtg | 120 |
| ttggaaggca gtgagggaac gccttttgca ggtggatttt actatggaaa gatcaagttc | 180 |
| | |
| cctccagaat atccttacaa gccacctgga atcacaatga ccacacaaa tggtcgattt | 240 |
| gtgacgcaaa agaaaatctg cttgtctatg agtgactttc atccagaaag ctggaatcca | 300 |
| atgtggtcag tgtcaagcat acttacagga cttctctcat ttatgatgga taacagcccc | 360 |
| acaacgggaa gtglaaacac tagttagacc gagaaacaac ggttggcgaa gtcattctctt | 420 |
| gctttcaatt gtaaaagtgt aacattccgg aaactatttc ccgagtatgt cgagaagtac | 480 |
| agccagcaac aagtagctga agaagaagca gccactcaac agacaacaac atctgagaat | 540 |
| caggattttc ctcaagga caatgcgaaa gtcgaatcag agaaaagcgt tggctttaa | 600 |
| | |
| aaggaaagta ttcaagaagt gggattgaaa gagaggagaa ggaacaagaa agaagcatta | 660 |
| ccgggttgga tagtattgtt gctagtatcg attgtcggtg ttgtaatggc gttgcctttg | 720 |

| | |
|---|-----|
| cttcagctgt ga | 732 |
| <210> 6 | |
| <211> 714 | |
| <212> DNA | |
| <213> Arabidopsis thaliana | |
| <400> 6 | |
| atggcagaaa aggcctgtat aaaacgtctt caaaaggaat atagagcact ttgcaaggaa | 60 |
| ccagtcctcc atgttgttgc tcgtccttcc ccaaatgaca ttctcgagtg gcattatgtg | 120 |
| ctggaaggca gtgagggaac accttttgca ggtggatttt actatggaaa gatcaagttt | 180 |
| | |
| cctcccgagt atccttacaa gccaccaggg attacaatga ctacaccaa tggtcgattc | 240 |
| atgacacaga agaaaatttg tttatctatg agtgattttc atccagaaag ctggaatccg | 300 |
| atgtggtctg tatcaagcat acttacagga cttctctcat ttatgatgga taccagtccg | 360 |
| acaactggaa gtgttaacac tactgtaatt gagaaacaac ggttggctaa gtcattcttc | 420 |
| gctttcaatt gtaaaacccc agcatttcga aagctatttc cagagtatgt agagaagtac | 480 |
| aaccagcagc aactagctga gcaagctacc acacaactga caacaccaga gtctcctcaa | 540 |
| aagagcgata ccaaagtcga gtcagagaaa accatcgatc caacaaaggg agattcagaa | 600 |
| | |
| ggtggcttga aggagaggaa aaagaacaat aaacagggat tgccagcgtg gataatactg | 660 |
| ttgctagtgt cggttttcgg tgttgtaatg gcgttgcttc tgcttcaact gtga | 714 |