



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0004212
(43) 공개일자 2010년01월13일

(51) Int. Cl.

C07K 14/415 (2006.01) *C07K 14/00* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0064260

(22) 출원일자 2008년07월03일

심사청구일자 2008년07월03일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

김우택

서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 생물학과 연세과학원S134호

서영삼

서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 생물학과 연세과학원S134호

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 7 항

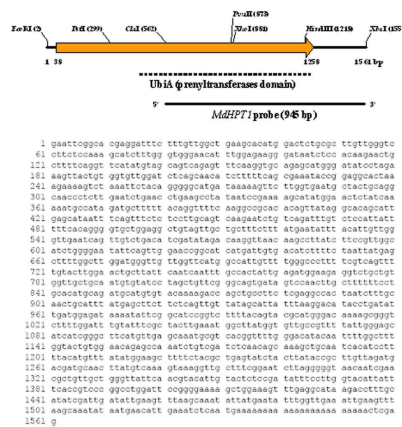
(54) 후지 사과의 비타민 E 생합성에 관여하는 MdHPT1유전자

(57) 요약

본 발명은 비타민 E (토코페롤) 생합성에 관여하는 후지 사과 (*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji) 유래의 MdHPT1 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 숙주세포 및 MdHPT1 유전자 증폭용 프라이머 세트에 관한 것이다.

본 발명의 MdHPT1 유전자는 사과를 포함한 여러 원예작물의 과일에서 과다발현시켜 비타민 E가 더욱 많이 포함된 과일을 생산하도록 함으로써 과일의 품질을 향상시키고 상업적 가치가 높은 과일을 생산하는데 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 후지 사과 (Malus domestica Borkh. cv. Fuji) 유래의 MdHPT1 (Malus domestica homogentisate prenyltransferase 1) 단백질.

청구항 2

제1항의 MdHPT1 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 4

제2항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 남세균인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 7

서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드로 이루어진, MdHPT1 유전자 증폭용 프라이머 세트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 후지 사과 (Malus domestica Borkh. cv. Fuji) 유래의 비타민 E (토코페롤)를 합성하는 유전자와 그 특성에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 사람이 섭취하는 식물체에서 부족한 영양성분을 보충하기 위한 기존의 여러 연구 중에서 대표적인 예는 쌀에 부족한 비타민 A를 보강한 Golden Rice의 탄생이라고 할 수 있다 (Ye et al., 2000, Science, 287, 303-305). Golden Rice는 벼에서 β -carotene의 함유량을 증가시킨 것인데, 사람은 β -carotene을 섭취하면 비타민 A로 전환시킬 수 있기 때문에 증가된 β -carotene은 매우 안전하고 효과적인 비타민 A 공급원이 될 수 있다. 따라서 이러한 연구의 결과는 쌀을 주식으로 사용함으로써 비타민 A의 섭취가 부족하기 쉬운 문제점을 해결할 수 있는 한 방편으로 기대를 모으고 있다.
- <3> 비타민 E 역시 광합성을 하는 식물에서만 생산되는 물질로 인체에 필수적인 미량원소이다. 비타민 E는 인체의 대사 과정에서 발생하는 활성 산소로부터 세포막을 보호해 주는 항산화작용으로 노화를 억제하는 것으로 연구되었는데, 우리나라와 미국에서 약 10 mg의 일일권장량 (recommended daily allowance, RDA)을 제시하고 있으며, 심장질환이나 암 예방, 면역력의 증가, 노화억제 등의 효과를 보기 위해서 일일권장량의 10 배에서 100 배에 가까운 많은 양을 섭취할 것을 권고하고 있다.
- <4> 그러나 음식을 통해 섭취하는 비타민 E의 양을 증가시키는 데는 제한적인 측면이 존재한다. 비타민 E는 α , β , γ , δ 의 4 가지 형태의 토코페롤과 토코트리엔올로 각각 구성되어 있으며, 이 8가지 중에서 오직 α 형태의 토코페롤과 토코트리엔올만이 인체에서 비타민 E 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.
- <5> 토코페롤과 토코트리엔올은 식물 중에서도 잎이나 종자에 그 함량이 높는데, 우리가 주로 식용으로 이용하는 종

자에는 비타민 E 활성이 낮은 γ 형태가 주종을 이루고 있다. 또한 과일에는 토코페롤의 함량이 잎이나 종자에 비해서 상대적으로 낮은 것으로 알려져 있다.

<6> 따라서 최근 들어 여러 식물체에서 비타민 E의 합성을 증가시키기 위해서 비타민 E의 생합성 과정을 연구하고, 그에 따른 효과를 예측하기 위해서 비타민 E가 과다발현되거나 발현되지 않는 식물체의 표현 형질을 분석하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

<7> 한국특허공개 제2007-0002763호에는 고수준의 총토코페롤 생산이 가능한 식물 형질전환체의 제조방법 및 식물 형질전환체가 개시되어 있으나, 호모겐티식산 피틸트랜스퍼라제 유전자는 광합성 세균으로부터 유래된 것이므로 본 발명의 후지 사과 유래의 것과는 상이하다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 후지 사과의 HPT1 유전자를 클로닝하고, 남세균에서 과발현되는 재조합 HPT1 효소의 특성을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

<9> 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 식물에서 비타민 E (토코페롤)를 합성하는 호모겐티제이트 프레닐트랜스퍼라아제 (homogentisate prenyltransferase)를 코딩하는 후지 사과 과일 유래의 MdHPT1 단백질을 제공한다.

<10> 본 발명은 또한, MdHPT1 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

<11> 본 발명은 또한, MdHPT1 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

<12> 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

<13> 본 발명은 또한, MdHPT1 유전자 증폭용 프라이머 세트를 제공한다.

효과

<14> 본 발명에 따른 후지 사과의 MdHPT1은 식물에서 비타민 E를 합성하는 과정에서 중요한 역할을 담당하는 homogentisate prenyltransferase를 코딩하는 MdHPT1으로서, 이를 식물에서 과다발현시킬 경우 비타민 E의 합성이 증가하여 영양소와 항산화 기능이 증가된 신기능, 고품질 작물/과일을 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<15> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 후지 사과 (Malus domestica Borkh. cv. Fuji) 유래의 MdHPT1 (Malus domestica homogentisate prenyltransferase 1) 단백질을 제공한다.

<16> 본 발명에 따른 MdHPT1 단백질의 범위는 후지 사과로부터 분리된 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체 내에서 homogentisate와 phytyl diphosphate (PDP)를 기질로 사용하여 토코페롤의 전구물질인 2-methyl-6-phytyl-benzoquinol (MPBQ)을 합성하는 활성을 의미한다.

<17> 또한, 본 발명은 상기 MdHPT1 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 유전자는 MdHPT1 단백질을 코딩하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 변이체가 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. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 겹)를 포함할 수 있다.

- <18> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 MdHPT1 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다.
- <19> 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 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 세포 내 재도입된 것이다.
- <20> 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다.
- <21> 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 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 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*E. coli*)이 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터 (pL λ 프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- <22> 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예: λ gt4 \cdot λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- <23> 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- <24> 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.
- <25> 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 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 쉼린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다. 상기 숙주세포는 바람직하게는 남세균이다.
- <26> 또한, 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.
- <27> 본 발명의 벡터를 숙주세포 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 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법(Capecci, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 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 숙주세포 내로 주입할 수 있다.
- <28> 본 발명은 또한, MdHPT1 유전자 증폭용 프라이머 세트를 제공한다. 상기 프라이머 세트는 서열번호 3 및 4의 올

리고뉴클레오티드로 이루어진다.

- <29> 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.
- <30> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <31> **재료 및 방법**
- <32> 1. 식물 재료, RNA 추출, 역전사효소-중합효소연쇄반응 (RT-PCR)
- <33> 후지 사과 (*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji) 과일은 수원 원예연구소 (National Horticultural Research Institute at the Rural Development Administration)에서 채취하였다.
- <34> RNA는 후지 사과의 잎과 다양한 성숙 시기의 과일에서 기존 문헌 (Bugos et al., 1995, Biotechniques, 19, 734-737; Lonneborg and Jensen, 2000, Biotechniques, 29, 716-718)에 따라 추출하였다.
- <35> cDNA는 2 μ l의 RNA에서 MMLV 역전사효소 (Promega, Madison, WI)를 이용하여 합성하였으며, MdHPT1 유전자에 특이적으로 제작된 올리고뉴클레오티드 프라이머 조합을 이용하여 PCR 반응에 이용하였다. PCR 반응은 25 μ l 부피에서 5 μ l의 cDNA 반응물을 이용하여 automatic thermal cycler (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT)에서 총 40 사이클로 수행하였으며, 각 단계는 96 $^{\circ}$ C 30초, 52 $^{\circ}$ C 45초, 68 $^{\circ}$ C 2분 30초로 구성하였다. PCR 반응에는 ExTaq DNA 중합효소 (Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하였다.
- <36> 2. 후지 사과에서 homogentisate prenyltransferase 의 클로닝
- <37> 후지 사과 과일에서 추출한 RNA에서 cDNA를 합성한 후 다음 올리고뉴클레오티드 조합을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다: 5'-TAYRTNGTNGGNHTNAAYCA-3' (HPT-1F; 서열번호 3) 및 5'-GCRTARAANARNTCCADATRAA-3' (HPT-1R; 서열번호 4). 이들 프라이머는 기존에 알려진 다른 종의 HPT 단백질의 아미노산 서열에서 중간 동일하게 보존된 아미노산 서열을 가지는 부분을 이용하여 작성하였다. 완전한 5' 과 3' 말단 염기서열은 후지 사과 과일의 cDNA 라이브러리에서 벡터 특이적 염기서열을 가진 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 수행함으로써 얻을 수 있었다.
- <38> 3. RNA 겔 블롯 분석 (노딩 분석)
- <39> 총 RNA를 0.3 부피의 10 mM LiCl을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 침전시킨 후, 에탄올에 침전시켰다. 총 RNA (20 μ g)를 1% 포름알데히드-아가로스 겔에서 전기영동에 의해 분리하고, Hybond-N 나일론 막(Amersham)에 블롯팅하였다. RNA의 동일한 로딩을 보증하기 위해, 겔을 전기영동 후에 에티디움 브로마이드로 염색하였다. 막 필터에 RNA가 완전히 옮겨졌는지를 확인하기 위해, 겔 및 막 양자를 옮긴 후에 UV 광 하에서 관찰하였다. 필터를 ³²P-표지된 사과 과일 성숙 (apple-fruit-ripening) 관련 유전자 특이적 cDNA 프로브와 혼성화하였다. 상기 블롯을 이전에 기재된 바와 같이 세정하고 (Kim et al., 2001, Plant Science 161, 1145-1152), Kodak XAR-5 필름 및 intensifying screen을 이용하여 -80 $^{\circ}$ C에서 자기방사법(autoradiography)에 의해 관찰하였다.
- <40> 4. 게놈 DNA의 분리 및 서던 블롯 분석
- <41> 사과 잎 게놈 DNA를 이전에 기재된 바와 같이 분리하였다 (Kim et al., 2001, Plant Science 161, 1145-1152). 사과 게놈 DNA (레인당 10 μ g)을 BclI, EcoRI 또는 SpeI 으로 절단하고, 0.7% 아가로스 겔 상에서 전기영동에 의해 분리하고, Hybond-N 나일론 막 필터 (Amersham, Buckinghamshire, UK)에 블롯팅하였다. 상기 필터를 Kim et al. (2001)에 기재된 바와 같은 통상적인 혼성화 및 세정 조건 하에 ³²P-표지된 pMdHPT1 cDNA 클론으로 혼성화하였다.
- <42> 5. 토코페롤 분석
- <43> 토코페롤을 핵산 (용매 A), 메틸-t-부틸 에테르 (용매 B) 구배로 용출하는 정상 (normal phase) HPLC에 의해 분리하였다; 구배 조건(0-10 min, 90% [v/v] A 및 10% [v/v] B; 11 min, 25% [v/v] A 및 75% [v/v] B; 및 12 min, 90% [v/v] A 및 10% [v/v] B), 주입 부피 20 μ l, 유속 1.5 mL/min, 및 런 타임 (run time) 12 min (40 $^{\circ}$ C).

토코페롤 농도 및 조성을 Chemstation software (Agilent Technologies)를 이용하여 α -, β -, γ -, 및 δ -토코페롤에 대한 표준곡선에 기초하여 계산하였다.

<44> Synechocystis sp. PCC 6803 시료를 후기 대수성장기에서 원심분리에 의해 수확하였다. 1g의 0.1-mm 마이크로비드 (Biospecifics Technologies Corp., Lynbrook, NY) 및 500 μ l의 에탄올 중의 1% (w/v) 피로갈롤 (pyrogallol) (Sigma)을 1mL의 배양물로부터의 세포 펠렛에 첨가하였다. 혼합물을 비드비터 (beadbeater)에서 1분 동안 교반하였다. 추출물을 오토샘플러 튜브 내로 여과하였다 (0.2 μ m Gelman PTFE acrodisc, 13-mm 시린지 필터, Pall Gelman Laboratory Inc.). HPLC를 Hewlett-Packard HPLC (Agilent Technologies)를 이용한 형광 검출을 이용하여 4.6 x 250 mm (5 μ m)의 Zorbax 실리카 HPLC 칼럼 상에서 수행하였다. 시료 여기는 290 nm에서, 방출은 336 nm에서 모니터링하였다.

<45> 실시예 1: 후지 사과에서 MdHPT1 유전자의 클로닝

<46> MdHPT1 유전자는 총 1561 bp로 이루어져 있으며, 이 중 37 bp는 5' UTR, 303 bp는 3' UTR 을 이루고 있다. MdHPT1 단백질을 암호화하고 있는 CDR 부위는 1221 bp의 염기로 이루어져서 407개의 아미노산을 암호화하고 있다. MdHPT1 단백질은 기존에 알려진 포도 (Vitis vinifera; GenBank accession No. AY826350), 알팔파 (Medicago sativa; GenBank accession No. AY714983), 아라비도시스 (GenBank accession No. AY089963), 보리 (Hordeum vulgare; GenBank accession No. AY222860), 벼 (Oryza sativa cv. japonica; GenBank accession No. AY222862), 및 밀 (Triticum aestivum; GenBank accession No. AY222861)의 homogentisate prenyltransferase (HPT)와는 46-71%의 아미노산 서열의 상동성을 보여준다. 특히, 사과와 같은 원예작물인 포도의 HPT와 가장 높은 상동성을 보이고 있으며 (71%), 반면에 단자엽에서 동일한 기능을 수행하는 homogentisic acid geranylgeranyl transferase (HGGP) 단백질들과는 상대적으로 먼 유연관계를 보여준다. MdHPT1에는 UbiA (prenyltransferase) 도메인이 잘 보존되어 있으므로 아미노산 서열상으로도 이 단백질이 HPT의 기능을 할 수 있을 것이란 사실을 예상할 수 있으며, 다른 HPT 단백질들과 마찬가지로 가상적인 엽록체 표적 서열 (putative chloroplast target sequence)을 단백질 앞 부분에 가지고 있는 것으로 나타났다.

<47> 실시예 2: MdHPT1 유전자의 서던 및 노던 분석

<48> 후지 사과의 게놈에 MdHPT1 유전자가 몇 카피 존재하는지 알아보기 위하여 서던 블롯 분석을 수행한 결과, 두 개의 major band와 한 개의 minor band를 검출할 수 있었다. 이러한 결과는 후지 사과 haploid 게놈에는 2개 또는 3개의 MdHPT1 유전자가 존재할 수 있음을 의미하는 결과라 할 수 있다. 그러나 본 실험에서 사용한 프로브가 HPT와 비슷한 생화학적 반응을 수행하는 단백질에서도 보존되어 있는 UbiA (prenyltransferase) 도메인을 포함하고 있으므로 MdHPT1 이외의 유전자가 검출되었을 가능성도 배제할 수 없다.

<49> 노던 블롯 분석에서는 MdHPT1 유전자가 잎과 꽃에서 많이 발현되는 반면, 과일에서는 아주 적은 양만 발현되고 있음을 보여준다. 이러한 결과는 사과 과일에 토코페롤 함유량이 토마토 등의 다른 과일에 비해 낮다는 사실과 일치한다고 할 수 있다. 따라서 MdHPT1을 사과 과일에서 과다발현 시킨다면 그 효과를 극대화 할 수 있는 가능성을 확인할 수 있다.

<50> 실시예 3: MdHPT1의 생체 내에서의 실제 활성 조사

<51> MdHPT1의 생체 내에서의 실제 활성을 알아보기 위해서 광합성 세균인 Cyanobacteria (Synechocystis sp. PCC 6803)에서 비타민 E의 양을 HPLC로 측정하였다 (도 5). 도 5의 상단 그래프는 정상적인 세균이 만들어내는 비타민 E를 분석한 것이고, 중간 그래프는 세균의 HPT 유전자를 제거해서 비타민 E를 만들지 못하도록 한 돌연변이 세균의 비타민 E를 분석한 것이며, 하단 그래프는 이 돌연변이 세균에 MdHPT1 유전자를 발현시킨 것이다. 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 비타민 E를 만들지 못하도록 한 돌연변이 세균에 MdHPT1 유전자를 발현시킨 결과, 다시 비타민 E가 만들어지는 것을 확인함으로써 MdHPT1이 비타민 E 합성에 관여하고 있음을 알 수 있었다.

<52> 실시예 4: MdHPT1 유전자를 포함하는 식물 발현 벡터 제조

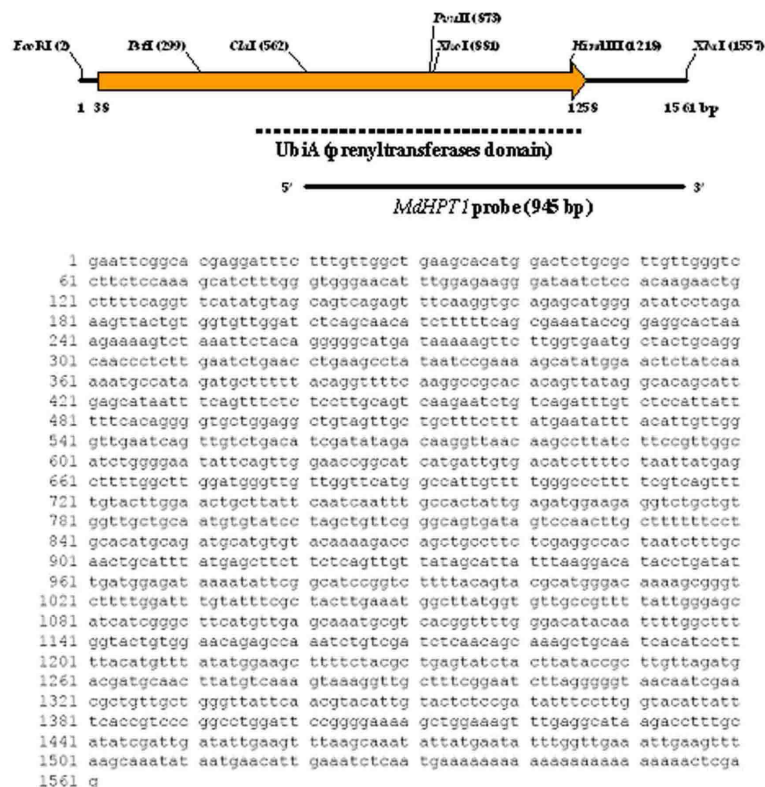
<53> MdHPT1 유전자를 식물체 내에서 과다발현 시켜 기능성 식물/과일을 얻음과 동시에 식물체 내에서 단백질의 기능과 토코페롤의 역할을 더욱 깊이 연구하는 목적에 이용하기 위해, MdHPT1 cDNA를 pBI121 바이너리 벡터의 BamHI와 SacI 제한효소 절단부위 사이에 넣어 클로닝 하였다. pBI121 벡터는 형질 전환된 식물 세포를 선별할 수 있도록 카나마이신 저항성 마커를 가지고 있다. 완성된 벡터는 MdHPT1 cDNA의 5' 끝 쪽에 과다발현을 위한 CaMV 35S 프로모터를 가지고 있으며 3' 끝 쪽에는 전사 종결 서열인 노팔린 신타아제 유전자를 가지고 있다.

도면의 간단한 설명

- <54> 도 1은 *MdHPT1* 유전자의 염기서열을 분석한 그림이고,
- <55> 도 2는 *MdHPT1* 단백질의 아미노산 서열을 분석한 그림이고,
- <56> 도 3은 *MdHPT1*의 도 1에 표기된 cDNA 3' 부분의 탐침을 이용한 사과 게놈 DNA의 서던 블롯 분석을 보여 주는 전기영동 사진으로서, *Bcl* I, *Eco*R I, 그리고 *Spe* I 을 처리한 것이다.
- <57> 도 4는 조직 특이적, 과일 발생 특이적으로 발현되는 *MdHPT1* mRNA 발현을 노던 블롯 분석한 그림(상단 패널)으로서, Leaf(잎), Flower(꽃), Fruit setting(과일 발달 초기), unripened fruit(익지 않은 과일), full-ripened fruit(완전히 익은 과일)이고, 중간 패널은 완전히 익은 과일에서 많이 발현되는 에틸렌 생합성 유전자인 MD-ACO1 mRNA 발현을 나타낸 것이며, 하단 패널은 블롯팅하기 전 전체 RNA를 전기영동한 후, 에티디움 브로마이드로 염색한 사진이다.
- <58> 도 5는 *MdHPT1*의 생체 내에서의 실제 활성을 알아보기 위해서 광합성 세균인 *Cyanobacteria* (*Synechocystis* sp. PCC 6803)에서 비타민 E의 양을 HPLC로 측정한 결과이다. 상단 그래프는 정상적인 세균이 만들어내는 비타민 E를 분석한 것이고, 중간 그래프는 세균의 HPT 유전자를 제거해서 비타민 E를 만들지 못하도록 한 돌연변이 세균의 비타민 E를 분석한 것이며, 하단 그래프는 이 돌연변이 세균에 *MdHPT1* 유전자를 발현시켜 비타민 E를 분석한 것이다.
- <59> 도 6은 *MdHPT1* 유전자를 식물체 내에서 발현시키기 위한 재조합 벡터의 구조를 나타낸 것이다.

도면

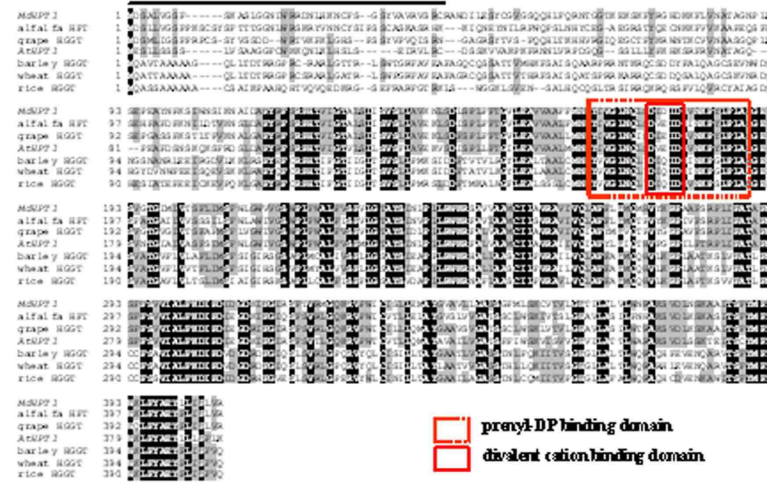
도면1



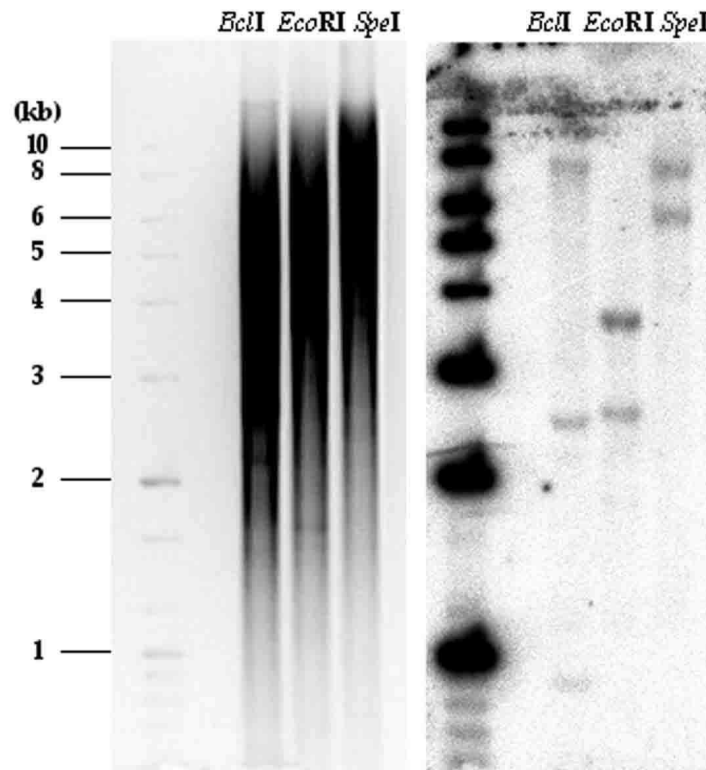
도면2

```

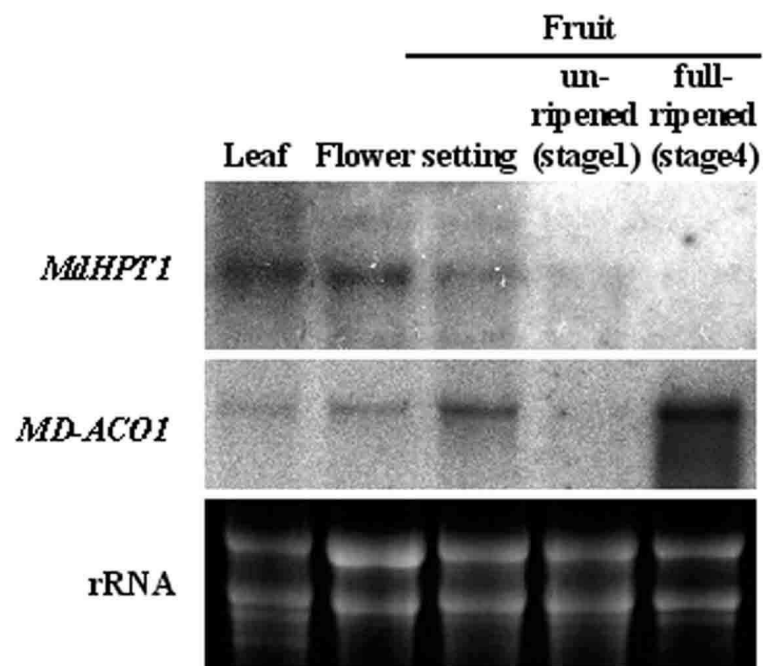
1 MDSALVGSFS KASLGNIWR RDNLHKNCFS GSYVAVRVSR CRAWDILESY CGVGSQQHLF
61 QRNTGGTKEK SKFYRGHDKK FLVNATAGNP LESEPEAYNP KSIWNSIKNA IDAFYFESRP
121 HTVIGTALSI ISVSLAVKN LSDLSPLFFT GVLEAVVAAF FMNIYIVGLN QLSDDIDIDKV
181 NKPYLPLASG EYSVGTGIMI VTSFLIMSFV LGWVVGSWPL FWALFVSFVL GTAYSINLPL
241 LRWKRSAVVA AMCILAVRAV IVQLAFFLHM QMHVYKRPAA FSRPLIFATA FMSFFSVVIA
301 LFKDIPDIDG DKIFGIRSET VRMGQKRVFW ICISLLEMAY GVAULLGASS GFMLSRCVTV
361 LGHTILALVL WNRKASVDLN SKAAITSFYM FIWKLFYAEY LLIPLVR
    
```



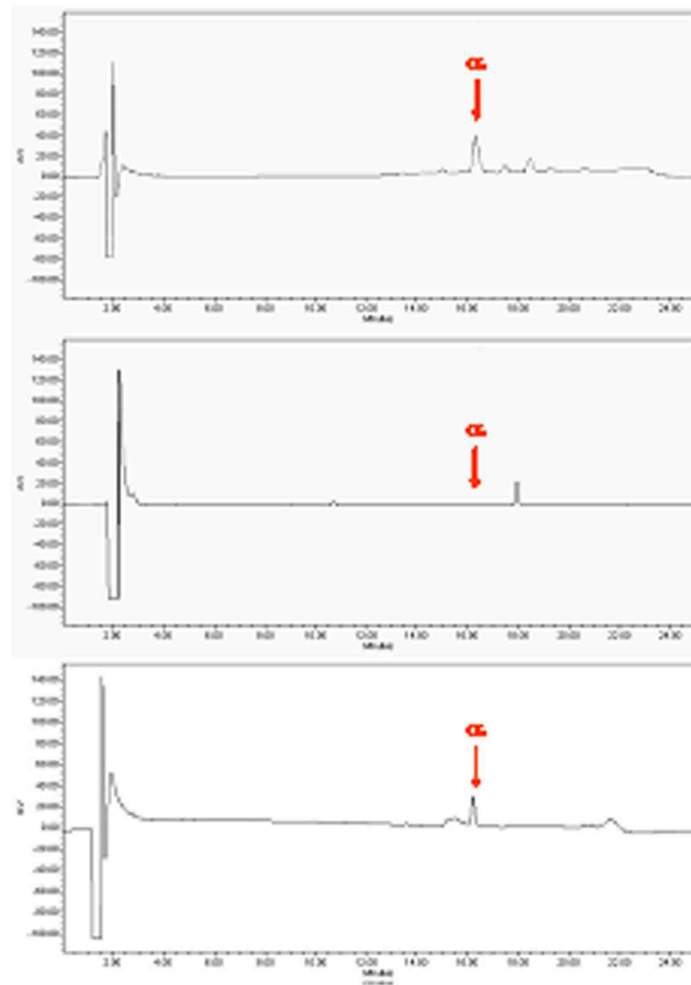
도면3



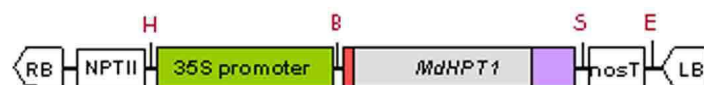
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> MdHPT1 gene involved in vitamin E biosynthesis of Fuji apple

<130> PN08111

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1561

<212> DNA

<213> Malus domestica Borkh. cv. Fuji

<400> 1

gaattcggca cgaggatttc ttgtttggct gaagcacatg gactctgcgc ttgttgggtc 60

ctttccaaa gcatctttgg gtgggaacat ttggagaagg gataatctcc acaagaactg 120

cttttcaggt tcatatgtag cagtcagagt ttcaagggtc agagcatggg atatcctaga 180

aagttactgt ggtgttggat ctcagcaaca tctttttcag cgaaataccg gaggcactaa 240

agaaaagtct aaattctaca gggggcatga taaaaagtgc ttgttgaatg ctactgcagg 300

caacctctt gaatctgaac ctgaagccta taatccgaaa agcatatgga actctatcaa 360

aaatgccata gatgcttttt acaggttttc aaggccgcac acagttatag gcacagcatt 420

gagcataatt tcagtttctc tccttgcagt caagaatctg tcagatttgt ctccattatt 480

tttcacaggg gtgctggagg ctgtagttgc tgctttcttt atgaatattt acattgttgg 540

gttgaatcag ttgtctgaca tcgatataga caaggttaac aagccttata ttccgttggc 600

atctggggaa tattcagttg gaaccggcat catgattgtg acatcttttc taattatgag 660

cttttggctt ggatgggttg ttggttcatg gccattgttt tgggcccttt tcgtcagttt 720

tgtacttggga actgcttatt caatcaattt gccactattg agatggaaga ggtctgctgt 780

ggttgcgtca atgtgtatcc tagctgttcg ggcagtata gtccaacttg ctttttctt 840

gcacatgcag atgcatgtgt acaaaagacc agtcgccttc tcgagggcac taatctttgc 900

aactgcattt atgagcttct tctcagttgt tatagcatta ttttaaggaca tacctgatat 960

tgatggagat aaaatattcg gcatccggtc ttttacagta cgcatgggac aaaagcgggt 1020

cttttgatt tgiatttcgc tacttgaaat ggcttatggt gttgccgttt tattgggagc 1080

atcatcgggc ttcatgttga gcaaatgcgt cacggttttg ggacatacaa ttttgctttt 1140

ggtactgttg aacagagcca aatctgtcga tctcaacagc aaagctgcaa tcacatcctt 1200

ttacatgttt atatggaagc ttttctacgc tgagtatcta cttataccgc ttgttagatg 1260

acgatgcaac ttatgtcaaa gtaaagggtt ctttcggaat cttagggggg aacaatcgaa 1320

cgctgttgct gggttattca acgtacattg tactctccga tatttccttg gtacattatt 1380

tcaccgtccc ggcctggatt ccggggaaaa gctggaaagt ttgaggcata agacctttgc 1440

atatcgattg atattgaagt ttaagcaaat attatgaata tttggttgaa attgaagttt 1500

aagcaaatat aatgaacatt gaaatctcaa tgaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaactcga 1560

g 1561

<210> 2
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Malus domestica Borkh. cv. Fuji

<400> 2
 Met Asp Ser Ala Leu Val Gly Ser Phe Ser Lys Ala Ser Leu Gly Gly
 1 5 10 15

Asn Ile Trp Arg Arg Asp Asn Leu His Lys Asn Cys Phe Ser Gly Ser
 20 25 30

Tyr Val Ala Val Arg Val Ser Arg Cys Arg Ala Trp Asp Ile Leu Glu
 35 40 45

Ser Tyr Cys Gly Val Gly Ser Gln Gln His Leu Phe Gln Arg Asn Thr
 50 55 60

Gly Gly Thr Lys Glu Lys Ser Lys Phe Tyr Arg Gly His Asp Lys Lys

65	70	75	80
Phe Leu Val Asn Ala Thr Ala Gly Asn Pro Leu Glu Ser Glu Pro Glu	85	90	95
Ala Tyr Asn Pro Lys Ser Ile Trp Asn Ser Ile Lys Asn Ala Ile Asp	100	105	110
Ala Phe Tyr Arg Phe Ser Arg Pro His Thr Val Ile Gly Thr Ala Leu	115	120	125
Ser Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Ala Val Lys Asn Leu Ser Asp Leu	130	135	140
Ser Pro Leu Phe Phe Thr Gly Val Leu Glu Ala Val Val Ala Ala Phe	145	150	155
Phe Met Asn Ile Tyr Ile Val Gly Leu Asn Gln Leu Ser Asp Ile Asp	165	170	175
Ile Asp Lys Val Asn Lys Pro Tyr Leu Pro Leu Ala Ser Gly Glu Tyr	180	185	190
Ser Val Gly Thr Gly Ile Met Ile Val Thr Ser Phe Leu Ile Met Ser	195	200	205
Phe Trp Leu Gly Trp Val Val Gly Ser Trp Pro Leu Phe Trp Ala Leu	210	215	220
Phe Val Ser Phe Val Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Ile Asn Leu Pro Leu	225	230	235
Leu Arg Trp Lys Arg Ser Ala Val Val Ala Ala Met Cys Ile Leu Ala	245	250	255
Val Arg Ala Val Ile Val Gln Leu Ala Phe Phe Leu His Met Gln Met	260	265	270
His Val Tyr Lys Arg Pro Ala Ala Phe Ser Arg Pro Leu Ile Phe Ala	275	280	285
Thr Ala Phe Met Ser Phe Phe Ser Val Val Ile Ala Leu Phe Lys Asp	290	295	300

Ile Pro Asp Ile Asp Gly Asp Lys Ile Phe Gly Ile Arg Ser Phe Thr
305 310 315 320

Val Arg Met Gly Gln Lys Arg Val Phe Trp Ile Cys Ile Ser Leu Leu
325 330 335

Glu Met Ala Tyr Gly Val Ala Val Leu Leu Gly Ala Ser Ser Gly Phe
340 345 350

Met Leu Ser Lys Cys Val Thr Val Leu Gly His Thr Ile Leu Ala Leu
355 360 365

Val Leu Trp Asn Arg Ala Lys Ser Val Asp Leu Asn Ser Lys Ala Ala
370 375 380

Ile Thr Ser Phe Tyr Met Phe Ile Trp Lys Leu Phe Tyr Ala Glu Tyr
385 390 395 400

Leu Leu Ile Pro Leu Val Arg
405

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HPT-1F primer

<400> 3
tayrtngtng gnhtnaayca

20

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HPT-1R primer

<400> 4
gcrtaraana rntccadat raa

23

