

발간등록번호

11-1543000-000144-01

고효율 형질전환 시스템을 통한 잔디 신품종 개발

(Development of new cultivars in turfgrass through transgenic technology utilizing high-efficiency transformation system)

제노마인(주) 첨단생명공학연구소

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고효율 형질전환 시스템을 통한 잔디 신품종 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 9월 25일

주관연구기관명 : 제노마인(주)

주관연구책임자 : 이 동 희

세부연구책임자 : 이 동 희

연 구 원 : 김 동 수

연 구 원 : 박 경 목

연 구 원 : 박 원 만

연 구 원 : 김 국 진

연 구 원 : 이 인 철

연 구 원 : 나 형 진

연 구 원 : 문 미 향

연 구 원 : 윤 혜 리

연 구 원 : 김 혜 경

연 구 원 : 김 예 진

연 구 원 : 장 현 숙

협동연구기관명 : 제주대학교

협동연구책임자 : 이 효 연

협동연구기관명 : 대구경북과학기술원

협동연구책임자 : 임 평 옥

요 약 문

I. 제 목

고효율 형질전환 시스템을 통한 잔디 신품종 개발

II. 연구개발의 목적 및 목표

연구개발의 최종 목표는 한국 자생 잔디인 들잔디(*Zoysia japonica*) 혹은 벤투그라스에 기능 검정된 유용 유전자를 도입하여 녹기 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성, 그리고 왜화 유도 등과 같은 우량 형질을 나타내는 잔디 형질전환체 개발에 있다. 이후 개발된 잔디 형질전환체의 분석을 통하여 우수 계통 2종을 선발하여 고부가 우량 잔디 신품종 개발에 적용할 것이다.

이를 위하여 본 연구팀은

- 1) 모델식물인 애기장대에서 녹기 연장, 스트레스 저항성 혹은 왜화 조절과 관련된 유용 유전자를 신규로 3종 발굴하여 기능 검정을 통하여 잔디 형질전환에 적용하고,
- 2) 기 확보 유전자 4종과 신규 유용 유전자 3종에 대하여 기 확립된 형질전환 시스템을 통하여 형질전환체를 생산하고자 한다(총 7종의 잔디 형질전환체 생산).
- 3) 생산된 형질전환체 7종을 대상으로 왜성, 녹기 연장, 환경 스트레스 저항성 형질에 대한 기능 분석을 실시하여 우량 잔디 형질전환체 3종을 선별하고,
- 4) 선별된 우량 형질전환체는 우량 계통선발을 거쳐 2종을 선별한 후 차후 고부가 잔디 신품종으로 육성하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 기능성 유전체 연구를 통한 잔디 품종 개발 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (3종)
 - 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 변이체로부터 녹기 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성 및 왜화 조절 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (3종)
 - 변이체 표현형 분석 및 분자·생리·생화학적 기능 조사
 - 유전자에 대한 애기장대 형질전환 loss-of-function, gain-of function 변이체 표현형 및 기능 분석
 - 애기장대 형질전환체에 대한 심화 생리·생화학적 분석
- 2) 유용 유전자가 도입된 잔디 형질전환체 생산 (7건)
 - 유용 유전자의 잔디 도입 및 형질전환체 개발 (7건)
 - 유용 유전자의 잔디 도입을 위한 vector construct 제작
 - 잔디 형질전환 실시

- 형질전환 잔디의 순화, 유전자 도입 및 발현 분석
- 형질전환체 생산

3) 생산된 형질전환체의 기능분석 (6건) 및 우수 계통선발 (최종 2건)

- 기능 분석을 통하여 우량 잔디 형질전환체 개발 (3건)
 - 형질전환 잔디의 가시적 표현형 분석 (총 6건)
 - 형질전환 잔디의 심화 기능 분석 (생리·생화학적 분석) (총 4건)
- 우수 형질 계통선발 (최종 2건)
 - 형질전환 잔디의 포장에서의 표현형 분석 (2건)
 - 우수 형질 잔디 계통선발 및 포장에서의 증식 (2건)

4) 특허 및 논문 등 지적 소유권 확보 (6건)

- 특허 출원 혹은 등록 3건
- 논문: 3건 (SCI급 국제학술지 2건, 기타 1건)

IV. 연구개발결과

연구개발의 최종 목표는 한국 자생 잔디인 들잔디(*Zoysia japonica*) 혹은 벤투그라스에 기능 검정된 유용 유전자를 도입하여 녹기 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성, 그리고 왜화 유도 등과 같은 우량 형질을 나타내는 잔디 형질전환체 개발에 있다. 이후 개발된 잔디 형질전환체의 분석을 통하여 우수 계통 2종을 선발하여 고부가 우량 잔디 신제품 개발에 적용하고자 한다.

주관기관인 제노마인(주)에서 확보하고 있는 유용 유전자 중 녹기 연장, 스트레스 저항성 혹은 왜화에 대한 표현형적 특징을 가지는 *ORE7*, *ATHG1*, *AtSIZ* 그리고 *AtGA2ox4*를 고부가 우량 잔디 형질전환체 개발에 적용하였으며, 또한 기능성 유전체 연구 등을 통하여 발굴된 유용 유전자 6종을 고부가 우량 잔디 형질전환체 개발에 적용하였다.

Advanced RAM approach를 통한 노화관련 변이체로부터 발굴한 *ATPG2*, *ATPG4*, 그리고 *ATPG8* 유전자 3종 모두는 녹기 연장과 생산성 증대에 대한 표현형적 특징을 제공함을 확인할 수 있었다. 이러한 유전자들은 *ORE7*과 마찬가지로 모두 AT-hook domain을 가지고 있었다. 우리는 기 발굴한 *ORE7*과 *ATHG1*, 그리고 신규 발굴한 유전자 3종의 기능 분석을 통하여 chromatin architecture 조절 기술에 대한 새로운 모델을 제시하였다. 제노마인(주)의 chromatin architecture 조절기술은 식물의 노화 진행 동안 chromatin의 안정성을 제공하여 식물의 생산성 증대 또는 노화 지연의 표현형적 특징을 나타내며, 이러한 표현형적 특징은 적용 유전자의 발현 레벨에 따른다는 것이다. 즉, 적용 유전자의 발현이 강하면 강할수록 노화 지연의 표현형이 강력하게 나타나고, 적용 유전자의 발현이 적정 수준을 유지하면 식물의 생산성 증대에 강력한 표현형적 특징을 제공한다. 이러한 기술을 통한 식물의 생산성 증대는 야생형과 비슷한 수확시기를 가진다는 점에서 본 기술이 작물의 생산성 증대에 대한 형질 제공에 있어 아주 강력할 것으로 판단된다. 한편 애기장대 activation tagging 변이체 pool에서 신규 발굴한 *DDF1* 유전자는 freezing tolerance에 우성으로 나타났으며 또한 dark-green 잎, 왜소 현상 그리고 늦은 개화와 같은 표현형적 특징을 제공하였다. 또한 기능성 유전체 연구를 통하여 *phyB* overexpressor의 기능을 가지

는 *ATHB23* 유전자를 발굴하였다.

본 연구팀은 기 확보 유전자 4종과 유용 유전자 3종, 그리고 신규 발굴한 유전자 3종을 고효율 잔디 형질전환 시스템을 통하여 8종의 잔디 형질전환체를 생산하였다. 이후 형질전환체의 분자생물학적, 생리·생화학적 분석을 통하여 5종의 우량 형질전환체를 개발하였다. ORE7-잔디 형질전환체는 녹기연장과 생산성 증대의 표현형적 특징을 가졌으며, 이러한 표현형적 특징은 본 유전자의 발현 정도에 따라 구분되었다. 즉 ORE7 유전자의 발현이 높으면 높을수록 녹기 연장에 대한 표현형질을, 그리고 적정 수준에서의 발현은 녹기연장과 더불어 tiller 형성 촉진과 같은 생산성 증대에 대한 농업형질을 나타내었다. 또한 *ATHG1*, *ATPG7* 그리고 *ATPG8* 유전자는 잔디에서 녹기 연장뿐 만 아니라 건조 스트레스 저항성에 대한 표현형적 특징을 제공하였다. 한편 AtSIZ-잔디 형질전환체는 염 스트레스뿐 만 아니라 가뭄 스트레스 저항성에 대한 표현형적 특징을 가지는 것으로 밝혀졌다. 본 연구팀은 고부가 우량 잔디 신제품 개발을 위하여, 상기 5종의 우량 잔디 형질전환체 중 ORE7-, 그리고 AtSIZ-잔디 형질전환체에서 우량 농업형질을 가지는 계통을 선발하여 포장 내 대량 증식을 진행 중에 있다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과 목표 및 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	특허		신제품				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭 등록	품종생 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	0						0	1	
	달성	1						1	0	
2차년도	목표	1						1		
	달성	3						0		
3차년도	목표	2						1		
	달성	1						1		
계	목표	3						2	1	
	달성	5						2	0	

2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011년 1월	Overexpression ~ ¹⁾	강홍규	임평옥	김준기 등	Plant Science	180: 634-641	국외	SCI
2013년 (accepted)	The homeodomain~ ²⁾	최현모	우혜린 임평옥	정수영 등	Physiologia Plantarum	accepted	국외	SCI

¹⁾Overexpression of *FTL1/DDF1*, an AP2 transcription factor, enhances tolerance to cold, drought, and heat stresses in *Arabidopsis thaliana*

²⁾The homeodomain-leucine zipper *ATHB23*, a phytochrome B-interacting protein, is important for phytochrome B-mediated red light signaling

3. 특허출원/등록 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011년 4월	식물의 ^{a)}	제노마인(주)	대한민국	10-2011-0038932					
2011년10월	식물의 ^{b)}	제노마인(주)	대한민국	10-2011-0110593					
2012년 4월	식물의 ^{c)}	제노마인(주)	대한민국	10-2012-0039113					
2012년 4월	ATPG8 ^{d)}	제노마인(주)	국제(PCT)	PCT/KR2012/002967					
2012년 10월	ATPG4 ^{e)}	제노마인(주)	국제(PCT)	PCT/KR2012/008798					

^{a)}식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{b)}식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{c)}식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{d)}ATPG8 Protein Providing Yield Increase and Delaying Senescence and Stress Tolerance of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use

^{e)}ATPG4 Protein Delaying Senescence and Providing Yield Increase and Stress Tolerance in Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Uses

4. 연구성과 활용 계획

연구 산물의 산업화는 녹기연장/생산성 증대의 ORE7 잔디와 스트레스 저항성 AtSIZ 잔디 형질 전환체를 중점적으로 실시할 예정이다. 두 형질전환체는 골프장 등에 주로 적용 가능하며, 또한 환경 스트레스 저항성 잔디 품종 개발은 불리한 환경 조건, 특히 염분이 많이 축적된 바닷가 토양 및 전체적인 온도가 낮은 고지대에 적용 가능하여 그 용도는 매우 높으리라 생각된다. 또한 신규 발굴한 유용 유전자의 경우, 녹기연장 및 스트레스 저항성에 대한 목표형질을 뚜렷이 제공하기에 기술사업화에 있어서 우선 대상이 될 것으로 판단한다.

이러한 연구 산물에 대한 기술사업화는 2 가지 방안으로 진행될 것이다. 첫 번째는 단기 전략으로 유전자 및 형질전환체에 대한 지적소유권에 대한 국내 기관 혹은 기업, 그리고 다국적 잔디 혹은 종자 회사로의 기술이전이다. 기술이전의 주요 대상은 국내 농업 활성화를 위하여 국내에 우선적으로 기술이전을 실시할 예정이며 이후 다국적 종자 회사인 Monsanto, Jacklin 종자 회사, Scotts Co. 등 미국과 유럽에 위치하고 있는 다국적 종자 회사를 대상으로 기술이전을 실시할 예정이다. 주관기관인 제노마인(주)의 다국적 기업과의 유용 유전자에 대한 기술이전 성공 사례는 본 사업에서 확보하는 우량 형질의 유전자 혹은 형질전환체에 대한 기술이전의 가능성을 보다 올려줄 것으로 판단된다.

본 연구 산물의 두 번째 산업화 방안은 확보한 유용 유전자 및 형질전환체에 대한 공동 사업화를 통한 우량 품종 개발에 대한 자체 사업화이다. 국외 기술사업화의 경우 대부분은 영양 생식 잔디의 수출이 용이하지 않은 관계로 종자 생산을 목적으로 하므로, 보다 장기 프로젝트를 추진해야 할 것으로 판단되며, 국내에서는 영양 생식 잔디 품종 개발이 가능하므로 단·중기 프로젝트로 추진할 예정이다. 대상으로는 삼성, 현대, LG 및 코오롱 등의 다수의 골프장을 보유하고 있는 대기업이 주 마케팅 대상이 될 것이다. 이러한 국내 기술사업화의 영역은 공동 연구를 통한 품종 개발, 그리고 이를 통한 공동 사업화 등의 형태가 주가 될 것이다.

SUMMARY

The research goal of this project is to develop transgenic turfgrass with desirable agronomic characteristics such as delayed leaf senescence, multiple stress resistance, and dwarf, through transgenic technology, for commercial purpose. A couple of candidate transgenic lines with high quality are then selected and examined in the field condition.

In this study, we generated transgenic turf grass lines with four genes (*ORE7*, *ATHG1*, *AtSIZ* and *AtGA2ox4*), which had been previously identified as key regulatory genes conferring delayed senescence, salt stress resistance, and dwarf phenotype. Efforts have also made identification of new 6 genes from *Arabidopsis* through plant functional genomics approach, where each gene has an potential in improving the quality of turfgrass. Among them, 4 genes were introduced into turfgrass.

We have initially screened Advanced RAM mutant pools for identifying genes controlling leaf senescence, stress responses or dwarfism. Further *in vivo* functional analyses revealed that the newly isolated novel genes (*ATPG2*, *ATPG4*, *ATPG8*) are critical for controlling senescence and productivity. Interestingly, all of genes contain AT-hook DNA binding motif, as shown in *ORE7*. These data along with the previous finding that *ORE7* affects chromatin architecture, provide an important molecular insight that delayed leaf senescence may be affected by the control of chromatin structure. Strikingly, degree of delayed senescence was found to be correlated with expression level of AT-hook family genes. For example, we observed that strong expression of genes encoding AT-hook proteins led to delay of whole developmental process exhibiting various developmental defects. This observation indicates that expression of AT-hook protein genes should be controlled in desirable manner, when applied to generation of transgenic crops. Alternatively, transgenic lines with optimum expression level of AT-hook genes should be selected, in order to improve crop yields. In addition to AT-hook family genes, we also isolated the *DDF* gene that can provide dwarfism, late flowering, and multiple stress resistance. We also identified *ATHB23* gene of *phyB* overexpressor.

We have introduced 8 useful genes into turfgrass through transgenic technology utilizing high-efficiency transformation system, and generated 5 transgenic turfgrass plants with good quality, which were verified by various functional analyses. Interestingly, *ORE7*-transgenic turfgrass displayed various phenotypes depending on *ORE7* expression level. One with higher expression of *ORE7* showed strong delayed leaf senescence, while the other one with rather lower expression exhibited increased biomass including high number of tillers, as well as delayed senescence. Transgenic turfgrass with *ATHG1*, *ATPG7* and *ATPG8* showed delayed leaf senescence and increased tolerance of drought. Furthermore, *AtSIZ* transgenic turfgrass exhibited a trait for the tolerance of salinity and drought stresses. We selected *ORE7*- and *AtSIZ*-transgenic turfgrass lines with a agronomically important traits for further analysis and are being cultivated through vegetative propagation.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	10
Chapter 2. Current R&D status in Korea and abroad	15
Chapter 3. Contents and results of the project	22
Chapter 4. Achievement and contributions	79
Chapter 5. Products and employment planning	84
Chapter 6. The R&D informations collected	88
during the project	
Chapter 7. References	91
[Appendix 1] Patent (PCT/KR2012/008798)	95
[Appendix 2] Patent (PCT/KR2012/002967)	116
[Appendix 3] Plant Science (2011) 180:634-641	133
[Appendix 4] Physiol Plant (2012) accepted	141

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	10
제 1 절. 경제·산업적 중요성 및 필요성	10
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	15
제 1 절. 국내외 기술개발 현황	15
제 2 절. 국내외 특허 현황	16
제 3 절. 선행연구 결과	17
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	22
제 1 절. 연구개발수행 내용 및 방법	22
제 2 절. 고부가 잔디 적용 유용 유전자 발굴	25
제 3 절. 유용 유전자 도입 잔디 형질전환체 개발	54
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	79
제 1 절. 목표달성도	79
제 2 절. 관련분야에의 기여도	82
제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획	84
제 1 절. 연구개발 성과	84
제 2 절. 성과활용 계획	86
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보	88
제 7 장. 참고문헌	91
[부록 1] 특허출원 (PCT/KR2012/008798)	95
[부록 2] 특허출원 (PCT/KR2012/002967)	116
[부록 3] 논문게재: Plant Science (2011) 180:634-641	133
[부록 4] 논문게재: Physiol Plant (2013) accepted	141

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 필요성

1. 기술의 기반성

최근 국가에서 강력하게 추진하고 있는 녹색기술의 활성화와 더불어 국민 소득의 증가로 인한 다양한 문화생활에 대한 만족도 등의 이유로 급격히 수요가 증가되고 있는 잔디는 축구장, 골프장, 공원 등의 레저 시설뿐만 아니라 도로 주변, 묘지, 하천 제방 등의 피복용으로, 그리고 주택 등의 조경용으로, 그 이용 범위는 광범위하며, 또한 토사 유출 방지, 소음 방지, 공해 방지 등의 기능적인 면까지 제공하고 있어 점진적으로 재배면적이 증가하고 있는 추세이다.

잔디는 단위면적당 생산단가가 타 작물에 비해 월등히 높은 고부가 경제 작물이며(작물 평균 323불/acre, 잔디 3,300불/acre, 2007 Census of Agriculture Data Release), 세계 4대 작물 중 하나인 옥수수 다음으로 시장 규모가 크다. 이러한 잔디 시장은 약 50조 원의 규모를 가지는 것으로 알려지고 있다. 미국의 경우, 잔디 시장 규모는 2002년 1,000백만 불에서 2007년 1,354억 불로 증가하였으며(그림 1), 최근의 TPI(Turfgrass Producers International) 자료에 의하면 2010년의 시장 규모가 2009년에 비하여 약 35%의 신장세를 가지는 것으로 나타났다. 그런 반면 우리나라의 경우, 2002년을 기준으로 잔디 산업 시장 규모는 약 7,500억 원이며 이중 잔디 생산업은 2,000억 원, 잔디 종자는 200억 원, 그리고 떼 생산은 650억 원으로 보고되고 있다(한국잔디학회, 2002년). 이러한 사실은 잔디 품종 개발이 매력적인 사업이며, 고부가 가치 창출이 가능한 사업이라 예측된다.

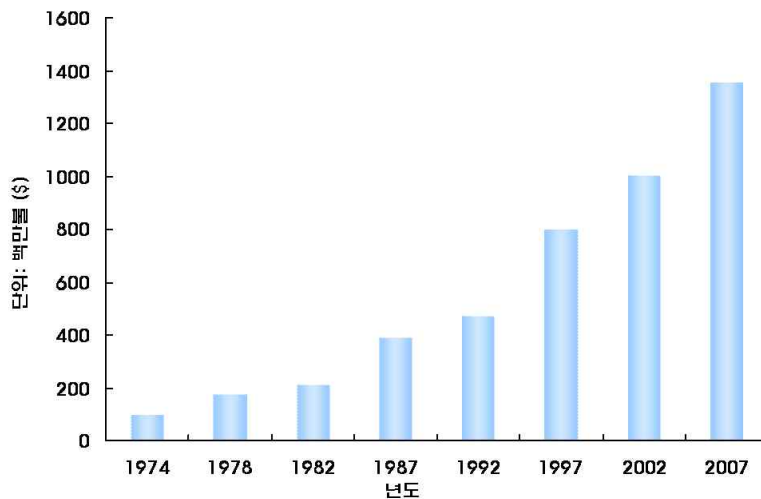


그림 1. Turfgrass comparison chat 1974 to 2007 in USA (2007 Census of agriculture data release, 2007)

이러한 시장 구조에 있어서 우리나라 잔디 생산 산업은 많은 부분을 잔디 수입에 의존하고 있으며 이러한 경제적 불균형은 국가 경제에 막대한 타격을 주고 있다. 일례로 연도별 한지형 잔디 수입 총량을 보면 1995년 약 80만 불에서 2004년 350만 불로 기하급수적인 증가세를 보이

는 것을 알 수 있다(그림 2). 이러한 수입에 의한 잔디 종자 생산 및 판매는 신품종의 보호와 권리에 관한 국제적 협약인 UPOV (international Union for the Protection of New Varieties of Plants) 제도의 2007년 시행으로 막대한 로열티 등을 지불해야 하는 불이익을 초래할 것이다. 대표적인 예로 외국 수입 잔디인 ‘제니스’, ‘미야코’ 등을 국내에서 생산·판매할 경우 로열티를 지불해야 될 우려도 있다. 이러한 수출입에 대한 불균형 비는 우량 잔디 품종 개발을 통하여 해소될 수 있으리라 판단된다. 외래종 잔디 품종의 수입은 국내 환경 및 여러 가지 제약에 의해 국내 품종화 하기에는 보다 많은 시간이 소요될 것인 반면, 국내에서 우량 품종을 개발하면 이러한 시간적 제약을 줄일 수 있을 것이며, 또한 표현형이 우수한 우량 품종의 개발은 국외 시장 개척에도 많은 장점을 제공할 것으로 판단된다. 이러한 상황에 맞춰 국내에서도 ‘일동중지’, ‘용천’, ‘밀록’ 등과 같은 잔디 신품종 개발에 박차를 가하고 있으나, 여전히 현대의 다양한 소비자의 요구를 완전히 충족시키지 못하는 실정이다. 따라서 생명공학 특히 식물 유전공학 기술의 발달로 여러 가지 기법들을 품종 개량에 적용할 수 있게 된 지금, 이러한 기술을 이용한 고부가 가치 잔디 품종 개발이 더욱 더 필요하리라 판단된다. 이러한 기법의 적용을 통한 잔디 품종의 우량화 및 다양화가 이루어지게 되면 향후 잔디관련 산업 발달로 인하여 재배농가 소득증대 및 잔디품종의 수입 대체 효과까지 누릴 수 있을 것이다. 그리고 이러한 형질전환을 통한 우량 잔디 품종 개발은 사업적 고부가 가치 및 국가 경쟁력 확보 등에 있어서 필수적인 요인으로 확신한다.

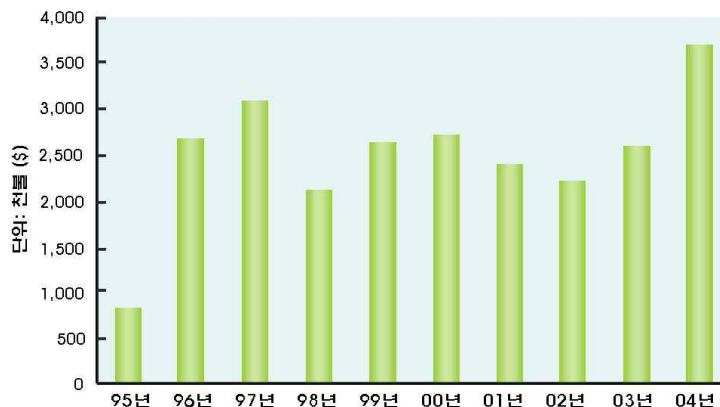


그림 2. 연도별 한지형 잔디 종자 총량 (관세청 무역통계 자료)

일반적으로 이러한 유전자 변형 작물 산업화의 기술적 요소는 유전자 발굴, 유전자 기능분석, 작물 형질전환, 이벤트 육성으로 제시할 수 있다. 최근 유용 표현형질을 지닌 유전자의 발굴 기법으로, 다량의 변이체를 생산하여 일차적으로 표현형 검정을 거쳐 이후 이들의 표현형 변화를 유발하는 원인이 되는 유전자를 다량으로 동정하는 기능성 유전체 연구가 유전자 발굴 및 기능 분석에 대한 핵심 기술로 대두되고 있다. 식물생명공학 산업 전반에 공헌할 수 있는 기반 기술인 식물 기능성 유전체 연구(functional genomics)는 식물에 내재하는 유전자의 발현을 인위적으로 조절하여 신 기능성 형질전환 식물을 창출하고, 이 기술을 대량으로 적용하여 원하는 형질의 식물체를 선발하거나, 신품종 개발 산업 등에 적용되고 있는 기반 기술이다. 본 연구팀 중 주관 기관인 제노마인(주)는 activation tagging, promoter trap 및 advanced RAM approach 등과

같은 다양한 기능성 유전체 연구를 통하여 우량 잔디 품종 개발에 기여할 수 있는 유용 유전자를 다량 확보하고 있다. 일부분을 소개하면 녹기 연장과 관련된 유전자로 *ORE7*, *ORE15*, *ATHG1*, *GSDL2* 등을, 스트레스 저항성과 관련된 유전자로 *AtSIZ*, 그리고 왜성 관련 유전자로 *PAPP5*의 TPR domain과 *AtGA2ox4* 등을 들 수 있다. 흥미로운 점은 녹기 연장과 관련된 유전자는 기능적 녹색형질의 지속에 대한 특정 형질을 가져 잔디, 특히 난지형 잔디의 지속적 녹색형질을 제공하는데 많은 장점이 있다는 것이다. 이와 같은 유용 유전자의 잔디 적용은 우량 품종 개발에 있어서 환경 스트레스 저항성 및 녹기 연장 표현형질 발현이라는 측면에서 기여도가 높을 것이라고 추측된다.

본 연구에서 개발하고자 하는 형질전환 잔디에는 복합 환경 스트레스 저항성, 녹기 연장, 왜화 조절 유전자 등의 목적 형질 유전자 이외에 비선택적 제초제 저항성 유전자가 선발마커로 도입되어 있는데, 제초제 저항성 GM 작물은 재배 관리상의 이점과 함께 농약사용량을 감소시키는 효과가 있다고 보고되어 있다(James C, ISAAA Briefs No 23). 이 보고에 따르면 비선택적 제초제 저항성 대두를 각 지역에서 3년간 시험 재배한 결과, 기존의 야생형 대두 재배 시에 비해 제초제 사용량을 25% 이상 감소시키는 효과를 가져왔으며 결과적으로 재배 3년째에는 약 47% 정도 경제적 이득이 증가하였다. 제주대학교의 제초제 저항성 들잔디의 포장 실험에서도 야생형 잔디에 비해 잡초방제 및 관리비용이 연차별로 감소하여 재배 3년째부터는 약 25% 이상의 농약사용량 및 관리비용이 절감됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 비선택적 제초제 저항성 유전자가 도입된 형질전환 잔디는 재배 관리 비용의 절감으로 인한 경제적 이득의 증가뿐만 아니라 제초제 사용량을 줄이는 효과도 있어 보다 환경친화적인 작물이 될 수 있음을 시사한다. 본 연구에서 개발하고 있는 고부가가치 형질전환 잔디는 제초제 저항성 유전자와 함께 복합 스트레스 내성, 왜성 조절 유전자 등이 도입되어 있으므로, 잔디 재배 관리 비용의 절감 및 경제적 이득 증가에 상승효과를 유발할 수 있을 것으로 보인다. 개발된 GM 작물은 환경위해성 평가를 통해 환경방출 승인을 얻어야만 상업적 재배가 가능한데 여기에서 가장 중요한 항목이 유전자 이동에 의한 주변생태계에 대한 영향이다. 제주대학교의 제초제 저항성 들잔디의 경우, 3m 이상의 거리에서는 야생형 잔디로의 유전자 이동 가능성이 거의 없는 것으로 나타났고, 같은 *Zoysia*속에 속하는 야생 잔디는 금잔디, 갯잔디 등 두 종에 불과할 뿐만 아니라 교배 가능성도 매우 낮은 것으로 확인되었다. 또한, 들잔디의 자연 상태에서의 발아율은 약 4% 이내로 타 작물에 비해 매우 낮으며, 자연 상태에서 발아하였을 경우, 우점잡초에 의해 생육이 억제되어 자연 소멸하는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과로부터, 본 연구에서 개발되는 형질전환 들잔디는 현재까지 환경방출 승인된 타 GM 작물보다 주변 자연환경이 미치는 영향이 매우 적을 것으로 보여 GM 작물의 환경 위해성 평가를 통과하는 데에는 큰 문제가 없을 것으로 판단하고 있다.

유전자 변형 작물 산업화의 기술적 요소의 두 번째인 작물 형질전환과 이벤트 육성에 있어서 협동기관인 제주대학교 이효연 교수 연구팀은 국내 들잔디 및 한지형 잔디인 벤투그라스의 형질전환 기법을 확립하고 있으며, 이를 통하여 ‘Transgenic zoysiagrass with reduced shade avoidance(7045680, 미국특허등록)’과 ‘식물 광수용체 파이토크롬의 고활성 돌연변이의 개발 및 이를 이용한 유전자 조작 식물 개발(국내 특허등록 : 10-0475211)’이라는 특허 등록을 완료하였으며, 현재 이에 대한 이벤트 평가가 안정성 평가 중에 있어 조만간 실용화에 접어들 것으로

판단된다. 상기에서 언급한 주관기관과 협동기관의 잔디 품종개발에 관한 기술력은 본 사업의 성공에 대한 초석이 될 것이다.

2. 기술의 핵심성

우량 잔디 품종을 개발하기 위해서는 먼저 내한성, 내건성, 내담성, 내서성 등과 같은 다양한 외부 환경 저항성 유전자 및 녹기연장의 표현형을 유발하는 노화 지연 등과 같은 내부 환경 저항성 유전자, 또한 잔디 관리의 편리성을 제공해 줄 수 있는 왜화 조절 유전자 등의 발굴과, 잔디 품종 개발에 있어 핵심 기술인 잔디 형질전환 기법의 확립이 관건이다.

본 연구팀은 앞선 연구에서 애기장대의 유전자를 잔디에 도입한 결과, 애기장대의 표현형이 잔디에서도 재현됨을 확인하였다. 애기장대 녹기연장 관련 유전자인 *ORE7*이 도입된 잔디에서 녹기연장 표현 형질을, 염 스트레스 저항성 관련 유전자인 *AtSIZ1*가 도입된 잔디에서 염 스트레스 저항성 표현 형질을, 그리고 왜화 관련 유전자인 *PAPP5*의 TPR domain이 도입된 잔디에서 왜화 표현 형질을 가지는 우량 잔디 형질전환체가 개발되었다. 이와 같은 선행연구는 본 사업을 통하여 우량 잔디 품종 개발이 가능하게 할 것이며, 또한 실용화에 있어서도 성공 가능성이 높을 것으로 사료된다.

따라서 본 과제는 다양한 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 애기장대의 변이체로부터 다양한 환경 저항성, 녹기 연장 및 왜화 조절과 관련된 신기능성 유용 유전자를 발굴하고, 잔디에서의 활용성을 연구하며, 기능 검정된 유용 유전자원을 잔디 품종 개발에 적용하여 다양한 환경 저항성, 녹기 연장 및 왜화 조절에 있어서 최적 형질을 가지는 신기능성 잔디 품종 개발을 목적으로 한다.

이러한 잔디 품종 개발에 있어서 다양한 환경 저항성 유전자, 녹기 연장 및 왜화 유도 유전자의 발굴 및 기능 검정은 다양한 잔디 품종 개발에 범용적 응용이 가능한 핵심 기술이다. 본 연구팀은 다양한 환경 저항성 잔디 품종 개발의 연구 추진 속도를 가속화하기 위하여 일차적으로 기 확보된 유용 유전자를 잔디 품종 개발에 적용하고자 하며, 보다 다양한 그리고 보다 강력한 표현형질을 가진 품종을 개발하기 위하여 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 변이체로부터 신규 유용 유전자를 발굴하고, 그 기능을 검정하여 신품종 개발에 적용하고자 한다.

잔디 형질전환 기술: 잔디의 품종 개발은 전통적인 육종 방법을 이용하고 있으나, 최근 분자생물학적 방법을 이용하여 신품종 개발이 시도되고 있다. 그러나 전체적으로 아직 잔디에 대한 안정적인 형질전환에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러나 본 연구팀은 한국의 자생 잔디인 들잔디 및 한지형 잔디인 벤토그라스를 이용하여 아그로박테리움을 매개로 한 고효율의 안정적인 형질전환 기법을 확립하였다. 이러한 아그로박테리움 매개 잔디 형질전환 기법은 본 과제 의 핵심기술이다.

기능성 유전체 연구를 통한 유용 표현형질 발현 시스템 발굴 기술:

- 녹기 연장 조절 유전자: 식물의 노화는 세포나 조직을 죽음으로 이르게 하는 마지막 발달 단계로서, 작물의 생산성, 과일 및 화훼류의 저장성, 수송 과정, 수확기 조절 등에 관여하는 결정적 유전요인이다. 이러한 노화 조절 기술은 녹기 연장을 유발하며, 스트레스에 대한 내성 강화

에도 응용이 가능한 핵심기술이다.

- 환경 스트레스 저항성 유전자: 다양한 외부 환경 스트레스는 식물의 생장 및 발달을 조절하는 중요한 환경요인으로서, 작물의 생산성 조절 등에 관여하는 결정적 환경요인이다. 이러한 환경 스트레스 조절 기술은 작물의 안정적 생산에 직결되어 있으며, 이러한 스트레스 조절 기술은 품종 개발에 있어 적용이 가능한 핵심 기술이다.

- 광 신호전달/개화 조절 유전자: 빛은 식물의 발달을 조절하는 중요한 환경요인으로서, 이에 영향을 받는 중요한 식물의 발달과정 중 하나가 광주기 변화에 의해 계절을 인식함으로써 개화 시기가 조절되는 현상이다. 이러한 개화 시기의 조절은 작물의 안정적 생산성에 직결되어 있으며, 따라서 관련 조절 기작의 이해와 유전자의 분리는 그 중요성이 크게 대두되고 있다. 또한 광 신호전달 관련 유전자의 조절에 의해 제공되는 왜화 유도 표현형은 품종 관리에 대한 편리성을 제공할 수 있는 핵심 기술이 될 것이다.

- 주관기관인 제노마인(주)는 국외 major 종자회사인 BASF와 녹기 연장 유전자와 환경 스트레스 저항성 유전자 2종에 대한 기술이전 계약을 실시하였다(2009년 12월). 이러한 기술이전에 대한 실적은 본사가 확보하고 있는 유전자의 잠재 가치를 인정하는 것이며, 또한 유전자의 기술사업화에 대한 노하우를 확보하는 것으로, 본 사업의 연구 산물인 유전자 혹은 잔디 신품종에 대한 사업화에 있어서 많은 장점을 제공할 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내외 기술개발 현황

국내외 잔디의 품종 개발은 전통적인 육종 방법을 이용하고 있으나, 최근 분자생물학적 방법을 이용하여 신품종 개발이 시도되고 있다. 그럼에도 불구하고 전 세계적으로 벤투그라스 등 극히 몇몇 품종에서만 형질전환의 성공 사례가 보고되고 있을 뿐 아직 잔디에 대한 안정적인 형질전환에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 잔디 품종 개발에 있어서 유용 유전자 삽입이 가능한 형질전환 기법은 전 세계적으로 공통적인 기술 적용의 범위이며, 국내외에서 가지는 유전자 변형 작물에 대한 문제는 최근 안정성 평가 등의 방법을 통하여 부분적으로 해결되고 있는 실정이다. 따라서 이와 같은 유전자 변형 작물 문제 해결 능력은 이후 보다 좋은 품질의 신 기능성 우량 잔디 품종 개발에 크게 이바지할 것이며, 이러한 예측은 형질전환을 통한 잔디 신품종 개발에 있어서 보다 많은 기회를 제공할 것이다.

최근 국외 잔디 품종 개발에 있어서 거의 대부분은 기능성 신품종 개발 쪽으로 방향성을 잡고 품종 개발에 집중하고 있다. 특히 제초제 저항성 잔디 개발이 가장 보편화된 기술 개발로 들 수 있으며, 최근 표현형이 확실한 우량 잔디 품종, 예를 들면 왜성 잔디 품종, 다양한 biotic 그리고 abiotic 스트레스 저항성 잔디 개발에 많은 투자를 하고 있는 실정이다.

국내의 경우, 건희, 건우 세녹, 안양중지 품종 등과 같이 교배를 통한 품종 개발이 초기에 주를 이루었으며, 최근까지도 ‘일동중지’, ‘용천’, ‘밀룩’ 등 교배에 의한 신품종 개발이 주를 이루고 있다. 최근 협동연구기관인 제주대의 제초제 저항성 들잔디 품종 개발, 금호연구소의 음지내성 품종 개발, 삼성 잔디환경연구소의 형광 잔디 개발 등과 같은 형질전환 기술을 통한 우량 품종 개발에 많은 노력을 기울이고 있는 중이다.

세계적으로 보면, 잔디 품종 개발의 많은 부분이 형질전환 기술을 통한 유전자 변형 잔디 품종 개발에 집중하고 있으며, 특히 제초제 저항성, biotic/abiotic 스트레스 저항성 등과 같은 기능성 잔디 품종 개발에 집중하고 있다. 또한 잔디 관리의 편리성을 제공하는 크리핑 벤투그라스의 기능성 품종 개발에도 많은 연구를 집중시키고 있는 중이다. 이러한 품종 개발에 대한 동향 및 사례를 아래 Table 1에서 제시하였다.

식물의 녹기 연장 및 다양한 환경 스트레스 조절은 생물학적 중요성뿐만 아니라 작물의 생산성 조절 가능성 때문에 많은 생리학적, 생화학적 연구가 수행되어 왔으며 유전학적, 분자생물학적 연구는 최근 수년 사이에 많이 진행되고 있다. 최근 많은 연구팀들이 식물의 녹기 연장 및 다양한 환경 스트레스 조절 관련 유용 유전자를 이용한 생산성 증대 및 기능 강화 신품종 혹은 신기능성 작물의 개발에 연구를 집중하고 있으며, 최근 애기장대 유전자를 통한 우수 작물 개발을 여러 연구팀이 시도하고 있는 중이다.

애기장대에서 발굴한 유용 유전자의 고부가가치 작물 개발에 대한 적용은 다양한 작물에서 알려지고 있다. 애기장대 *PHYB* 유전자 도입으로 감자에서 광합성 효율 및 기공의 conductance 증가를 유발하여 high intensity 조건하에서 tuber number 및 yield의 증가가 유발되었으며 이러한 표현형을 가진 고부가 형질전환 감자 품종 개발에 집중하고 있다(Boccalandro *et al.*, 2003). 또

한 미국의 Texas Tech. Univ.와 Univ. of California Davis 연구팀은 애기장대의 vacuolar sodium/proton antiporter 유전자인 *AtNHX1*을 면화에 도입하여 salt stress에 대한 저항성뿐만 아니라 필드에서 보다 양질의 fiber 생산량 증가 표현형을 가지는 우수 면화 품종 개발에 집중하고 있다(He *et al.*, 2005).

Table 1. 식물 유전공학 기법을 이용한 잔디 품종 개발에 대한 동향

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 Rutgers 대학, Monsanto사, Scott사	왜소형 형질전환 잔디 개발 (크리핑 벤투그라스)	판매 준비 중
Monsanto 사	제초제 저항성 잔디 품종 개발	마지막 승인 절차 준비 및 판매 준비 중
중국 Zhejiang 대학	제초제 저항성 버뮤다 잔디 품종 개발	형질전환 성공 및 품종 개발
미국 캔사스 주립대학	크리핑 벤투그라스에서 T-DNA 융합의 특성 분석	연구 진행 중
제주대학교	제초제 저항성 잔디 품종 개발	품종의 안정성 평가 중
금호연구소, 제주대학교	음지 내성형 제초제 저항성 잔디 품종 개발	애기장대 유전자의 잔디 적용 가능성 제시

그러나 전체적으로 잔디의 품종 개량에 대한 애기장대 유용 유전자의 적용은 아직 미미한 실정이다. 최근 국내에서 송필순 박사 연구팀은 애기장대 유전자인 *phyA*를 잔디에 도입하여 음지 내성형 고부가 잔디 품종 개발에 집중하고 있다. 또한 본 연구팀은 애기장대 유전자인 *ORE7*을 통한 녹기연장 잔디 형질전환체 개발, *AtSIZ*를 통한 염 스트레스 저항성 잔디 형질전환체 개발, 그리고 *PAPP5*의 TPR domain을 통한 왜화 잔디 형질전환체 개발을 성공하였다. 이는 애기장대 유전자 도입을 통한 잔디 품종 개발의 성공 가능성을 제시해주고 있는 중요한 연구 사례인 것으로 판단된다.

제 2 절. 국내외 특허 동향

국민 소득이 증가함과 함께 문화생활에 대한 만족도 등의 이유로 최근 급격히 수요가 증가되고 있는 잔디는 세계 4대 작물 중 하나인 옥수수 다음으로 시장 규모가 크다. 이러한 잔디 품종 개발에 대한 국내외 특허는 2007년 신품종의 보호와 권리에 관한 국제적 협약인 UPOV(international Union for the Protection of New Varieties of Plants) 제도의 실행으로 관련 연구에 대한 관심과 기대가 급증하여 활발한 기술개발을 수행하여 관련 특허 건수가 급증하고 있는 추세이며 특허의 내용은 주로 제초제 저항성 등 1세대 유전자 변형 잔디개발이 많은 부분을 차지하고 있으며 최근 녹기 연장, 스트레스 저항성 등 제 2세대 유전자 변형 잔디 품종에 대한 주를 이루고 있다. 하지만 국내의 경우, 여전히 잔디 신품종 개발에 있어서 전통 육종에 의한 품종 개발이 주류를 이루고 있는 실정이다. 최근 본 연구팀의 이효연 교수 연구팀이 제초제 저항성 잔디 및 *phyA*를 이용한 유전자 변형 잔디 우량 품종 개발을 수행하고 있으나 여전히 유전자 도입을 통한 잔디 신품종 개발에 대한 특허는 제한적인 실정이다.

한편 유전자의 특허 현황을 보면 유전자 기술 분야에서 resistance와 protein and oil enhancement 분야가 다소 기복을 보이거나 타 기술에 비해 특허 활동이 활발한 것으로 분석되며, resistance는 소분류로 내병성·내염성·내건성·내한성·제초제 저항성을 포함하며 90년대 후반까지 증감의 변동을 보이다가, 최근 급속히 증가하는 추세를 보였다. 녹기 연장에 대한 특허 출원은 작물의 생산성과 맞물려 최근 급속히 증가하는 추세이다.

이러한 특허 출원 동향을 분석해 보면, 먼저 잔디 신제품 개발에 있어서 형질전환체에 대한 특허 출원 및 등록 건수가 지극히 적음을 알 수 있다. 한편 유전자에 있어서 스트레스 저항성에 대한 특허 건수가 많은 반면 상대적으로 녹기 연장에 대한 특허 건수는 제한적인 것으로 나타났다.

녹기 연장, 스트레스 저항성 등과 같은 유용 유전자를 활용한 잔디 신제품 개발은 다양한 유전자원 중 표현형적 특징이 강한 유전자를 선별할 수 있다는 점에서 그 가치가 보다 높을 것으로 판단된다. 따라서 녹기 연장, 스트레스 저항성 유전자 발굴을 통한 잔디 신제품 개발은 고부가 창출에 있어서 보다 많은 가치를 가지는 것으로 나타나, 본 사업에서는 녹기 연장 유전자 및 스트레스 저항성, 특히 녹기 연장 관련 유전자의 발굴에 집중하고 이를 통하여 우량 잔디 신제품을 개발하고자 한다. 발굴 및 개발된 유전자, 형질전환체는 국내외적으로 특허출원을 통하여 지적소유권을 확보할 것이다. 이러한 지적 소유권의 확보는 잔디 신제품 개발에 있어 원천기술에 대한 국가 경쟁력 강화에 일조하며, 이를 통해 개발되는 우량 잔디 신제품은 고부가 수익 창출로 인한 국가 농업 발전에 기여할 수 있을 것이다.

제 3 절. 과제의 기술과 관련된 본 연구팀의 선행연구 결과

1. 기능성 유전체 연구 및 잔디 품종 개발 적용 유전자 확보 (주관기관)

제노마인(주)는 식물의 기능성 유전체 연구를 통하여 농업에 직접 이용 가능한 유용 기능성 유전자의 대량 발굴을 수행하고 있으며, 여기에 gene expression profiling 기법인 plant proteomics를 접목하여 유전자의 기능을 효율적으로 밝히고 있는 중이다. 선행 연구를 통해서 *ORE7*, *AtSIZ*, 그리고 *PAPP5*의 TPR domain에 대한 잔디 형질전환체 개발에 성공하였으며 최근 연구에서 발굴된 잔디 품종 개발에 적용 가능한 유용 유전자는 다음과 같다.

AtGA2ox4: 본사에서 지적소유권을 확보하고 있는 유전자로 식물체의 왜화 현상이라는 특징적인 표현형을 가지며, 또한 개화 시기, 뿌리 분화 등에 있어서 야생형과 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 종자 생산에 있어선 오히려 야생형보다 본 유전자가 과발현된 변이체에서 높은 개체당 종자 생산량을 가졌다. 이러한 표현형적 특징은 풍해 스트레스 저항성 제공 및 잔디 품종의 관리에 있어서 효율성을 제공할 수 있어서 고부가 가치 창출이 가능하리라 판단된다(그림 3).

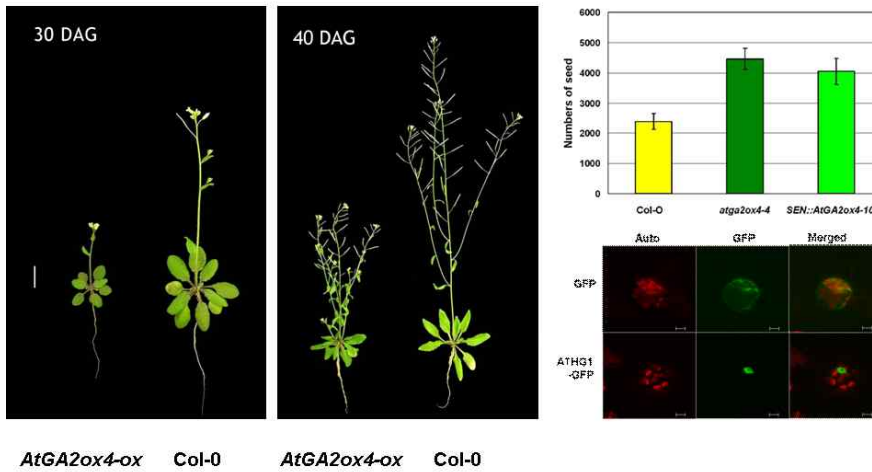


그림 3. *AtGA2ox4*의 과발현에 의한 표현형적 특징, 종자 생산량, 그리고 유전자 localization

ATHG1: 애기장대 유전자로 전사과정에 관여하는 At-hook domain을 가지고 있는 전사인자이며, 잎의 녹기연장이라는 표현형질을 특징으로 한다. 또한 본 유전자는 산화 스트레스 및 건조 스트레스에 높은 저항성을 제공함으로써 잎의 녹기연장뿐만 아니라 스트레스 저항성을 동시에 확보하는 다목적 잔디 품종 개발이 가능하리라 판단되며, 이는 고부가 가치 창출이라는 측면에서 기여도가 높은 것이다(그림 4)

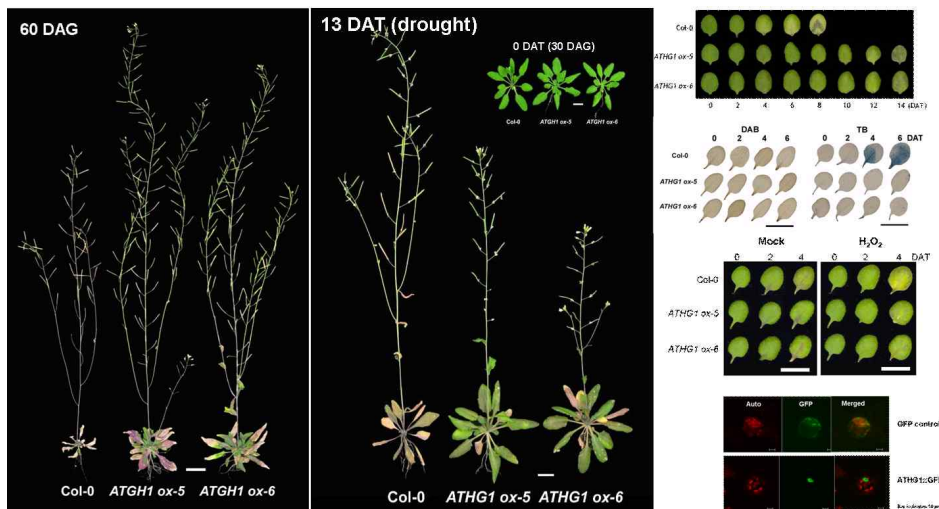


그림 4. *ATHG1*의 과발현에 의한 표현형적 특징 및 유전자 localization

GSDL2: 애기장대 유전자로 녹기연장의 표현 형질을 제공한다. 본 유전자는 녹기연장 형질외에 염 스트레스 및 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공하였다. 본 유전자는 다양한 내·외부 스트레스에 대한 저항성을 제공함으로써 잎의 안정적인 생산성 제공 및 환경적 제한 요인에 대한 저항성 제공으로 보다 넓은 식재 공간이 가능함으로써 잔디 품종의 다양한 적용이라는 측면에서 기여도가 높을 것이다(그림 5).

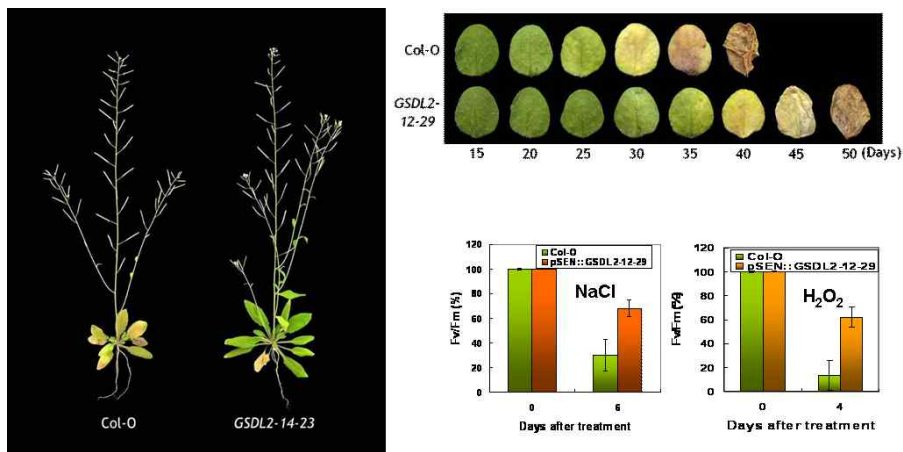


그림 5. *GSDL2*의 과발현에 의한 녹기 연장 및 스트레스 저항성에 대한 표현형적 특징

2. 잔디 형질전환 기술 및 형질전환체 개발 (협동기관)

본 과제 of 협동 기관인 이효연 교수 연구팀은 들잔디 형질전환 체계를 이미 확립하여 논문으로 발표한바 있다(Toyama *et al.*, *Molecules and Cells*, 2003)(그림 6). 또한 비선택적 제초제인 BASTA에 대한 저항성 유전자(*bar*)를 갖고 있는 제초제 저항성 들잔디를 개발하여 국제특허도 보유하고 있다. 이 잔디는 현재 ‘제주그린21’이라는 이름으로 환경위해성 평가 마무리 단계이며 상업화를 위한 준비를 하고 있다. 또한 이효연교수 연구팀은 한국형 잔디인 들잔디 형질전환 시스템 확립과 더불어 한지형 잔디인 벤투그라스의 형질전환 시스템도 확립하여 애기장대의 건조/저온 스트레스 내성 유전자인 *ABF3*를 한지형 bentgrass 중 하나인 *Agrostis mongolica* Roshev.에 도입시켜 스트레스 저항성 유도에 성공한 바 있다(Enkhchimeg *et al.*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2006).

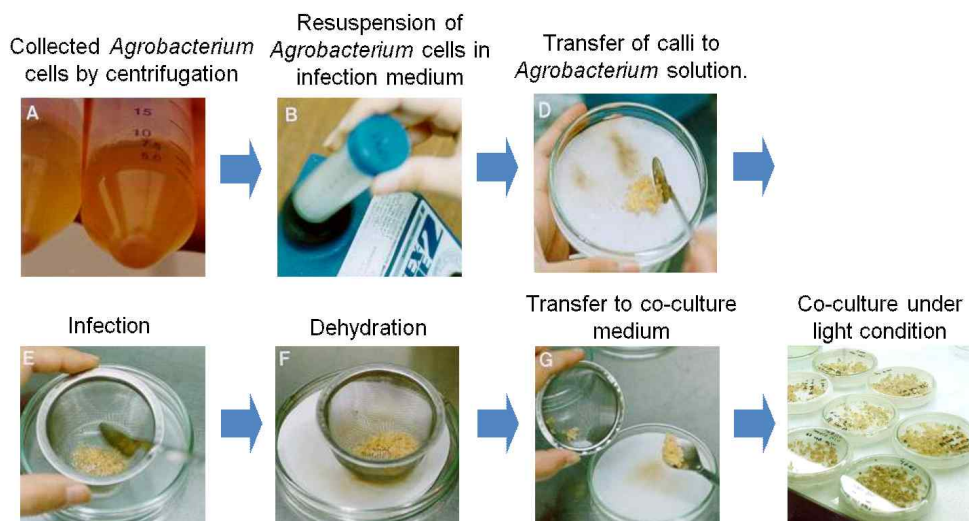


그림 6. 확립된 잔디 품종의 형질전환 기술 기법

3. 유용 유전자 도입 잔디 품종 개발 (주관 및 협동기관 공동연구)

주관 기관인 제노마인(주)와 협동 기관인 제주대는 공동으로 우량 잔디 품종을 개발하기 위하여 주관기관이 확보하고 있는 6종의 애기장대 유전자를 잔디에 도입하여, *ORE7*, *AtSIZ* 그리고 *PAPP5*의 TPR domain이 삽입된 우량 형질전환체 개발에 성공하였으며, 이중 *ORE7*과 *AtSIZ*가 삽입된 우량 잔디 형질전환체에 대해서는 본 사업에서 포장시험 등의 우수계통 선발을 수행하여 안정성 평가 진입을 위한 기반을 구축할 예정이다. 또한 발굴된 유전자 *AtGA2ox4*, *ATHG1*, 그리고 *GSDL2*의 경우, 형질전환 및 부분적인 형질전환체 선별 과정이 진행되고 있다(그림 7 참조). 이중 본 사업에서 목적 형질이 뚜렷한 *AtGA2ox4*와 *ATHG1*에 대한 우량 형질전환체 개발을 수행하고자 한다.

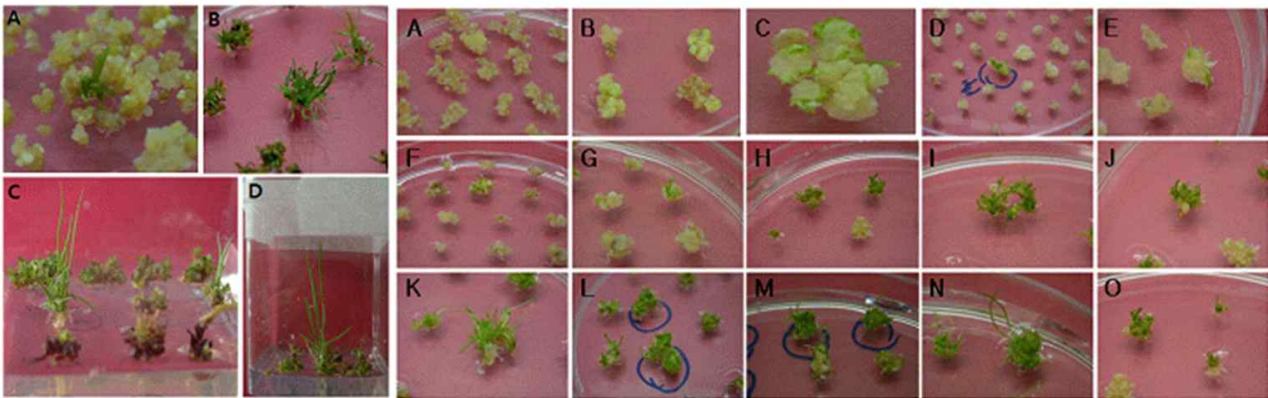


그림 7. *AtGA2ox4*(왼쪽)와 *ATHG1*(오른쪽) 유전자가 삽입된 잔디 형질전환체 생산 및 선별 과정

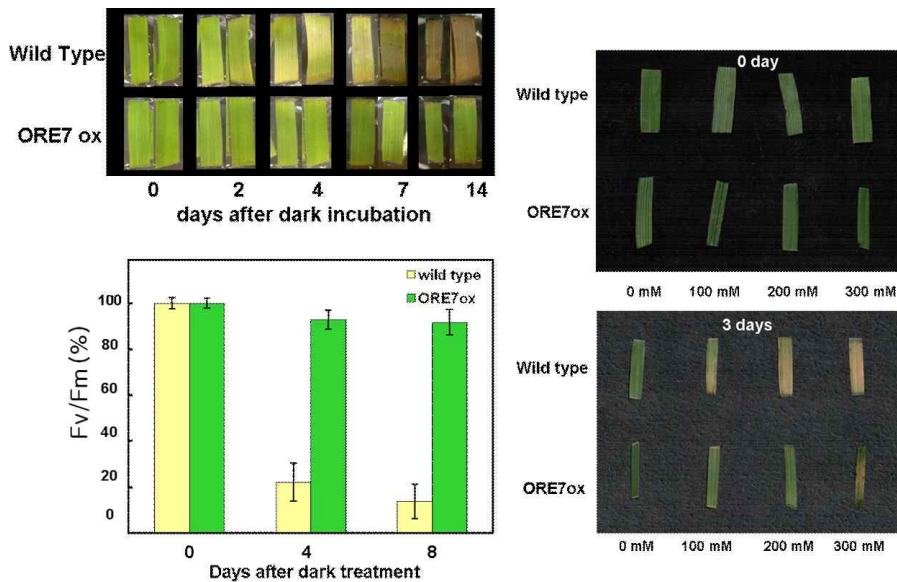


그림 8. *ORE7* 유전자가 삽입된 잔디 형질전환체의 녹기연장과 스트레스 저항에 대한 표현형적 특징

*ORE7*이 삽입된 잔디 형질전환체는 genomic Southern blotting, PCR, RT-PCR 분석을 통하여 도입 유전자의 삽입 및 발현을 확인하였으며, 애기장대에서의 표현 형질과 같이 녹기 연장이라는

표현형적 특징이 뚜렷하게 나타났으며, 또한 염 스트레스에 대해서 저항성을 가지는 것으로 밝혀졌다(그림 8). *AtSIZ* 삽입 잔디 형질전환체는 200mM의 NaCl 처리에 있어서 염 저항성을 가졌으며, 또한 건조 조건에서도 저항성이 나타나는 것으로 밝혀졌다(그림 9). 이러한 사실은 본 형질전환체는 다양한 스트레스에 있어서 저항성을 가질 것으로 판단되어 고부가 품종 개발에 많은 장점을 제공하리라 생각된다. *PAPP5*의 TPR domain이 삽입된 잔디 형질전환체는 왜성 표현형이 뚜렷하게 나타났으며(그림 10), 이러한 표현형은 잔디 관리에 많은 장점을 제공할 수 있어 품종의 고부가 창출에 일조할 수 있으리라 판단된다.

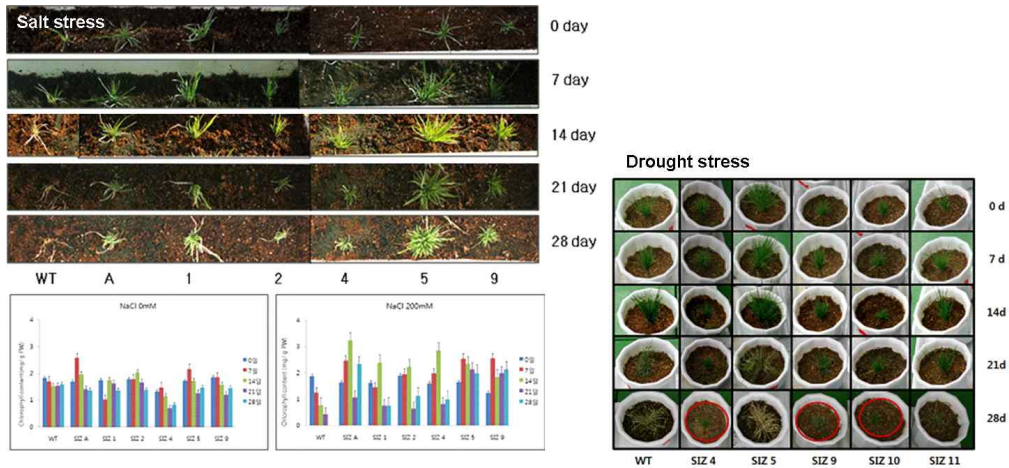


그림 9. *AtSIZ* 유전자가 삽입된 잔디 형질전환체의 염 스트레스 및 건조 스트레스 저항에 대한 표현형적 특징

이와 같이 기 확보된 유전자 및 형질전환체는 본 사업의 조기 성공을 이끌 것으로 확신한다. 특히 *ORE7*과 *AtSIZ* 삽입 잔디 형질전환체의 경우, 표현 형질이 뚜렷하여 작물의 이벤트화가 사업기간 내 가능해 조기 상용화를 이룰 수 있으리라 예상된다.

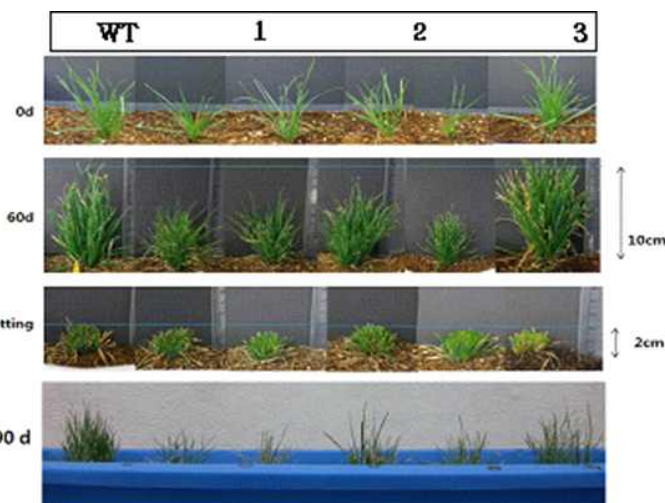


그림 10. *PAPP5*의 TPR domain이 삽입된 잔디 형질전환체의 왜성에 대한 표현형적 특징

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발수행 내용 및 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
잔디 적용 유용 유전자 발굴 및 기능 검정	<ul style="list-style-type: none"> 잔디 적용 유용 변이체 확보 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 유전체 연구를 통한 녹기연장, 스트레스 저항성 및 왜화 관련 변이체 확보 (주1) 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (주2)
잔디 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> 잔디 형질전환 	<ul style="list-style-type: none"> 잔디 형질전환 방법 확립 (주3)
잔디 형질전환체 기능 검정	<ul style="list-style-type: none"> 잔디 형질전환체 기능 검정 	<ul style="list-style-type: none"> 잔디 형질전환체 개발 (주4) 잔디 형질전환체 표현형 및 기능 검정 (주5) 우량 잔디 형질전환체 계통의 산업화 기초 연구 (주6)

주1) 기능성 유전체 연구를 통한 녹기연장, 스트레스 저항성 및 왜화 관련 변이체 확보

모델 식물은 애기장대로 하며, activation tagging, promoter trap, advanced RAM approach 등과 같은 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 다량의 변이체로부터 녹기 연장, 다양한 환경 스트레스, 그리고 왜화 조절에 대한 기능 조사를 통하여 유용 표현 형질을 지닌 변이체를 확보한다. 이때 activation tagging 기법을 통하여 확보된 변이체는 주로 gain-of-function 변이체로 스트레스 저항성에 대한 positive regulator와 관련된 유용 유전자의 발굴에 많은 장점을 가지고 있는 반면, advanced RAM approach와 promoter trap 기법을 통하여 확보된 변이체는 주로 loss-of-function 변이체로 스트레스 저항성에 대한 negative regulator와 관련된 유용 유전자의 발굴에 많은 장점을 가지고 있다. 이러한 민감성 유전자의 인위적 발현 억제는 작물의 스트레스 저항성 제공에 많은 기회를 제공할 것이다.

주2) 유용 유전자 발굴 및 기능 검정

확보된 변이체로부터 각 기법에 적절한 방법을 통하여 유전자 정보를 확보하고 이중 녹기 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성, 그리고 왜화 조절 등과 관련된 신기능성 유용 유전자의 가치를 가지는 유전자를 선별한다. 일반적으로 activation tagging 변이체 pool에서 확보된 변이체의 유전자 분리는 주로 TAIL-PCR을 수행하여 얻어지며, promoter trapping 변이체 pool에서 확보된 변이체의 유전자 분리는 plasmid rescue를 통하여, 그리고 advanced RAM 변이체 pool에서 얻어진 변이체의 유전자 분리는 inverse PCR을 통하여 얻어진다. 선별된 유전자의 기능을 재검정하기 위하여 reverse genetics를 적용한다. 이러한 연구를 통하여 얻어진 유전자의 gain-of-function과 loss-of-function 변이체의 표현형을 재확인하고, 그들의 표현 형질에 대한 생리·생화학적인 현상을 구명한다. 특히 reverse genetics를 통하여 얻어진 변이체의 생리·생화학적인 연구는 그 분야의 전문가에게 많은 자문과, 가능하면 공동연구를 통하여 유전자의 기능을 강화하고자 한다.

노화 지연과 같은 내부 환경 스트레스 저항성 관련 변이체의 기능 검정은 우선 녹기 연장과 관련된 사항으로 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하며 또한 분자생물학적 분석은 노화 시 발현이 증가되는 유전자를 indicator로 하여 유전자 발현을 분석하여 조사한다. 이와 더불어 내부 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 암 처리뿐만 아니라 methyl jasmonate, ABA, ethylene, oxidative stress(H_2O_2 등) 등에 대한 반응도 조사하고자 한다.

외부 환경 스트레스 저항성 관련 변이체의 기능 검정은 변이체를 다양한 스트레스 조건(drought stress, cold stress, salt stress, oxidative stress, etc)하에 일정 기간 방치한 후 그들의 표현형적 특징 및 생리·생화학적 특성을 조사하고자 한다.

식물의 녹기 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성 및 왜화 조절관련 신기능성 유용 유전자 발굴: 상기의 과정을 통하여 식물의 녹기 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성 및 왜화 조절을 제공하는 신품종 혹은 신기능성 작물 개발을 위한 유용 유전자를 최종 발굴한다. 이러한 유전자의 지적 소유권을 확보하기 위하여 주관 기관인 제노마인(주)이 기업체인 관계로 일차적으로 특허 출원을 원칙으로 하며, 이후 논문 게재를 진행할 것이다.

주3) 잔디 형질전환 방법 확립

들잔디의 효율적인 형질전환을 위해서는 재분화 효율이 높은 캘러스의 확보가 필수적이다. 들잔디의 경우 형질전환에 이용할 수 있는 재분화 효율이 높은 배발생 캘러스의 선발에는 약 6개월 이상이 소요되며 그 캘러스도 일정기간이 지나면 재분화 효율이 낮아지거나 상실하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구팀에는 매주 새로운 종자를 파종하여 캘러스를 유도/선발하고 재분화 효율이 높은 캘러스를 확보하면서 실험을 진행하고 있다. 크리핑 벤투그라스는 들잔디에 비해 재분화 효율이 높고 형질전환이 용이한 편이어서 들잔디처럼 캘러스 선발 과정을 거치지 않고 종자를 캘러스 유도 배지에 치상하고 약 4주정도 배양한 후 형질전환에 이용하고 있다.

유용 유전자가 포함된 플라스미드가 들어있는 아그로박테리움과 잔디 캘러스를 10일간 공동배양한 후 cefotaxime으로 agrobacterium을 제거시킨다. 균이 제거된 캘러스는 1 mg/L의 bialaphos가 첨가된 shoot 유도 배지에 치상하여 2주간 배양시킨 후 2.5mg/L의 bialaphos가 첨가된 배지로 옮겨 다시 2주 간 배양시킨다. 매 2주 간격으로 새로운 shoot 배지로 옮기면서 shoot를 선발한다. 선발된 shoot는 3mg/L의 bialaphos가 첨가된 뿌리 유도 배지에 치상하여 1-2개월 동안 배양시킨 후 순화과정을 거쳐 온실 내에서 재배한다.

주4) 잔디 형질전환체 개발

현재 주관연구기관에서는 왜성, 복합스트레스내성, 녹기연장을 유도하는 유전자를 모델식물인 애기장대에서 개발하고 탐색하고 있고 협동연구기관에서는 이러한 유전자들을 잔디로 도입하여 형질전환잔디를 생산하고 있다. 또한 형질전환잔디의 기능분석을 통해 우량형질 잔디 계통을 선발하고 있다. AtSIZ-형질전환 잔디는 내염성 및 내건성 형질을 나타내며, ORE7-형질전환 잔디는 암 처리에 의해 인위적으로 노화를 유도시켰을 때 강한 노화지연 표현형을 보였다. **AtSIZ 및 ORE7-형질전환잔디의 경우 향후 상업화를 목표로 형질전환 잔디 계통을 지속적**

으로 확보하여 우수계통을 선발하고자 한다.

ORE7-형질전환 들잔디의 경우 많은 계통수를 확보하기 위해 상당히 많은 노력을 기울여왔으나 아그로박테리움 감염 후 캘러스의 재분화력이 상당히 떨어져 형질전환체를 확보하는데 큰 어려움이 있었다. 이에 대한 대안으로, ORE7과 같은 종류의 gene family member인 *ATPG7*과 *ATPG8*(과발현시 노화 지연 및 가뭄 저항을 유도하는 유전자) 유전자를 도입하고 있다.

또한 현재 왜성을 강하게 유도하는 *AtGA2ox4*를 도입시킨 잠정 형질전환체를 얻었으며, 녹기 연장을 유도하는 *ATHG1* 유전자를 잔디로 도입하여 형질전환 들잔디를 확보하였다.

향후 본 연구를 통하여 상기 언급한 유용 유전자를 포함하여 총 **7종의 형질전환 잔디를 생산**할 계획이다.

주5) 잔디 형질전환체 표현형 및 기능 검정

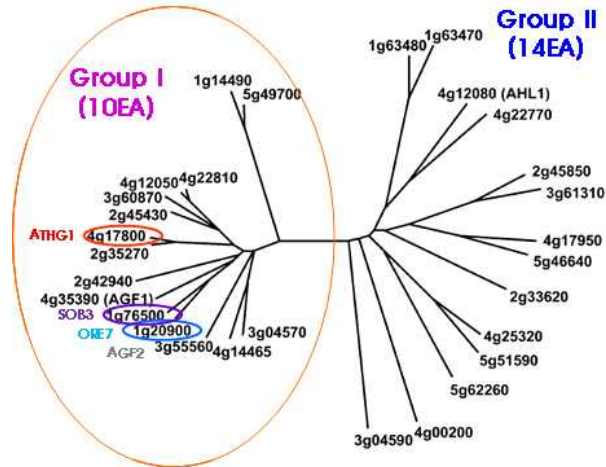
개발된 형질전환 잔디는 온실실험, 포장실험을 통해 그 표현형(왜성, 환경스트레스 저항성, 녹기 연장 등)을 분석하여, 실용화의 가능성을 탐색할 계획이다. 스트레스 저항성 및 녹기 연장 표현형을 정량적으로 측정하기 위해 광합성 효율, 엽록소 함량, 개체 생존율 등을 분석할 계획이다. 이와 같은 표현형 검정을 통해 선별된 품종들의 생리·생화학적 기능 분석을 통하여 **3종의 우량 잔디 형질전환체를 개발**할 계획이다.

주6) 우량 잔디 형질전환체 계통의 산업화 기초 연구

AtSIZ- 및 ORE7-형질전환 잔디의 경우 향후 상업화를 목표로 관련된 기반연구를 실시할 계획이다. 이를 위해 잔디 형질전환체 우수계통을 최종 선발할 계획이며 선발된 계통은 환경위해성 평가를 위한 포장 내 대량 증식을 실시할 계획이다. 총 **2종의 우량형질 계통을 선발하여** 위해성 평가 기초연구를 완료할 계획이다.

제 2 절. 고부가 잔디 적용 유용 유전자 발굴

본 연구팀은 발굴한 *ATHG1* 유전자의 AT-hook domain에 대한 phylogenetic tree를 이용한 기능 분석을 유추하는 중 흥미로운 사실을 알 수 있었다. AT-hook domain을 함유한 *ATHG1*, *ORE7* 그리고 *SOB3* 유전자의 공통적인 특징으로 노화지연에 대한 특징을 가지고 있었다. 따라서 본 연구팀은 AT-hook domain에 대한 direct approach를 수행하기 위하여 그림 11의 group I에서 10종의 유전자, 그리고 group II에서 14종의 유전자를 애기장대에서 분리하여 pCSEN 벡터를 사용하여 과발현시킨 후, 그들의 녹기 연장에 대한 표현형적 특징을 분석하였다.



Plant Physiol (2007)

그림 11. AT-hook domain을 가지는 애기장대 유전자의 phylogenetic tree 분석

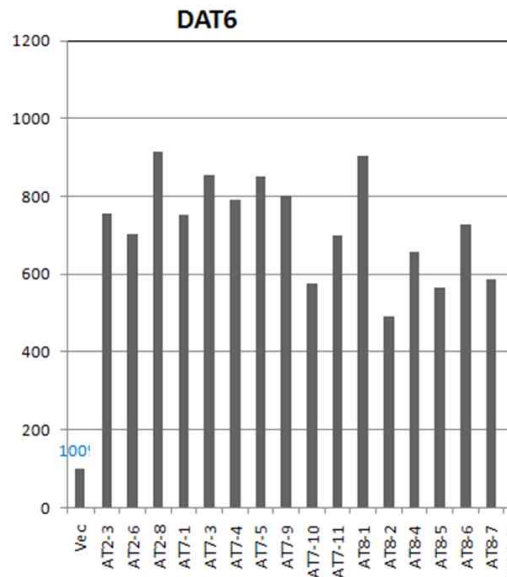


그림 12. *ATPG2*, *ATPG7* 그리고 *ATPG8* 유전자에 대한 T_2 형질전환 라인의 암 처리 후 6일째 앞의 엽록소 함량 변화

pSEN::ATPGs 벡터로 형질전환된 T_1 애기장대를 일정 기간 동안 생육시킨 후 6일 동안 암 처리한 결과, 놀랍게도 많은 *ATPGs* 유전자들이 식물의 노화 지연이라는 특징을 제공하였다. 이

러한 노화 지연 현상을 확인하기 위하여 T₂ transgenic 라인을 생산하여 6일 동안 dark-induced leaf senescence를 임의로 진행시켜 6일째의 엽록소 함량(그림 12) 및 표현형적 변화(그림 13)를 조사해본 결과, 대조구에 비하여 *ATPG2*, *ATPG7* 그리고 *ATPG8* 유전자가 과발현된 변이체에서 노화 지연에 대한 대표적인 표현형적 특징을 가졌다. 이들 중 일부 형질전환 라인들은 흥미롭게도 노화 지연의 표현형적 특징뿐만 아니라 잎의 크기에 대한 생산성 증대 표현형을 가지고 있었다(그림 13). 따라서 본 연구팀은 이들 중 *ATPG2*와 *ATPG8* 2종의 유전자와, 또한 노화 지연의 표현형적 특징을 가지는 *ATPG4* 유전자, 그리고 activation tagging 변이체군에서 freezing tolerance를 가지는 변이체로부터 분리한 *DDF1* 유전자 및 phyB overexpressor의 기능을 가지는 *ATHB23*을 신규 유전자로 규명하고 이들에 대한 세부적인 연구를 수행하였다.

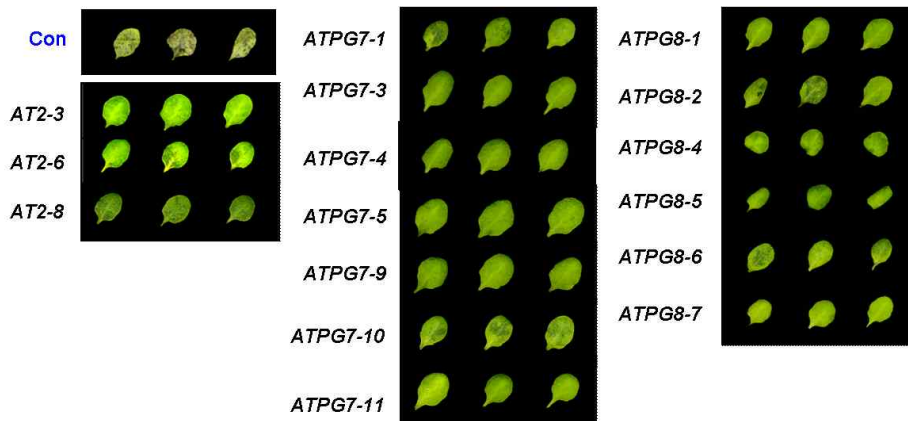


그림 13. *ATPG2*, *ATPG7* 그리고 *ATPG8* 유전자에 대한 T₂ 형질전환 라인의 암 처리 후 6일째 잎의 표현형적 특징

1. *ATPG2* (AT-hook protein of Genomine 2, At4g12050): 녹기 연장, 생산성 증대 및 스트레스 저항성 유전자

가. 애기장대로부터 녹기연장 및 생산성 증대 기능을 가지는 *ATPG2* 유전자 발굴: 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related)로 알려진 *ATPG2*는 약 35.8 kDa의 분자량을 갖는 339개의 아미노산을 암호화하는 1,020bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG2*(AT-hook protein of Genomine 2)으로 명명하였다.

상기 유전자가 식물의 녹기연장 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *ATPG2* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG2* 전사체의 발현을 변화시켰다. Inducible promoter인 *SENI* 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 *ATPG2* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG2* 재조합 벡터를 제작하였다(그림 14A). 그림 14A에서 BAR는 바스타 제초제에 대한 저항성을 부여하는 *BAR* 유전자(phosphinothricin acetyltransferase gene)를 가리키고, RB는 오른쪽 경계(Right Border), LB는 왼쪽 경계(Left Border), P35S는 CaMV 35S 프로모터, 35S-A는 CaMV 35S RNA polyA, PSEN은 *SEN1* 프로모터, Nos-A는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를 가리킨다. pCSEN-*ATPG2* 벡

터로 형질전환된 T₁ 애기장대 AT2-7은 대조구(ATPG2 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)와 발아 후 60일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 AT2-7 변이체 라인은 녹기 연장의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌다(그림 14B).

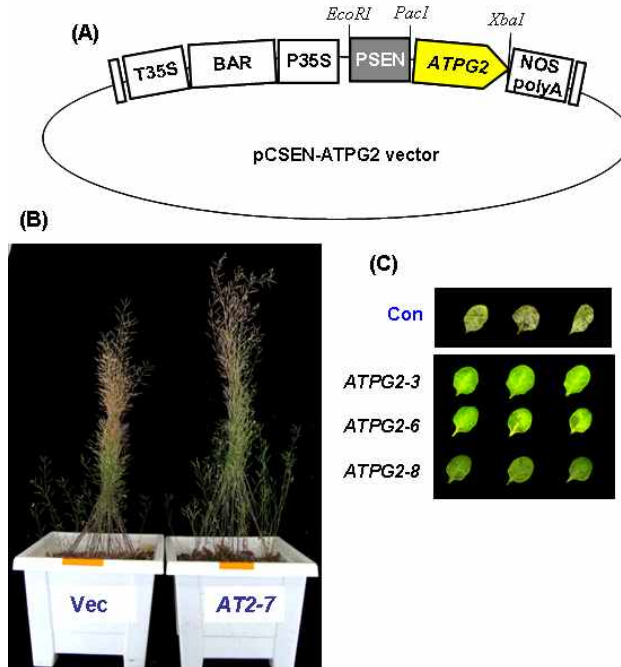


그림 14. *ATPG2* 유전자에 대한 형질전환 벡터 모식도(A)와 T₁ 형질전환체의 발아 후 60일째 표현형적 특징(B), 그리고 T₂ 형질전환 라인의 암 처리 후 6일째 잎의 표현형적 특징

이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 녹기 연장에 대한 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 일정 기간 생육 후 6일 동안의 암 처리 후 수행하였다. pCSEN-ATPG2 구성체를 가지고 있는 과발현 변이체 라인들은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체 잎의 녹기 연장 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 특히 *ATPG2 ox-3*과 *ATPG2 ox-6* 라인은 녹기 연장에 대하여 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌다(그림 14C). 따라서 본 연구팀은 *ATPG2* 유전자의 과발현은 식물의 녹기 연장이라는 표현형적 특징을 제공한다는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 녹기 연장에 대한 표현형적 특징을 가지는 변이체에서 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 *in vivo* 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 15). pCSEN-ATPG2 구성체를 가지고 있는 *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 녹기 연장 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 녹기 연장 표현형뿐만 아니라 녹기 연장 동안 개체 크기와 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 노화 지연 현상과 생산성 증대는 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 앞서 다른 AT-hook protein을 encoding하는 유전자와 마찬가지로 유전자의 과발현이 라인마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판

단된다. 흥미로운 사실은 *ATPG2* 유전자는 녹기 연장 형질이 앞선 유전자에 비해 강하지 않은 것으로 나타난 반면, 종자 수확량 및 개체 크기 증가와 같은 생산성 증대에 보다 강한 효과를 가지는 것으로 나타났다. 따라서 AT-hook protein을 encoding하는 유전자에서도 그들의 특성에 따라 생산성 증대 혹은 녹기 연장의 표현형적 특징을 제공하는 차이가 있으리라 판단된다. 이러한 사실은 생산성 증대 우량 작물 개발에 있어서 대단히 중요한 요인이 될 수 있을 것이다. 작물의 특성에 따라 상기 유전자의 적용을 조절함으로써 생산성 증대 우량 작물 개발에 대한 핵심 기술이 될 것이다.

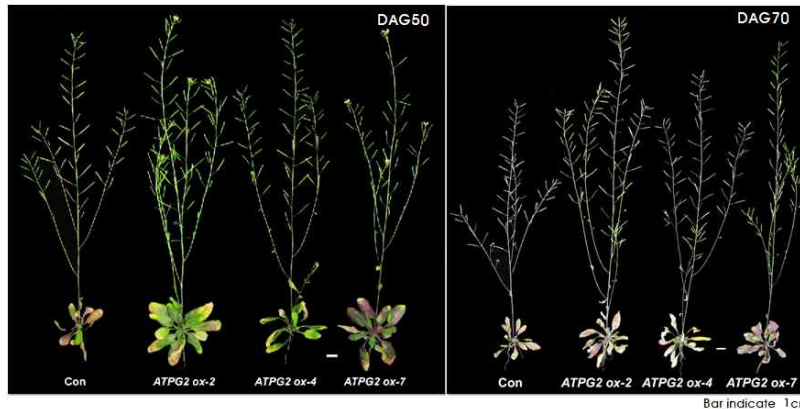


그림 15. *ATPG2* 과발현 애기장대 T_2 형질전환체의 발아 후 50일, 그리고 70일째 표현형적 특징

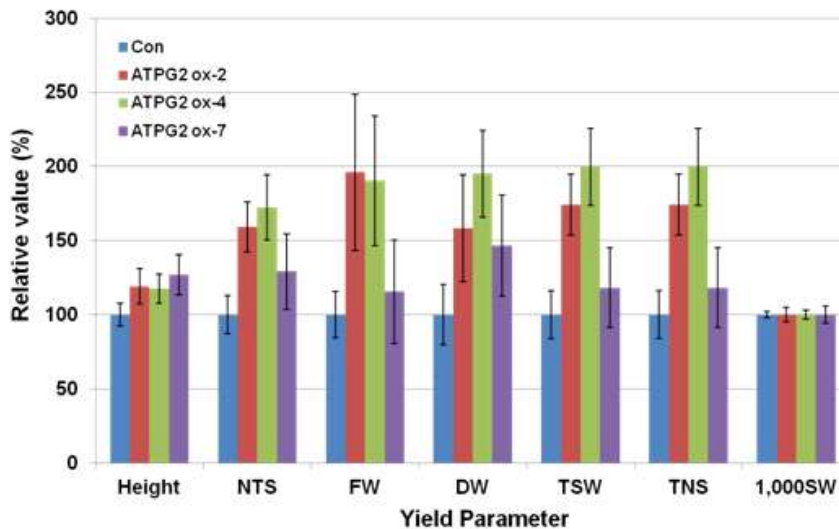


그림 16. *ATPG2* 과발현 애기장대 T_2 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant (g); DW, dry weight of plant (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

나. *ATPG2* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석: *ATPG2* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7*의 라인별로 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다. 적용된 생산성 증대 지표는

식물의 키(height), 장각과(silique) 수(NTS), 생체량(FW), 생체건량(DW), 총 종자 무게(TSW), 총 종자 수(TNS), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20개체의 평균값이다. *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 종자 무게 및 종자 수에 있어서 증가하는 하는 것으로 나타났으며, 특히 *ATPG2 ox-2*와 *ATPG2 ox-4* 변이체는 1.8배 이상 증가한 것으로 나타났다. 그런 반면 종자 1,000개의 무게에는 대조구와 큰 차이가 없었다. 그리고 생체량과 생체건량에 있어서는 과발현 변이체 모두는 대조구에 비하여 약 1.4배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 사실은 *ATPG2* 유전자가 녹기 연장과 더불어 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다(그림 16). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 바이오매스 증대 혹은 종자 수확량 증대와 같은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

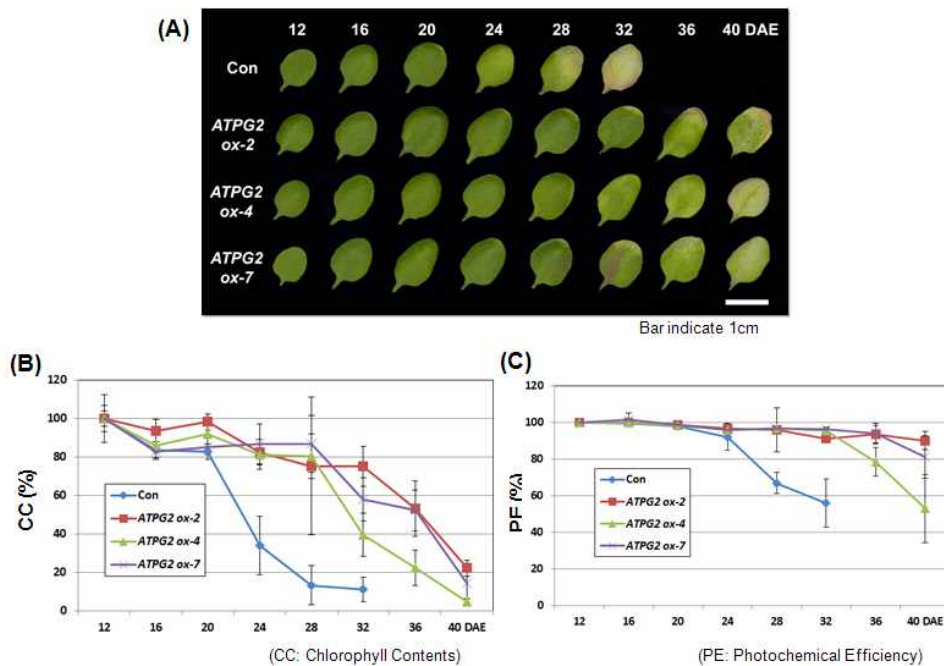


그림 17. *ATPG2* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량 (n=6)(B), 그리고 광합성 효율 (n=6)(C)

다. *ATPG2* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 대한 특성 분석: *ATPG2* 과발현 변이체의 노화 지연 현상을 확인하기 위하여, T₂ 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽 (rosette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 28일 이후 잎의 황화 현상이 급속히 진행되어 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 32일부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일째 일어남을 확인할 수 있었다(그림 17A). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG2* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 엽록소의 함량에 있어서는 그림 17B에 도시된 바와 같이 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 20일 이후부터 급격한 감소를 보이며 28일째 엽록소의 함량이 최소 수준에 도달하였으나, *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2*

*ox-7*의 경우 자엽 생성 후 28일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 정도의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다. 과발현 변이체의 광합성 효율 변화도 엽록소 함량 변화와 유사한 양상을 나타내었다. 야생종은 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 사라졌으나, *ATPG2 ox-4*를 제외하고 *ATPG2 ox-2*와 *ATPG2 ox-7*은 자엽 생성 후 40일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않았다(그림 17C). 상기 결과로부터, *ATPG2* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG2* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

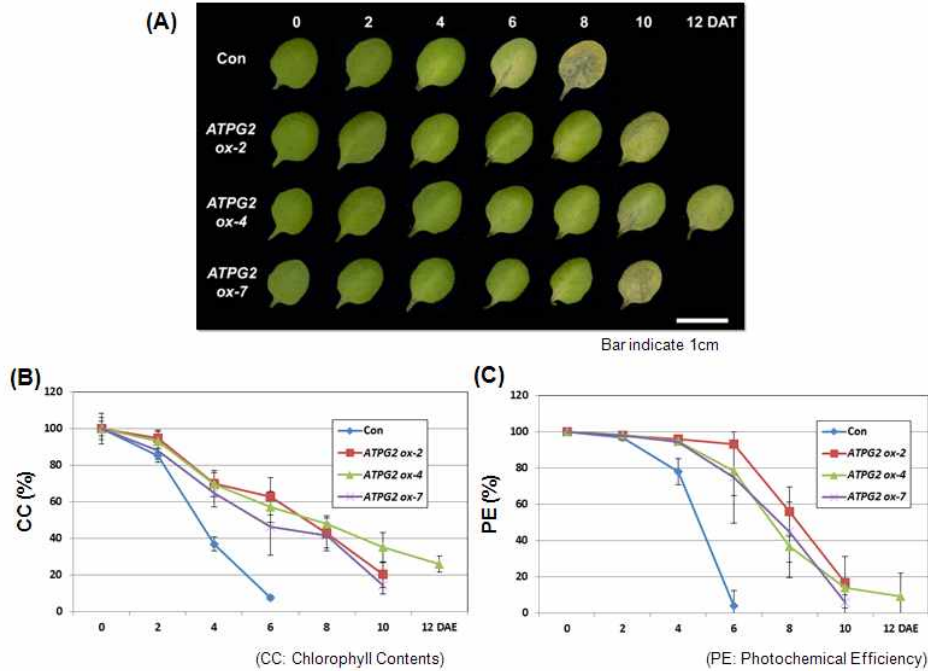


그림 18. *ATPG2* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량 (n=6)(B), 그리고 광합성 효율 (n=6)(C)

라. *ATPG2* 과발현 변이체의 암-유도 노화에 대한 특성 분석: 노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG2* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액 (2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 조사하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암 처리 후 6일 이후부터 잎의 황화 현상이 급속히 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 10일 이후부터 급속히 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(그림 18A). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암 처리 후 2일 이후 급격한 감소를 가져 6일 이후 최소 수준을 나타냈으나, *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7*의 경우, 대부분 6일째에도 50% 이상의 엽록소 함량을 나타냈다(그림 18B). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 *ATPG2* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저

히 지연됨을 알 수 있었다(그림 18C).

상기 결과로부터, *ATPG2* 과발현 변이체는 나이-의존적 노화와 마찬가지로 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG2* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

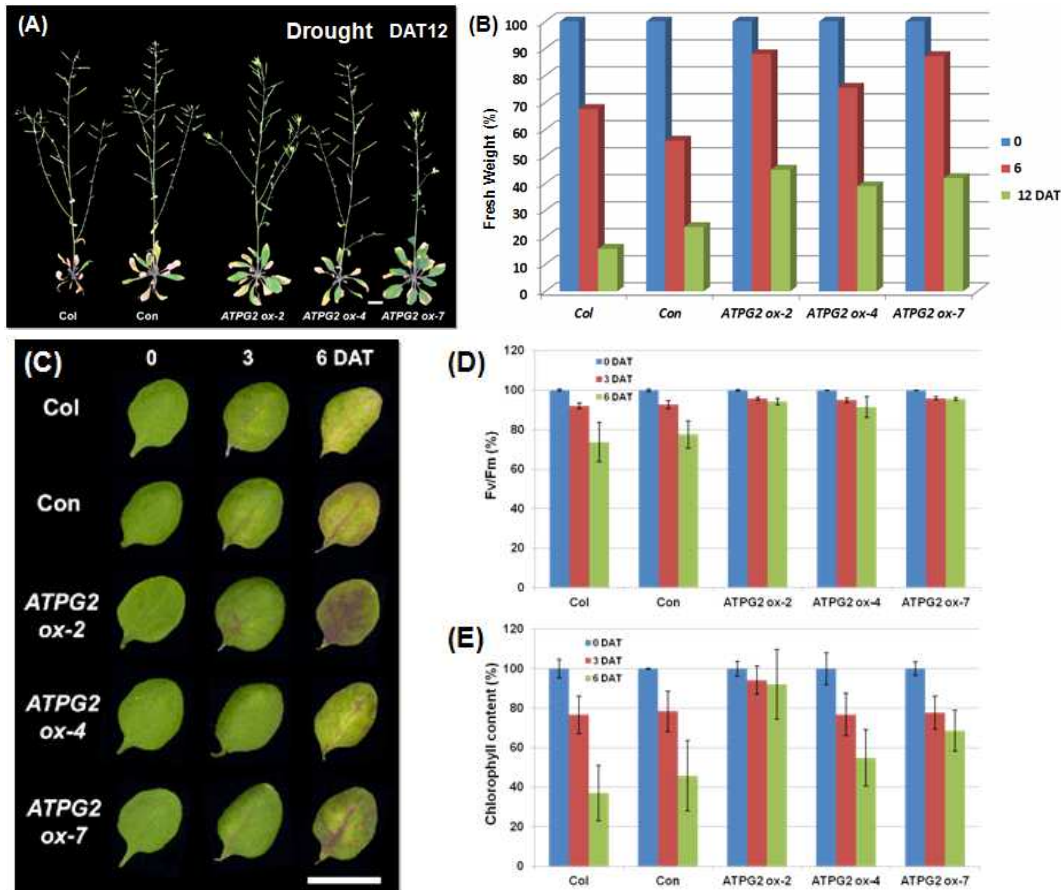


그림 19. *ATPG2* 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화, 그리고 H_2O_2 스트레스에 대한 표현형적 특징(C), 광합성 효율 변화(D), 그리고 엽록소 함량 변화(E), n=6.

마. *ATPG2* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석: *ATPG2* 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 12일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 그림 19A와 B에 도시되었다. 야생형 애기장대는 가뭄에 의해 잎의 황화 현상이 급속히 진행됨을 알 수 있었으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 가뭄에 의하여 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그에 비하여 *ATPG2* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG2*이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

ATPG2 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H₂O₂를 첨가하여 발아 후 25일 된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 3일 간격으로 6일 동안 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 라인별로 각 6개체를 조사하였다. 엽록소 함량은 663.2 nm와 664.8 nm의 흡광 계수를 이용하여 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(*Biochemical Society Transduction* 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였으며, 광합성 효율의 측정은 오 등의 방법(*Plant Mol. Biol.* 30:939, 1996)에 따랐다.

그 결과 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG2* 과발현 변이체, 특히 *ATPG2 ox-2* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소, 특히 엽록소 함량의 감소가 지연됨을 확인할 수 있었다(그림 19C-E). 앞선 가뭄 스트레스 저항성과 마찬가지로 *ATPG2 ox-2* 변이체 라인은 *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7* 변이체 라인에 비하여 훨씬 높은 H₂O₂ 스트레스 저항성을 가지는데 이는 본 변이체들의 상대적 유전자 발현 정도에 기인하는 것으로 판단된다. 이러한 사실은 *ATPG2*가 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

본 연구팀은 이들 유전자의 기능을 보다 심도 있게 밝히기 위하여 현재 나이-의존적 노화 및 암-유도 노화에 대한 노화관련 유전자의 발현 분석 등을 계속 수행하고 있는 중이다.

2. *ATPG4*(AT-hook protein of Genomine 4, At3g04570): 녹기연장, 생산성 증대 및 스트레스 저항성 유전자, [특허출원 10-2011-0110593, PCT/KR2012/008798]

가. 식물의 생산성 증대, 노화 지연 그리고 스트레스 내성을 제공하는 *ATPG4* 유전자
발굴: 애기장대의 AT-HOOK MOTIF NUCLEAR-LOCALIZED PROTEIN (GeneBank accession number NP_566232.1)의 염기서열을 기초로 하여 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머(*PacI*/AT3G04570 SOE-F, 5'-TTA ATT AAA TGG CGA ATC CAT GGT GGA CAG-3')와 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*XbaI*/AT3G04570 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA AAA TCC TGA CCT AGC TTG AGC-3')를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다. 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 32 kDa의 분자량을 갖는 315개의 아미노산을 암호화하는 948bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG4*(AT-hook protein of Genomine 4)로 명명하였다.

나. *ATPG4* 과발현 애기장대의 표현형적 특징: 상기 유전자가 식물의 생산성 증대와 노화 지연을 조절하고 또한 식물의 스트레스 내성을 제공하는지를 확인하기 위하여 *ATPG4* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG4* 전사체의 발현을 변화시켰다. 사용된 벡터는 유도성 프로모터(inducible promoter)인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터이며, 유전자를 센스 방향으로 클로닝하여 *ATPG4* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG4* 재조합 벡터를 제작하였다(그림 20A). 상기 *SEN1* 프로모터는 식물의 생장 단계

에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

상기 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션(electroporation) 방법을 이용하여 형질전환을 수행하였다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T₁)를 수확하였다. 대조군으로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *ATPG4* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

pCSEN-ATPG4 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조군과 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 변이체들은 뚜렷한 노화 지연 특성을 보였다. 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 받아 후 70일째 수행하였다(그림 20B). pCSEN-ATPG4 구성체를 가지고 있는 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체 라인은 애기장대 대조군(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 수명 연장 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 수명 연장 표현형뿐만 아니라 노화 지연 동안 개체 크기와 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 수명 연장 현상과 생산성 증대는 라인 마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 그림 20C에서 나타나듯이 유전자의 과발현이 라인 마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 선별된 노화 지연 표현형을 가지는 변이체들이 실질적으로 *ATPG4* 유전자의 과발현에 의해 유도되었는지 확인하기 위하여 qRT-PCR을 수행한 결과, 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체의 *ATPG4* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG4* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

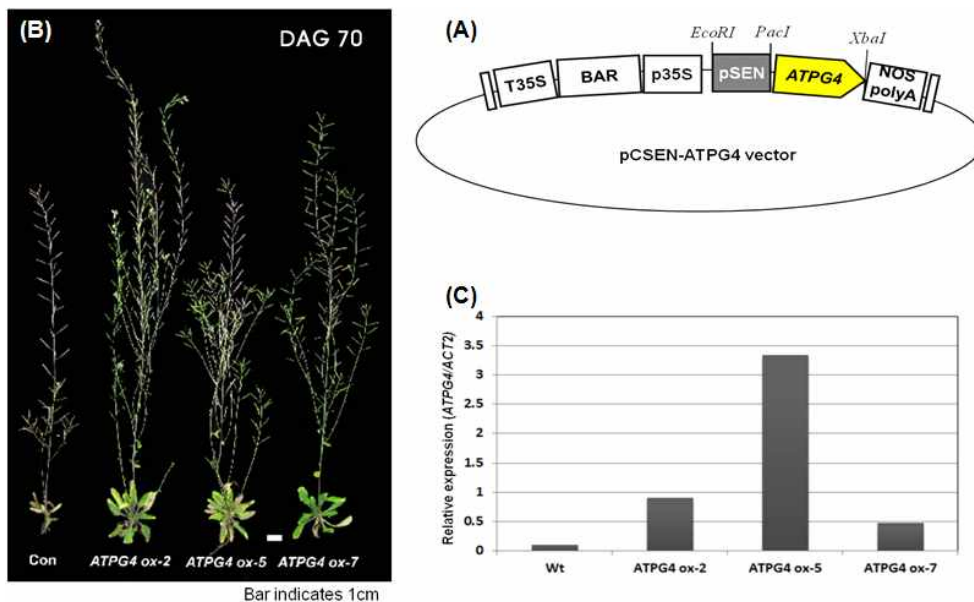


그림 20. *ATPG4* 과발현 벡터(A) 및 형질전환체의 표현형적 특징(B), 그리고 유전자 발현, 양성대조구는 *ACT2*(C)

ATPG4 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체들은

모두 대조구에 비하여 개체 크기, 종자 수확량 등의 생산성 증대 형질이 높은 것으로 나타났다. 그런데 흥미로운 사실은 유전자의 상대적 발현 정도가 가장 높은 *ATPG4 ox-5* 변이체는 *ATPG4 ox-2*와 *ATPG4 ox-7* 변이체에 비하여 생산성 증대에 대한 효과는 상대적으로 약한 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 생산성 증대와 수명 연장에 대한 표현형적 특징을 가진 식물을 임의로 제작할 수 있을 것으로 판단된다.

다. *ATPG4* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석: *ATPG4* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 라인별로 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다(그림 21). 적용된 생산성 증대 지표는 식물의 키(height), 장각과(silique) 수(NTS), 생체건량(dry-W), 총 종자 무게(TSW), 총 종자 수(TNS), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20개체의 평균값이다.

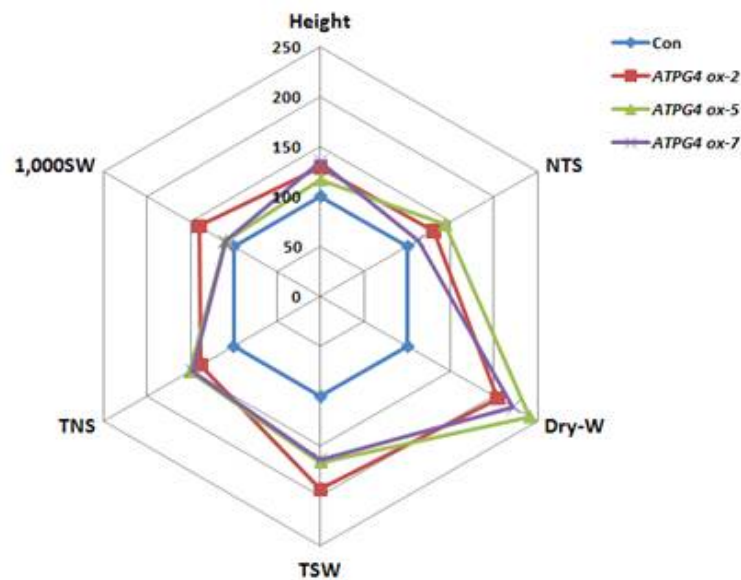


그림 21. *ATPG4* 과발현 애기장대 T_2 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; Dry-W, weight of plant after dry (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

ATPG4 ox-2, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 1.5배 이상 종자 무게에 있어서 증가하는 것으로 나타났으며, 종자 1,000개의 무게에는 *ATPG4 ox-2* 변이체가 대조구에 비하여 1.4배 이상 증가한 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자의 발현은 종자의 개별 크기와 전체 무게에 대해 모두 증가 현상을 제공하는 것으로 사료된다. 그리고 생체량과 생체 건량에 있어서도 과발현 변이체는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상을 가졌다. 이러한 사실은 *ATPG4* 유전자가 노화 지연과 더불어 개체 크기, 종자 크기 및 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

라. *ATPG4* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 대한 특성 분석: *ATPG4* 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T₂ 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽 (rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 표현형 관찰, 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 28일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일 이후부터 일어남을 확인할 수 있었다(그림 22A). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG4* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다.

엽록소 함량은 663.2nm와 664.8nm의 흡광 계수를 이용하여 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(*Biochemical Society Transduction* 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였다. 그 결과, 그림 22B에 도시된 바와 같이, 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격한 감소를 보이며 36일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 경우 자엽 생성 후 28일이 되었을 때도 측정 초기의 60% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다.

오 등의 방법(*Plant Mol. Biol.* 30:939, 1996)을 이용하여 광합성 효율을 측정하였다. 우선 각 DAE(day after emersion)의 잎을 15분간 암 처리한 후, 식물 효율 분석기(Plant Efficiency Analyzer)(Hansatech)를 이용하여 엽록소의 형광을 측정하였다. 그 결과, 그림 22C에 도시된 바와 같이, 야생종은 자엽 생성 후 32일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 36일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 경우 자엽 생성 후 36일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않다가 40일째 이후 활성 소실이 일어났다. 상기 결과로부터, *ATPG4* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG4* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

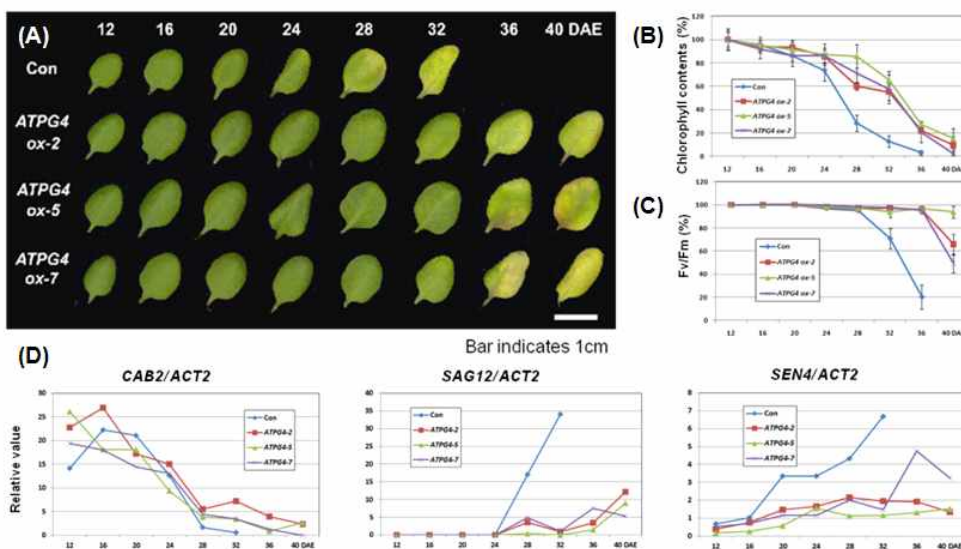


그림 22. *ATPG4* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, n=6(B),

광합성 효율, n=6(C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT*당 각 유전자 발현의 relative level(D)

야생종과 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG4* 유전자와 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다(그림 22D). 야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 야생형과 *ATPG4* 과발현 변이체들은 비슷한 감소 양상을 나타내었다. 그러나 노화의 signal로 사용되는 *SAG12* 발현의 경우, 야생종은 32일째 최대 발현을 나타내는 반면, *ATPG4* 과발현 변이체들은 36일까지 증가 현상이 거의 나타나지 않다가 40일째에도 야생종에 비하여 약한 signal을 나타냈다. 그리고 식물의 노화동안 점진적으로 발현이 증가되는 것으로 알려진 *SEN4*의 발현은 야생종에서는 20일 이후 급격하게 증가하는 반면, *ATPG4* 과발현 변이체들은 노화 전 과정동안에도 *SEN4*의 발현 증가가 크게 나타나지 않았다. 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG4* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

마. *ATPG4* 과발현 변이체의 암-유도 노화에 대한 특성 분석: 노화 촉진 요인으로 알려진 암 처리에 대한 *ATPG4* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액(2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 야생종 애기장대와 비교하였다.

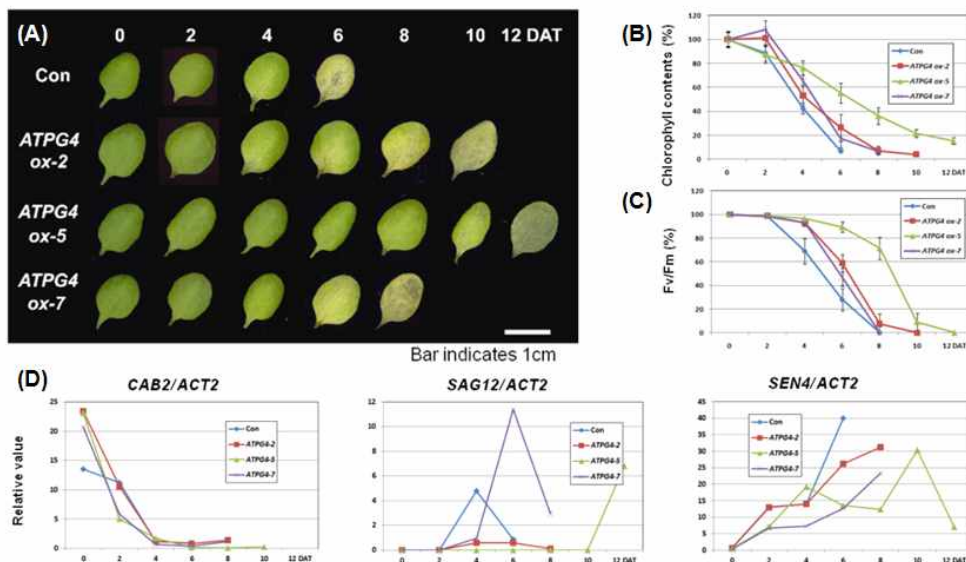


그림 23. *ATPG4* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, n=6(B), 광합성 효율, n=6(C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT*당 각 유전자 발현의 relative level(D)

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암 처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 6일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어든 반면, *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 보여지며, 특히 *ATPG4 ox-5*의 경우 지연현상이 더욱 뚜렷함을 확인할 수 있었다(그림 23A). 암 처리에 의한 노화 동안 엽록소 함량과 광합성 효율 변화에 있어서도 야생종에 비하여 *ATPG4* 변이체들은 정도의 차이는 있지만 함량 및 활성 감소가 지연됨을 알 수 있었다(그림 23B와 C).

또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 조사한 결과, 그림 28D에 도시된 바와 같이, 야생형에 비하여 *ATPG4* 변이체들은 *SAG12*의 발현이 지연되고, *SEN4*의 발현율이 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 보아 *ATPG4* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

바. *ATPG4* 과발현으로 인한 식물 노화 지연과 생산성 증대의 상관관계 분석: *ATPG4* 과발현 정도에 따른 변이체의 노화 지연과 생산성 증대에 대한 상관관계를 분석하기 위하여, T₂ 세대 10 라인을 선별하여 노화 지연 및 생산성 증대에 대한 그들의 표현형적 특징, 변이체 라인들의 *ATPG4* 과발현 정도, 그리고 변이체 라인들의 생산성 증대를 조사하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

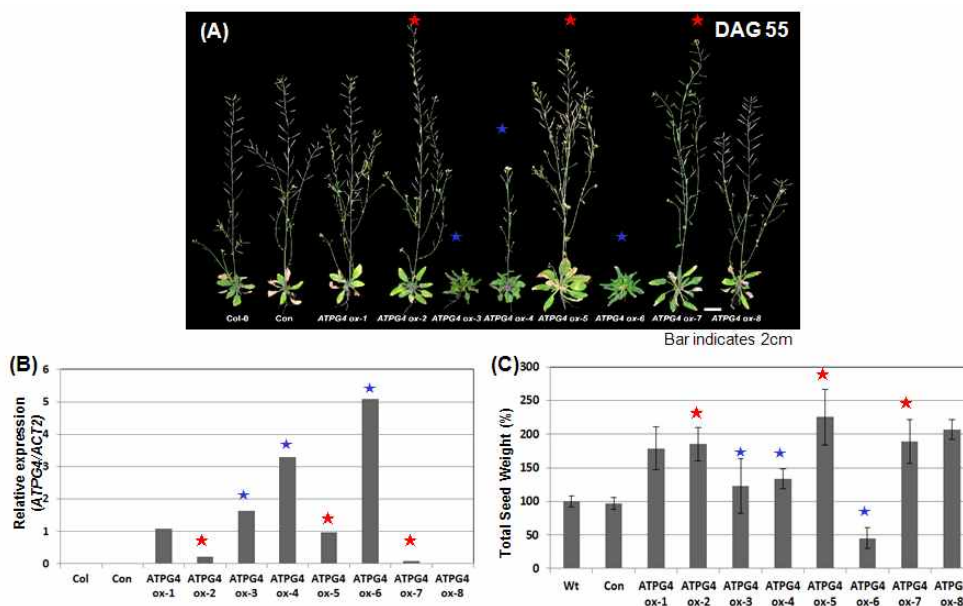


그림 24. *ATPG4* 과발현으로 인한 식물 노화 지연과 생산성 증대의 상관관계 분석. *ATPG4*-과발현 변이체의 표현형적 특징(A), *ATPG4* 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT*당 각 유전자 발현의 relative level(B), 그리고 종자 수확량, n=20(C)

ATPG4 과발현 변이체의 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특성을 분석하기 위하여 앞서 분석한 T₂ 형질전환 애기장대 3라인 외에 추가로 5라인을 선별하여 총 8라인의 T₂ 형질전환 애기장대 라인과 애기장대 야생형(Col-0)과 대조구(Con)의 표현형적 변화를

비교하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 55일째 수행하였다(그림 24A). 전체적으로 *ATPG4 ox-1*과 *ATPG4 ox-8* 변이체 라인을 제외하고 나머지 6 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 노화 지연의 표현형적 특징을 가지고 있으며, 특히 *ATPG4 ox-3*, *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체 라인들은 노화 지연의 표현형적 특징이 강력하게 나타나는 것으로 확인되었다. 그런 반면 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 노화 지연 현상보다 개체 크기와 silique 생산량 등의 생산성 증대에 있어서 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌다. 변이체 라인들의 이러한 표현형적 특징은 앞서 언급한 바와 같이 변이체 라인별로 유전자의 상대적 발현 정도의 차이에 기인하는 것으로 판단되며, 이를 증명하기 위하여 각 라인들에 대한 유전자 발현 정도를 분석하였다.

노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특징과 *ATPG4* 유전자의 상대적 과발현 정도와의 상관관계를 분석하기 위하여 자엽 생성 후 24일째의 변이체의 *ATPG4* 유전자의 발현 양상을 조사하였다(그림 24B). 변이체 8라인 모두 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG4* 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG4* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다. 흥미롭게도, 노화지연 표현형이 강력한 *ATPG4 ox-3*, *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체들은 *ATPG4* 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 반면, 개체 크기와 silique 생산량 증가와 같은 생산성 증대의 표현형적 특징을 가지는 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체들은 모두 *ATPG4* 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 식물의 생산성 증대 혹은 노화지연의 표현형적 특징을 가지는 작물을 임의적으로 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

ATPG4 과발현 변이체의 *ATPG4* 유전자 과발현 정도와 생산성 증대에 대한 특성을 보다 정확히 분석하기 위하여 변이체 라인들의 총 종자 무게를 애기장대 야생형과 비교, 분석하였다(그림 24C). *ATPG4 ox-3*, *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체들에 비하여 *ATPG4* 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체들은 종자 수확량에 있어서 애기장대 대조구에 비하여 1.7배 이상 증가하는 것으로 나타난 반면, 유전자의 발현 정도가 상대적으로 높은 *ATPG4 ox-3*, *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체들은 애기장대 대조구에 비하여 1.3배 이하의 증가율, 심지어 *ATPG4 ox-6* 변이체는 오히려 감소율을 가지는 것으로 나타났다. 흥미로운 사실은 생산성 증대 특정 형질을 가지는 변이체 라인들의 수확 시기는 애기장대 대조구와 큰 차이가 없다는 것이다. 이러한 사실은 본 유전자의 과발현으로 인한 생산성 증대는 대조구의 수확시기가 비슷하여 작물의 수확시기에 대한 문제점을 최소화할 수 있으리라 확신한다.

이러한 결과를 종합해보면, 먼저 *ATPG4* 유전자의 발현 정도가 높으면 높을수록 식물의 수명연장 특징이 강력하게 나타나는 것으로 판단되며, 이러한 제안은 본 유전자의 적용은 수명연장을 요구하는 식물 혹은 작물에 많은 장점을 제공할 것이라 생각된다. 또한 *ATPG4* 유전자 발현의 적정 범위 조절은 수확시기가 대조구와 비슷한 식물의 생산성 증대 특징을 강력하게 나타내는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 발현을 조절할 수 있는 프로모터(비교적 발현이 낮은 프로모터, 유도성 프로모터, 기관 혹은 화합물 특이적 프로모터 등)를 적용하면 생산성 증대 작물 개발에 많은 장점을 제공하리라 판단된다.

사. *ATPG4* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석: *ATPG4* 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 그림 25A와 B에 도시되었다. 야생형 애기장대는 가뭄에 의해 잎의 황화 현상이 급속히 진행됨을 알 수 있었으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 가뭄에 의하여 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그에 비하여 *ATPG4* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG4*가 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

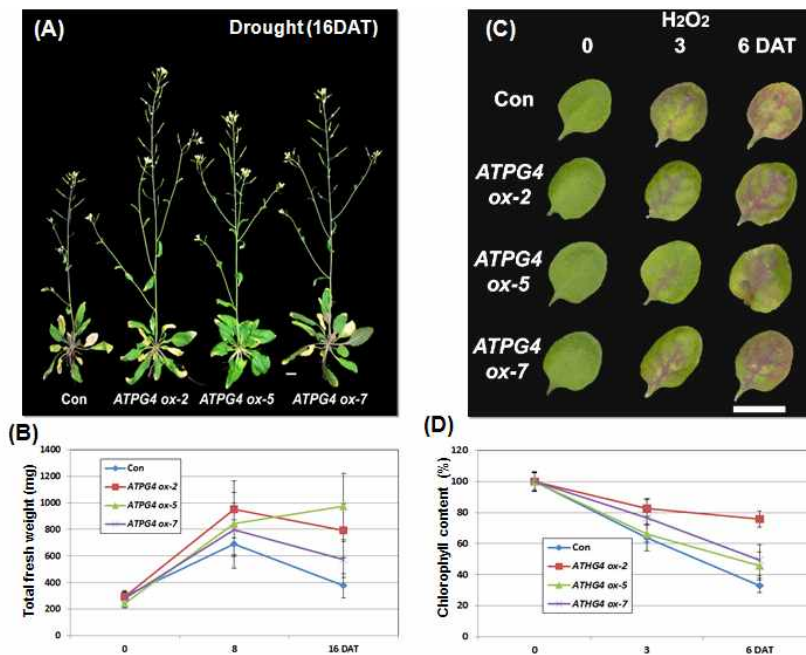


그림 25. *ATPG4* 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화 n=6(B), 그리고 H₂O₂ 스트레스에 대한 표현형적 특징(C) 및 광합성 효율 변화, n=6(D)

ATPG4 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H₂O₂를 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 2일 간격으로 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG4* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율(data not shown)의 감소에 있어서도 지연됨을 확인할 수 있었다(그림 25C와 D). 이러한 사실은 *ATPG4*가 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

따라서 *ATPG4* 유전자는 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성을 제공하여 스트레스 저항성 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

3. *ATPG8* (AT-hook protein of Genomine 8, At3g60870): 녹기연장, 생산성 증대 및 스트레스 저항성 유전자, [특허출원 10-2011-0038932, 10-2012-0039113, PCT/KR2012/002967]

가. 애기장대로부터 녹기 연장 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG8* 유전자 발굴: 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related, GeneBank accession number NP 191646.1)의 염기서열을 기초로 하여 제한효소 *BglIII*의 서열이 포함된 정방향 프라이머(*BglIII*/AT3G60870 SOE-F, 5'-AGA TCT ATG GAT GAG GTA TCT CGT TCT CA-3')와, 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*XbaI*/AT3G60870 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA GAA AGA CGG TCG TTG CGT TC-3')를 합성하였다. PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리, 분석한 결과, 약 28.4 kDa의 분자량을 갖는 265개의 아미노산을 암호화하는 798bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG8*(AT-hook protein of Genomine 8)로 명명하였다.

상기 유전자가 식물의 수명 연장 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *ATPG8* 유전자 과발현 변이체를 제작하였다. Inducible promoter인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터를 제작하였다(그림 26A). pCSEN-*ATPG8* 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대 *AT8-10*은 대조구(*ATHG8* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)와 발아 후 60일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 *AT8-10* 변이체 라인은 수명 연장의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 또한 흥미롭게도 종자 수확량 증가와 개체 크기 증가와 같은 생산성 증대 특징을 가졌다(그림 26B).

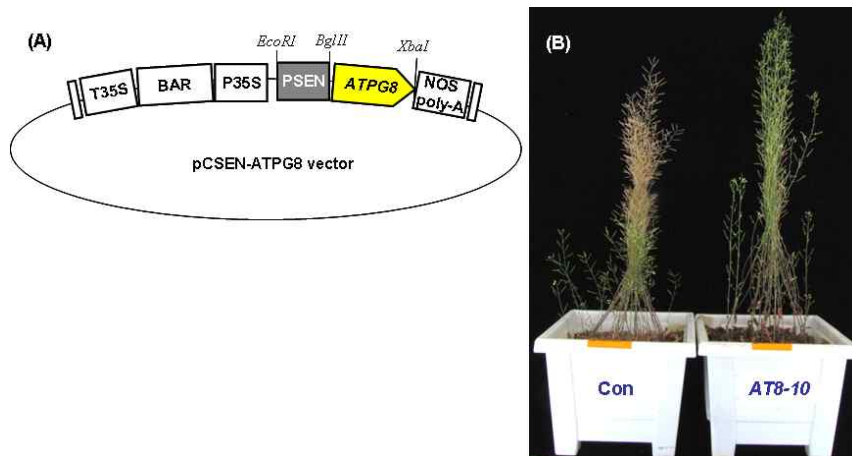


그림 26. *ATPG8* 유전자에 대한 형질전환 벡터 모식도(A)와 T₁ 형질전환체의 발아 후 60일째 표현형적 특징(B)

이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장

대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 선별된 노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 *ATPG8* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10* 변이체의 잎으로부터 전체 RNA를 각각 추출하고 이를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후, 합성된 cDNA를 주형으로 하고, *ATPG8* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자를 대상으로 유전자 발현을 조사하였다. 그 결과, 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10* 변이체의 *ATPG8* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며(그림 27), 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG8* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

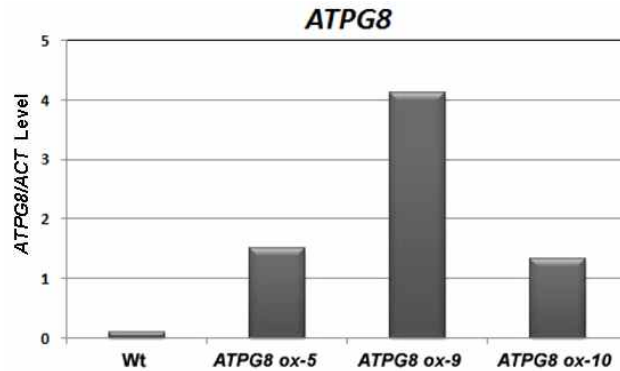


그림 27. 애기장대 야생형과 *ATPG8*-과발현체의 *ATPG8* 유전자의 발현 분석, 양성 대조구는 *ACT*.

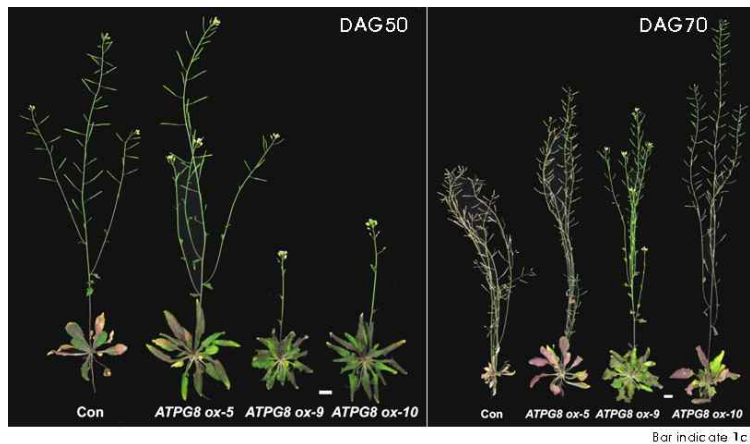


그림 28. *ATPG8* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 발아 후 50일 그리고 70일째 표현형적 특징

선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 28). pCSEN-*ATPG8* 구성체를 가지고 있는 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 수명 연장 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 수명 연장 표현형뿐만 아니라 수명 연장 동안 개체 크기와 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 수명 연장 현상과 생산성 증대는 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 그림 27에서 나타나듯이

유전자의 과발현이 라인 마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 흥미로운 사실은 수명 연장 형질이 강력한 *ATPG8 ox-9*는 생산성 증대에 있어서 큰 표현형적 차이를 못 가지는 반면, 수명 연장 형질이 강하지 않는 *ATPG8 ox-5*와 *ATPG8 ox-9*는 생산성 증대에 있어서 대조구에 비하여 종자 수확량 증가 및 개체 크기 증가와 같은 큰 표현형적 특징을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 생산성 증대와 수명 연장에 대한 표현형적 특징을 가진 식물을 임의로 제작할 수 있을 것으로 판단된다.

나. *ATPG8* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석: *ATPG8* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 라인별로 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다. 적용된 생산성 증대 지표는 식물의 키(height), silique 수(NTS), 생체량(Wet-W), 생체건량(dry-W), 총 종자 무게(TSW), 총 종자수(TNS), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며 결과는 라인별로 각 20개체의 평균값이다. *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 종자 무게 및 종자 수에 있어서 증가하는 하는 것으로 나타났으며, 특히 *ATPG8 ox-5*와 *ATPG8 ox-9* 변이체는 1.5배 이상 증가한 것으로 나타났다. 그런 반면 종자 1,000개의 무게에는 대조구와 큰 차이가 없었다. 그리고 생체량과 생체건량에 있어서는 과발현 변이체 모두는 대조구에 비하여 약 1.5배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 사실은 *ATPG8* 유전자가 녹기 연장과 더불어 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다(그림 29). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

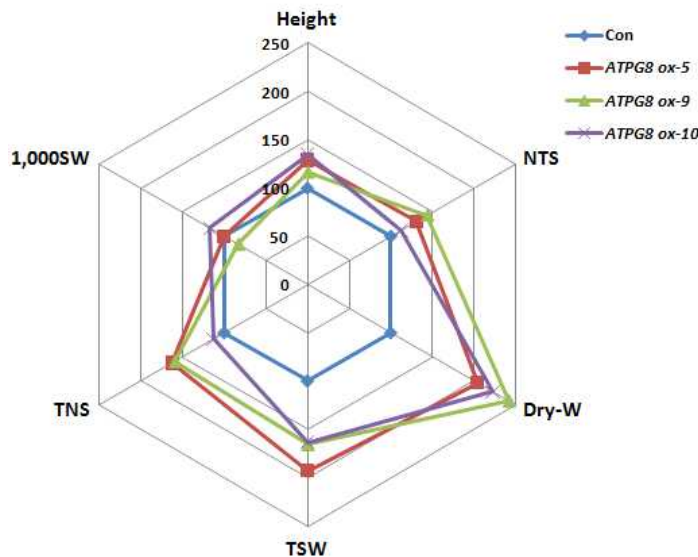


그림 29. *ATPG8* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; Dry-W, weight of plant after dry (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

다. *ATPG8* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 대한 특성 분석: *ATPG8* 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T₂ 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 엽엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 24일 이후 잎의 황화 현상이 진행되어 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 잎의 황화 현상이 36일부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(그림 30). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG8* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 엽록소의 함량에 있어서는 그림 31A에 도시된 바와 같이 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 자엽 생성 후 32일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다. 과발현 변이체의 광합성 효율 변화도 엽록소 함량 변화와 유사한 양상을 나타내었다. 야생종은 자엽 생성 후 28일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 자엽 생성 후 36일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않다가 40일째 라인에 따라 정도의 차이는 있지만 약 20% 범위 정도만 활성 소실이 일어났다(그림 31B). 상기 결과로부터, *ATPG8* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG8* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

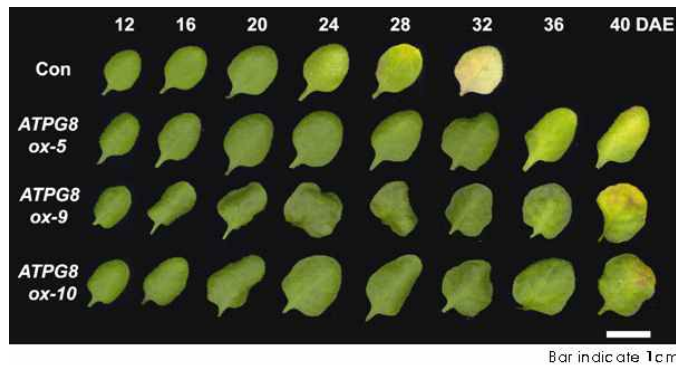


그림 30. *ATPG8* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징

야생종과 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10* 변이체에서 노화 관련 유전자 (senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG8* 유전자와 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다. 야생종의 경우, *CAB2*(엽록소a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였다. 그러나 *ATPG8* 과발현 변이체들에서는 정도의 차이는 있으나, 이들 유전자의 발현 감소 양상이 지연됨을 알 수 있었다. *SAG12* 및 *SEN4*와 같은 노화 관련 유전자들은 노화단계에서 그 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. *SEN4*와 *SAG12*

경우 야생종에서 자엽 생성 후 28일 이후 급격히 증가하여 32일째 최대의 발현치를 가지는데 비해, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10* 변이체 모두는 *SEN4*와 *SAG12*의 발현이 자엽 생성 후 36일째까지 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 한편 *ATPG8* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 전체적으로 *ATPG8* 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 발현 수준이 현저히 높으며 노화 동안 라인별로 정도의 차이는 있지만 24일에서 28일 사이에 작은 피크를 가졌다가 점진적으로 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(그림 31C). 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG8* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

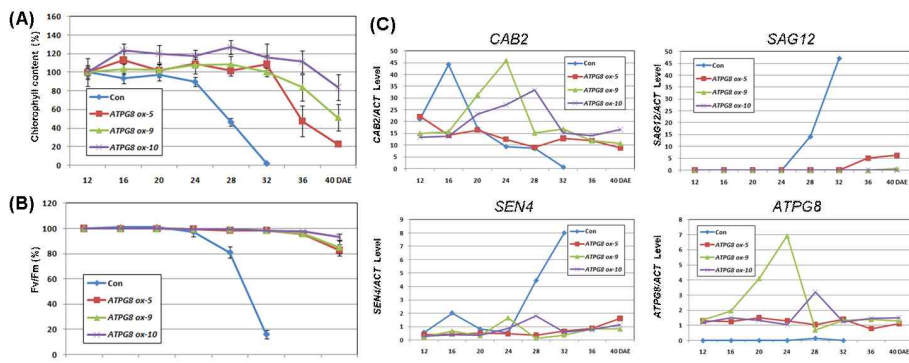


그림 31. *ATPG8* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 엽록소 함량 (n=6)(A), 광합성 효율 (n=6)(B), 그리고 *ATPG8*과 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 *ACT*(C)

라. *ATPG8* 과발현 변이체의 암-유도 노화에 대한 특성 분석: 노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG8* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액 (2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 조사하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암 처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 잎의 황화 현상이 12일 이후부터 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(그림 32). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암 처리 후 4일 이후 급격한 감소를 가져 6일 이후 암 처리하지 않은 상태의 약 10% 이하의 수치를 나타냈으나, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우, 대부분 6일째에도 60% 이상의 엽록소 함량을 나타냈다(그림 33A). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 *ATPG8* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(그림 33B).

또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 조사한 결과, 그림 33C 도시된 바와 같이, 야생형이 암 처리 후 4일째 *SAG12*의 발현이 현저히 증가하고 6일째 최고치를 나타내는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 동안 거의 발현되지 않았다.

*SEN4*의 발현에 있어서, 야생형의 경우 암 처리 초기 동안 발현이 현저히 증가하여 6일째 최고치를 나타내는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 동안 야생형에 비하여 현저히 낮은 발현양을 나타내었다. 한편 *ATPG8* 유전자의 경우, 야생형에서는 거의 발현이 없는데 비해, 과발현 변이체에서는 암 처리 시 증가 현상을 보여 6일째 최고치를 가지고 이후 감소함을 알 수 있었다. 그러나 전체적인 발현량은 야생형에 비하여 현저히 높은 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어 보아 *ATPG8* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.



그림 32. *ATPG8* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징

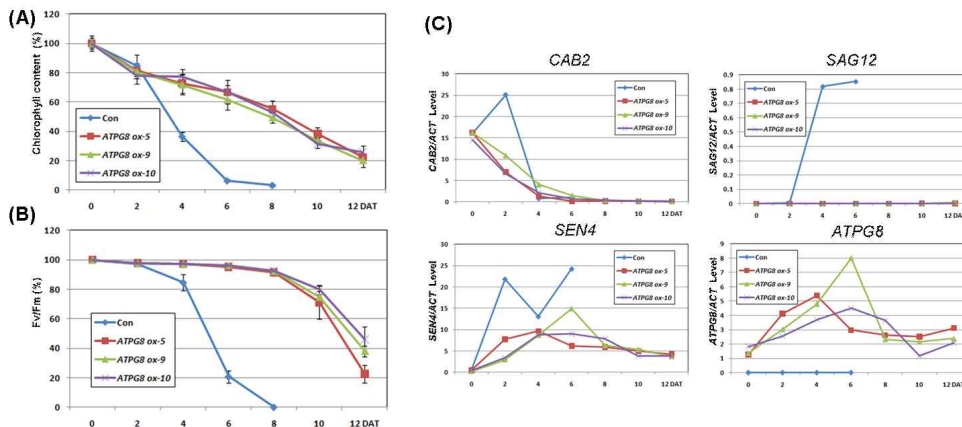


그림 33. *ATPG8* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 엽록소 함량 (n=6)(A), 광합성 효율 (n=6) (B), 그리고 *ATPG8*과 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 *ACT1*(C)

마. *ATPG8* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석: *ATPG8* 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 그림 34A와 B에 도시되었다. 야생

형 애기장대는 가뭄에 의해 잎의 황화 현상이 급속히 진행됨을 알 수 있었으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 16일 동안의 가뭄 처리에 의하여 초기의 20% 정도까지 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그에 비하여 *ATPG8* 유전자의 과발현 변이체인 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*은 16일 동안의 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 거의 2배 이상인 40에서 60%의 무게를 유지함을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG8*이 가뭄스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

ATPG8 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H₂O₂을 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 3일 간격으로 6일 동안 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG8* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소에 있어서도 지연됨을 확인할 수 있었다. 특히 광합성 효율의 경우 야생형은 6일 동안의 H₂O₂ 스트레스 처리에 의해 50% 정도까지 감소하였으나, *ATPG8* 과발현 변이체에서는 거의 100%를 유지하고 있어 광합성 효율의 감소가 거의 일어나지 않고 있음을 알 수 있었다(그림 34C와 D). 이러한 사실은 *ATPG8*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

따라서 *ATPG8* 유전자는 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성을 제공하여 스트레스 저항성 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

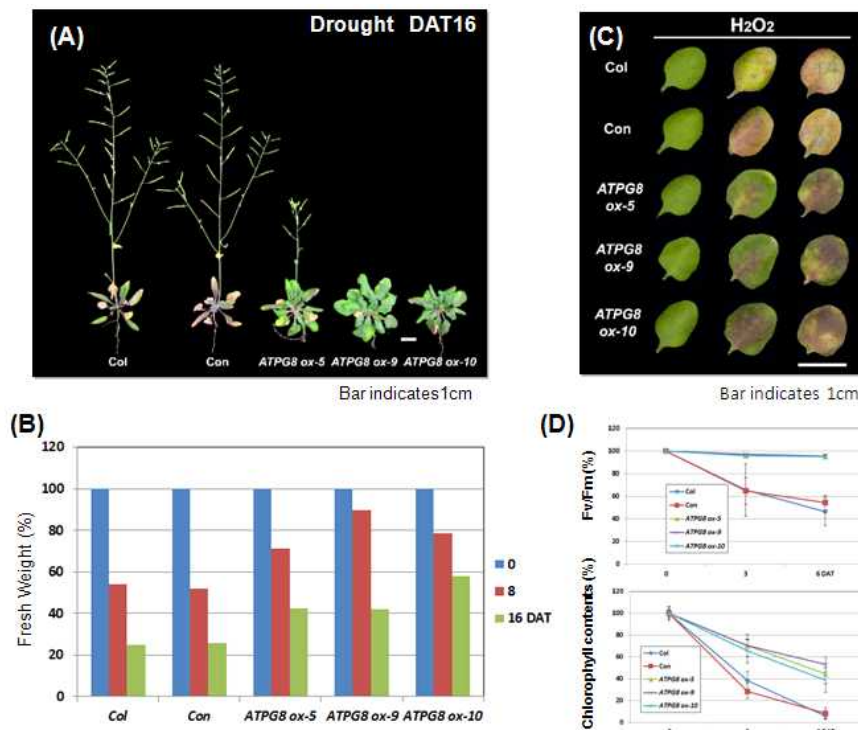


그림 34. *ATPG8* 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화 n=6(B), 그리고 H₂O₂ 스트레스에 대한 표현형적 특징(C) 및 엽록소 함량과 광합성 효율 변화, n=6(D)

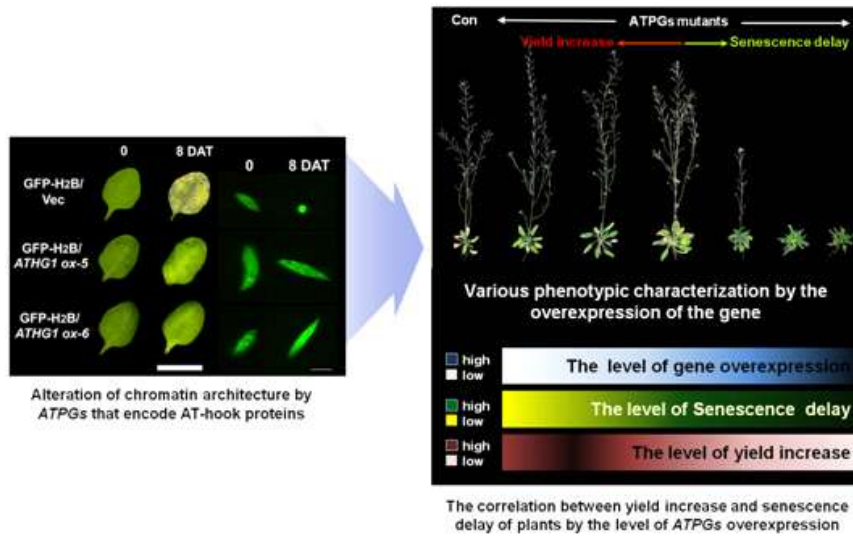


그림 35. Model for chromatin engineering technology of Genomine. The technology shows a wide range of yield increase and/or senescence delay in the plants by the expression level of *ATPGs* genes

본 연구팀은 본사에서 확보하고 있는 *ORE7*과 *ATHG1*, 그리고 상기에서 발굴한 AT-hook protein을 encoding하는 유전자 3종의 기능 분석을 통하여 chromatin architecture 조절 기술에 대한 새로운 모델을 제시하였다(그림 35). 제노마인(주)의 chromatin architecture 조절 기술은 식물의 노화 진행 동안 chromatin의 안정성을 제공하여 식물의 생산성 증대 또는 녹기 연장의 표현형적 특징을 나타낸다. 흥미로운 점은 이러한 표현형적 특징은 적용 유전자의 발현 레벨에 따른다는 것이다. 적용 유전자의 발현이 강하면 강할수록 녹기 연장의 표현형이 강력하게 나타나고, 적용 유전자의 발현이 적정 수준을 유지하면 식물의 생산성 증대에 고효율의 표현형적 특징을 제공한다. 또한 본 기술은 염, 산화 혹은 건조와 같은 환경 스트레스에 대한 저항성도 제공한다. 따라서 본 유전자 발현의 적정 수준 조절은 잔디의 녹기 연장과 tiller 생성 촉진과 같은 생산성 증대 형질을 가지는 고부가 잔디 신제품 개발에 보다 많은 장점을 제공하리라 확신한다.

4. *DDF1* (DWARF and DELAYED FLOWERING 1, At1g12610): 다중 스트레스 저항성 유전자, [*Plant Science* 180: 634-641, 2011]

가. 애기장대로부터 **freezing tolerance**를 제공하는 *DDF1* 유전자 분리: 본 연구팀은 freezing tolerance에 관여하는 중추 조절 유전자를 애기장대에서 발굴하기 위하여 activation tagging 변이체 pool을 스크리닝하였다. 그 결과 -5°C에서 뚜렷한 내성을 가지는 변이체를 선별하였으며, 이를 *fil1-1D* (freezing tolerance 1-1D)로 명명하였다(그림 36A). 본 변이체의 freezing tolerance는 우성으로 나타났으며 또한 *fil1-1D*는 dark-green 잎, 왜소 현상 그리고 늦은 개화와 같은 표현형적 특징을 가졌다(그림 36B). 변이체의 이러한 표현형적 변이는 *DDF1*(At1g12610)

의 활성화에 의하여 유발되었으며(그림 36C와 D), *DDF1*은 CBF/DREB1 subfamily의 AT2 전사 인자를 encode하는 것으로 알려졌다.

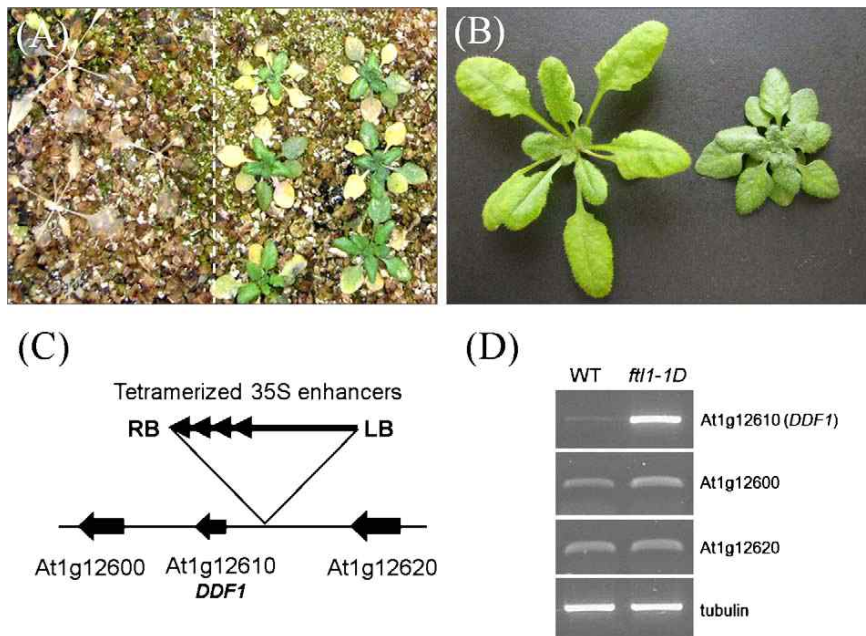


그림 36. Phenotype and molecular analysis of *fill-1D* mutant. (A) Effects of cold stress. WT (left) and *fill-1D* (right) were grown in soil for 4 weeks and incubated for 24 h in -5°C chamber. Photograph was taken on Day 4 after return to normal growing conditions. (B) Four-week-old WT (left) and *fill-1D* (right) under standard growth. (C) Putative genes around T-DNA insertion site in genome of *fill-1D*. T-DNA was inserted between *DDF1* and *At1g12620*. (D) Expression analysis of *DDF1*, *At1g12600*, and *At1g12620*, three genes located within about 10 kb from the 35S enhancer in *fill-1D* by RT-PCR.

나. Freezing stress에 대한 *DDF1* 유전자의 기능 분석: 식물이 -6°C 에 노출되었을 때 야생형은 거의 생존하지 못하는 반면에 변이체는 약 73%의 생존율을 가지는 것으로 나타났다(그림 37A). 이러한 사실은 *fill-1D* 변이체가 야생형에 비하여 freezing tolerance가 훨씬 강한 것으로 의미한다. 흥미로운 사실은 저온 순화과정은 야생형과 변이체 모두에게 freezing tolerance를 제공한다는 것이다. 저온 순화과정을 거친 후 변이체의 생존율은 100%까지 올라가며, 또한 야생형도 60% 수준까지 생존율이 높아졌다(그림 37B). Magome 등은 *ddf1-D*가 GA 결핍 변이체이지만 GA의 처리가 *ddf1-D*의 왜화 현상, 늦은 개화 그리고 염 스트레스에 대한 저항성과 같은 표현형 회복을 유발한다고 보고하였다. 따라서 본 연구팀은 GA가 *DDF1*으로 유도된 freezing tolerance에도 작용하는 지를 확인하기 위하여 10^{-4}M GA_3 를 변이체에 처리하여 그들의 freezing tolerance의 양상 변화를 조사하였다. 그 결과 GA의 처리는 변이체의 증가된 freezing tolerance의 억제를 유발하였다(그림 37C). 이러한 사실은 *DDF1*에 의해 유도된 증가된 freezing tolerance가 GA에 의해 부분적으로 억제된다는 제안을 이끌어내었다.

다. Drought와 heat stress에 대한 *DDF1* 유전자의 기능 분석: 본 연구팀은 *DDF1* 유전자가 freezing tolerance뿐만 아니라 drought 혹은 heat에도 tolerance를 제공하는 지를 확인하기 위하여 건조 및 열 스트레스 조건하에 식물체를 일정 기간 동안 방치한 후 그들의 tolerance를 조사하였다. 12일 동안의 건조 조건하에서 야생형의 완벽히 시들었는데 반하여 *fill-1D/ddf1* 변이

체는 여전히 생육을 유지하고 있었으며(그림 38B), 그리고 GA₃의 처리는 야생형의 잎의 시듦 현상을 촉진하는데 반해 변이체에는 그렇게 크게 나타나지 않았다(그림 38D). 수분 소실 지표에 있어서도 앞선 표현형적 조사와 마찬가지로 변이체는 야생형에 비하여 수분 소실이 적게 일어남을 확인할 수 있었다(그림 38E). 열 스트레스에 대한 tolerance는 건조 스트레스를 배제하기 위하여 90% 습도를 유지하는 조건 하에서 연구를 수행하였다. 야생형은 60°C에서 12 시간의 열 스트레스를 제공하였을 때 회복기간에도 대부분이 생존하지 못 하였으나 *ftl1-1D/ddfl* 변이체는 비록 심각한 damage가 있을지라도 그들은 생존하는 것으로 나타났다. 그 외 여러 다양한 조건의 열 스트레스 하에서도 *ftl1-1D/ddfl* 변이체는 야생형에 비하여 heat tolerance를 가지는 것으로 나타났다(그림 39 참조).

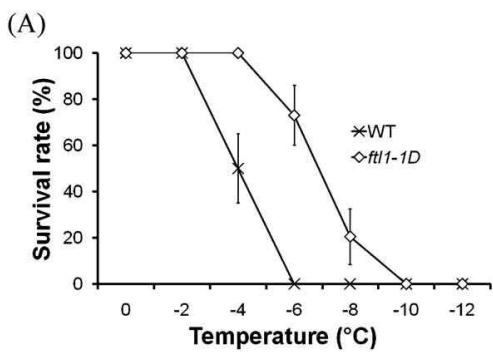


그림 37. Characterization of freezing-tolerant *ftl1-1D/ddfl* plants. (A, B) Survival without (A) or with (B) cold-acclimation at low temperatures. Four-week-old plants were exposed for 24 h to a gradient of 0 to -12°C, by 2°C intervals, then returned to normal growing conditions. Cold acclimation was induced under continuous light for 4 d at 4°C. (C) Response of *ftl1-1D* to treatment with 10⁻⁶M GA₃ (GA+) under freezing stress. Survival was evaluated 1 week after return to standard growth (n=24). Error bars represent standard error of mean (SEM).

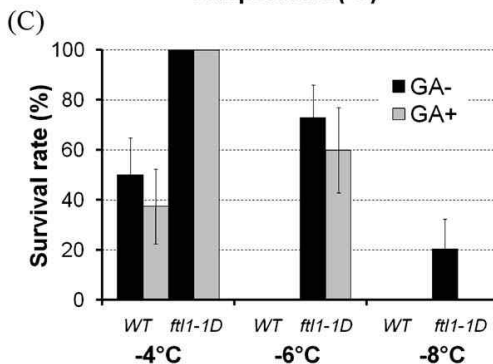
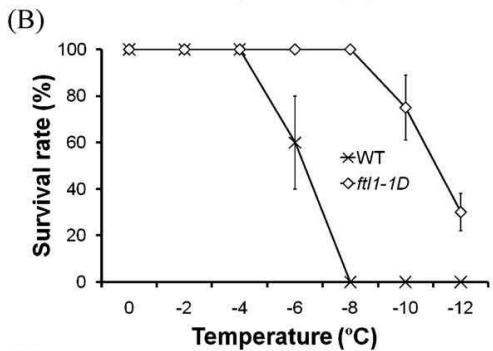




그림 38. Response of *ftl1-1D/ddfl* to drought. (A–D) Each panel shows WT (left) and *ftl1-1D/ddfl* (right) plants grown without (A, B) or with (C, D) GA treatment. Plants had first been grown for 4 weeks with watering (A, C), then maintained without watering for additional 12 d (B, D). (E) Water-loss assay of *ftl1-1D/ddfl* (n=24). Error bars represent SEM.

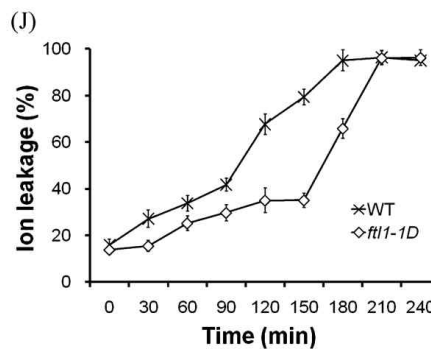
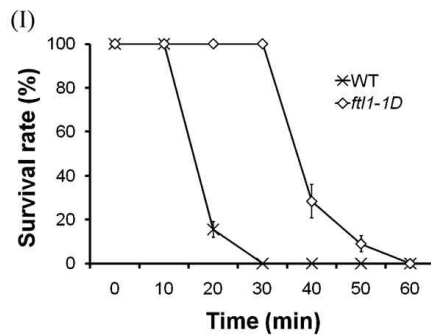
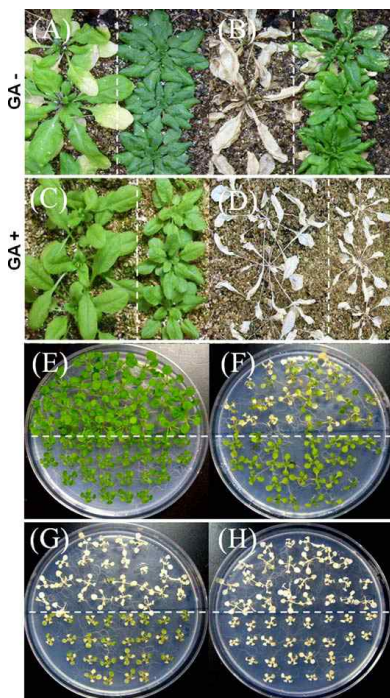
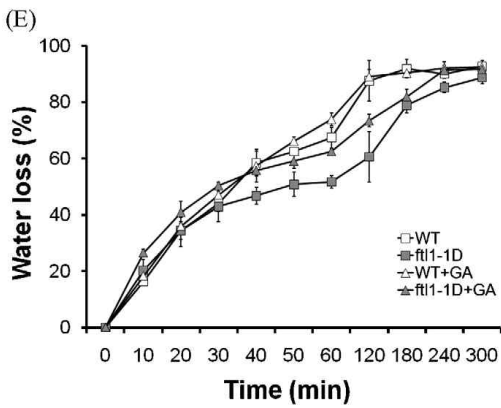


그림 39. Response of *ftl1-1D/ddfl* to heat. (A–D) Each panel shows WT (left) and *ftl1-1D/ddfl* (right) plants grown without (A, B) or with (C, D) GA treatment. Plants had first been grown in soil for 4 weeks with watering (A, C), then maintained in 60°C chamber for additional 7 d (B, D). (E–H) Response of WT (upper) and *ftl1-1D/ddfl* (lower) at seedling stage on MS media. Each plate was exposed to 45°C for 0 (E), 20 (F), 40 (G), or 60 min (H), and photographed 7 d after return to normal growing conditions. (I) Survival

of WT and *fit1-1D/ddf1* seedlings (n=24). Error bars represent SEM. (J) Electrolyte leakage assay of WT and *fit1-1D/ddf1* (n=24). Error bars represent SEM.

따라서 *DDF1*은 여러 abiotic 조건, 특히 freezing, drought 그리고 heat 조건에 대하여 stress tolerance로서의 기능을 담당하고, 이러한 역할은 아마 GA 대사경로와 연관이 있을 것이라 판단된다.

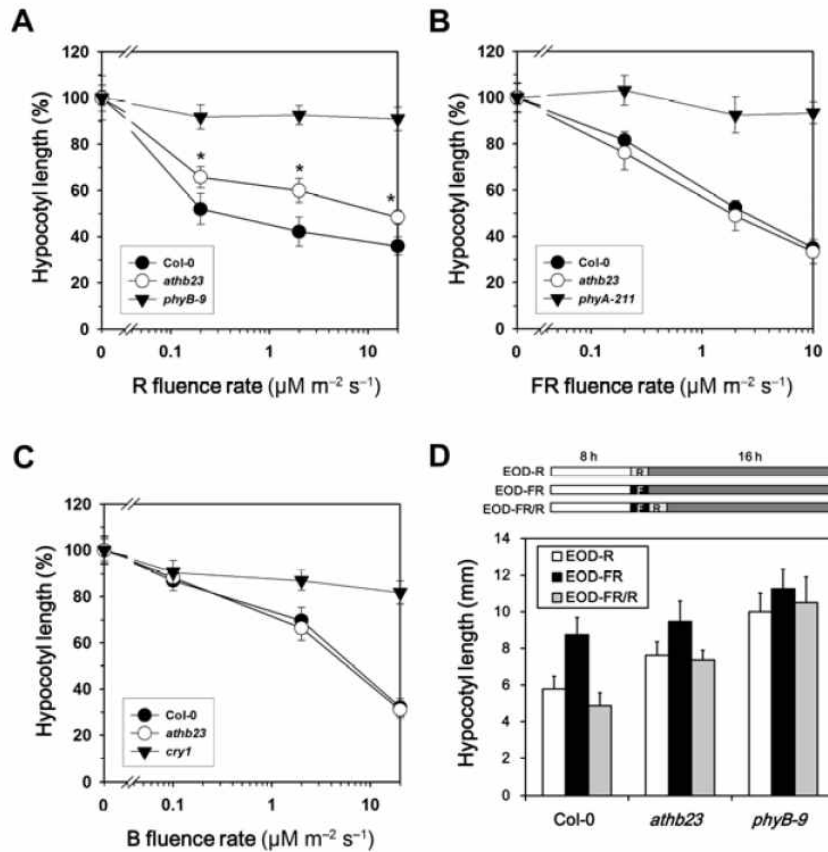


그림 40. The *athb23* mutant shows reduced hypocotyl growth responses to red light. (A-C) Hypocotyl growth response of 5-day-old wild-type (Col-0) and *athb23* seedlings under various intensities of R (A), FR (B), and B light (C). The experiment was repeated four times, and representative data are shown. Data are shown as means ($n > 30$) \pm SD. The ratio of hypocotyl length to that of dark-grown seedlings was expressed as relative percent ratio. Asterisks indicate significant differences between wild-type (Col-0) and *athb23* seedlings using Student' *t* test ($P < 0.001$). (D) Hypocotyl growth response of the *athb23* mutant to EODFR light treatment. Light irradiation conditions are indicated in the diagram above the graph. EOD-R, EOD-FR, and EOD-FR/R denote R, FR, and FR/R light pulse treatment, respectively. The hypocotyl length under each condition is denoted as a value relative to that of wild-type (Col-0) plants with no EOD light treatment. This experiment was repeated four times, and representative data are shown. Data presented are means ($n > 30$) \pm SD.

5. *ATHB23* (*Arabidopsis thaliana* Homeobox Protein 23): *phyB* overexpressor, [Physiol Plant, accepted, 부록 참조]

가. 애기장대로부터 *phyB* overexpressor의 기능을 가지는 *ATHB23* 유전자 분리 및 기능 분석: 본 연구팀은 affinity chromatography와 MS-based proteomic analysis를 통하여 *phyB* complex protein을 분리하였으며, 이들 중 *phyB* overexpressor로서의 기능을 가지는 유전자를 분리하고 이를 *ATHB23*으로 명명하였다. *ATHB23*은 애기장대 유식물에서 R light-mediated 하배축 성장 반응에 있어서 positive regulator로서 기능을 가졌으며(그림 40), 또한 *phyB*-mediated 자엽 팽창 및 종자 발아에 있어서도 positive regulator로 기능을 가지는 것으로 나타났다(그림 41, 42). 이러한 *phyB* overexpressor로서의 기능을 가지는 *ATHB23* 유전자는 음지내성 잔디 품종 개발에 적용이 가능하리라 판단되며, 본 연구팀은 잔디 형질전환체 개발을 위하여 잔디 품종 개발에 있어서의 장점에 대한 기능 분석을 추가적으로 계속 수행하고 있는 중이다.

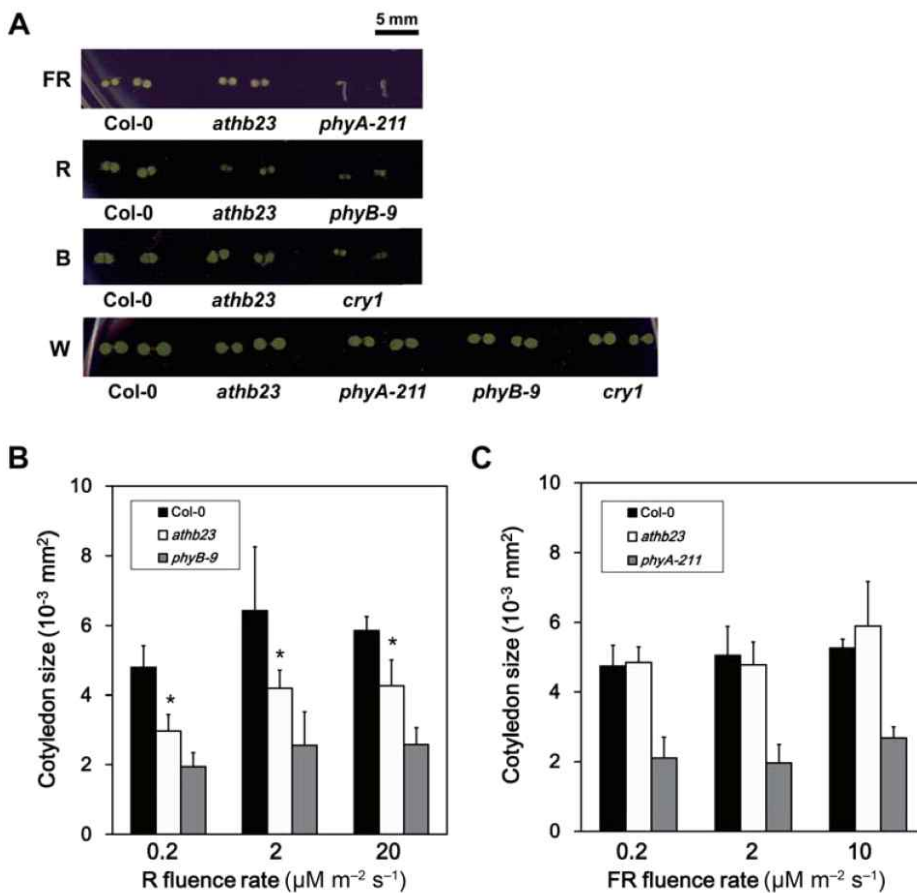


그림 41. The *athb23* mutant is defective in *phyB*-mediated cotyledon expansion. (A) Photographs of 5-day-old wild-type (Col-0) and *athb23* seedlings grown under FR (10 μmol m⁻² s⁻¹), R (20 μmol m⁻² s⁻¹), B (20 μmol m⁻² s⁻¹), and white (W, 80 μmol m⁻² s⁻¹) light. (B, C) Cotyledon areas of wild-type (Col-0) and *athb23* seedlings measured 5 days after germination and grown under various R (B) or FR (C) light fluence rates. The experiment was repeated four times, and representative data are shown. Data presented are means (n > 15) ±SD. Asterisks indicate significant differences between wild-type (Col-0) and *athb23* mutant seedlings using Student's *t* test (*P* < 0.05).

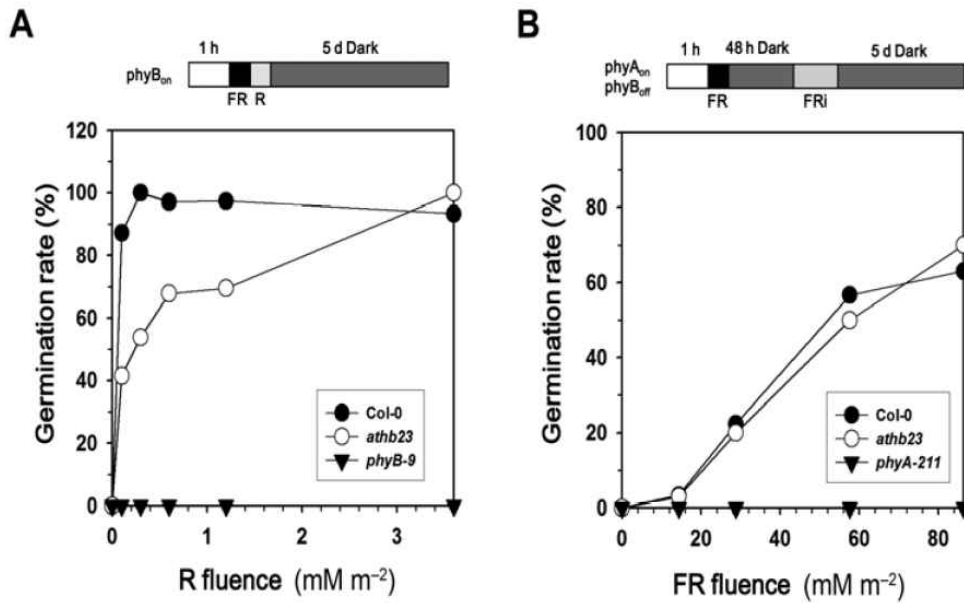


그림 42. The *athb23* mutant is defective in phyB-dependent seed germination. (A) Germination percentages of wild-type (Col-0) and *athb23* mutant seed under phyB-dependent seed germination conditions. The diagram above the graph depicts the light irradiation conditions for the experiment. Germination percentage is shown at various R light fluences (0.1 to 3.6 mmol m⁻²) that were given immediately after 5 min of FR light exposure (3 μ mol m⁻² s⁻¹). This experiment was repeated three times, and representative data are shown. Data presented are means ($n > 100$) \pm SD. phyB_{on} indicates the light condition in which phyB is activated by FR followed by R. (B) Germination percentages of wild-type (Col-0) and *athb23* mutant seeds under phyA-dependent seed germination conditions. Seeds were imbibed for 48 hours and then irradiated by various fluences of FR light (denoted as FRi, 14.4 to 86.4 mmol m⁻²). This experiment was repeated three times, and representative data are shown. Data presented are means ($n > 100$) \pm SD. phyB_{off} and phyA_{on} indicates a light condition that inactivates phyB by FR and activates phyA by FR irradiation, respectively.

제 3 절. 유용 유전자 도입 잔디 형질전환체 개발

우량 형질전환 잔디 식물의 개발에는 난지형 잔디인 들잔디(*Zoysia japonica* steud.)와 한지형 잔디인 크리핑 벤투그라스(*Agrostis stolonifera* L., cv. Pencross)를 이용하고 있다. 들잔디의 효율적인 형질전환을 위해서는 재분화 효율이 높은 캘러스의 확보가 필수적이다. 들잔디의 경우 형질전환에 이용할 수 있는 재분화 효율이 높은 배발생 캘러스의 선발에는 약 6개월 이상이 소요되며 그 캘러스도 일정기간이 지나면 재분화 효율이 낮아지거나 상실하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구팀에는 매주 새로운 종자를 과중하여 캘러스를 유도/선발하고 재분화 효율이 높은 캘러스를 확보하면서 실험을 진행하고 있다. 크리핑 벤투그라스는 들잔디에 비해 재분화 효율이 높고 형질전환이 용이한 편이어서 들잔디처럼 캘러스 선발과정을 거치지 않고 종자를 캘러스 유도 배지에 치상하고 약 4주정도 배양한 후 형질전환에 이용하고 있다. 잔디의 형질전환은 주관연구기관에서 개발한 왜성, 복합스트레스내성, 녹기연장을 유도하는 유전자를 아그로박테리움에 도입한 후 기 확립된 형질전환 방법을 이용하여 수행하고 있다. 현재까지 염 및 건조스트레스에 내성을 가지는 *AtSIZ* 유전자와 노화지연 유전자인 *ORE7*을 도입한 형질전환 식물, 그리고 녹기 연장 및 건조스트레스 내성 등의 특성을 가질 것으로 기대되는 *ATHG1*, *ATPG7*, *ATPG8* 형질전환 식물을 생산하였고, 왜성을 유도하는 *AtGA2ox4* 유전자 및 녹기 연장을 유도하는 *ATPG3*, *ATPG4* 등의 유전자를 잔디에 도입하고 있다.

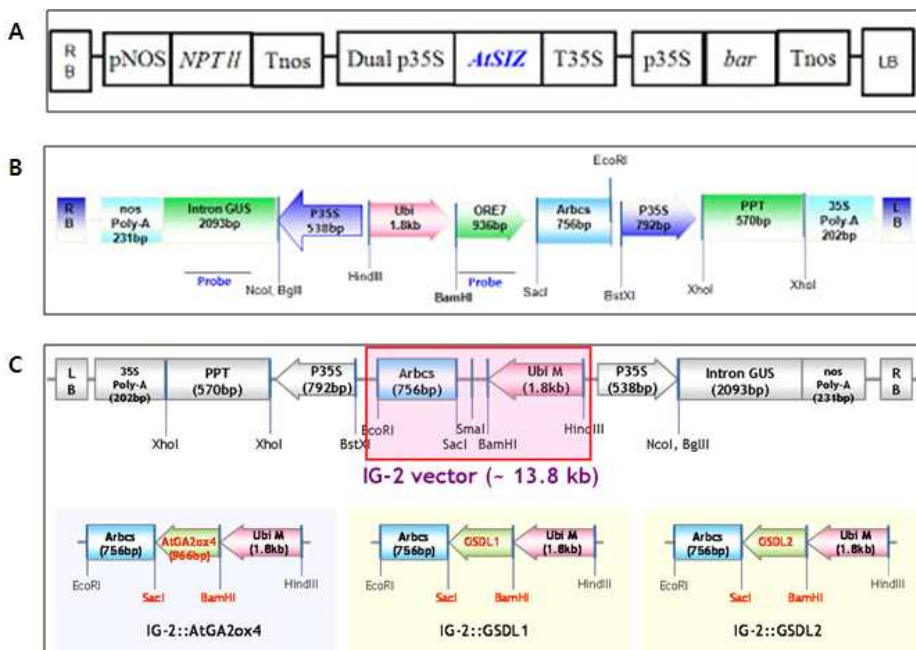


그림 43. 기확보 유전자에 대한 잔디 형질전환용 벡터 construct. A, pNB96::AtSIZ; B, IG-2::ORE7; C, IG-2::AtGA2ox4, IG-2::GSDL1(ATHG1) and IG-2::GSDL2

1. 잔디 형질전환용 벡터 construct 제작

우량 잔디 형질전환체를 개발하기 위하여 본 연구팀은 기능성 유전체 연구를 통하여 기 확보된 유전자 및 신규 유용 유전자에 대한 형질전환 벡터 construct를 제작하였다. 기 확보된 유전자에 대한 형질전환벡터는 그림 43과 같으며, 유용 유전자 및 신규 발굴한 유전자인 *ATPG2*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG8*은 항상 발현을 위해 IG-2 벡터의 Ubi 프로코터와 Arbcs 터미네이터 사이에 도입하여 형질전환에 사용하여 벡터 제작을 완료하였다(그림 44). 그리고 유용 유전자인 *ATPG6*은 현재 IG-2 벡터에 도입하고 있는 중이다.

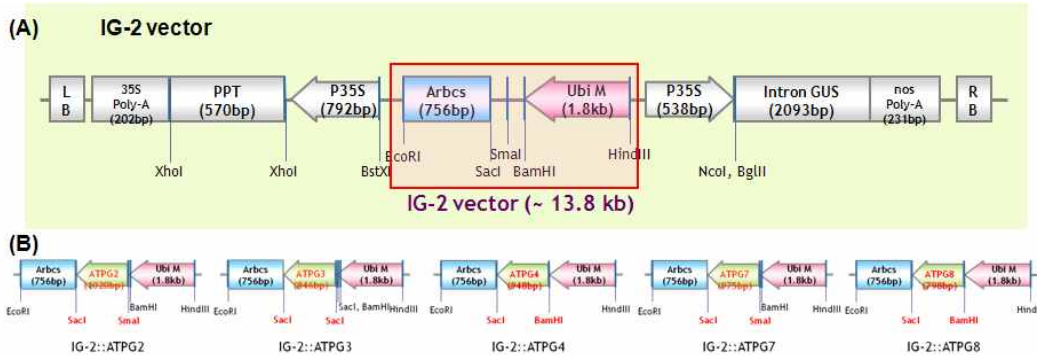


그림 44. 신규 유용 유전자에 대한 잔디 형질전환용 벡터 construct. (A) IG-2 벡터 construct, (B) IG-2 벡터의 Ubi 프로모터와 Arbcs 터미네이터 사이에 도입된 신규 유용 유전자, *ATPG2*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7* 그리고 *ATPG8*에 대한 벡터 construct. RB, right border; LB, left border; BAR, DL-phosphinothricin resistant gene; 35S, CaMV 35S promoter; T35S, terminator; Ubi M, ubiquitin promoter; Arbcs, terminator.

2. 우량 잔디 형질전환체 개발을 위한 형질전환 방법

선행연구 등을 통하여 확립된 들잔디와 크리핑 벤트그라스의 형질전환 방법을 토대로 형질전환의 재료로 사용되는 캘러스의 유도/선발, *Agrobacterium* 감염방법 및 형질전환체의 선발방법 등을 개량하면서 들잔디와 크리핑 벤트그라스의 형질전환을 수행하였다. 그림 45는 본 연구를 통하여 개량된 크리핑 벤트그라스의 형질전환 과정을 나타낸다.

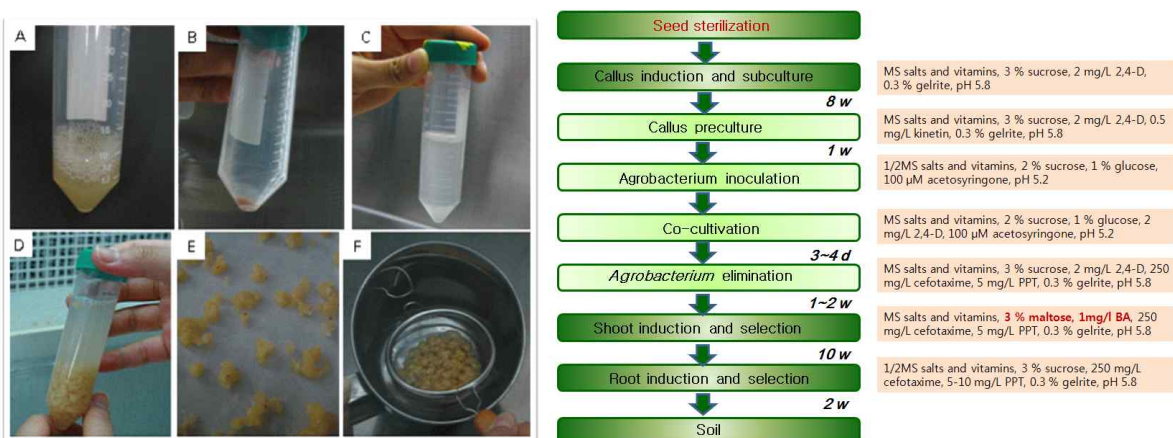


그림 45. 크리핑 벤트그라스의 개량된 형질전환 방법

3. 우량 잔디 형질전환체 개발

가. *AtSIZ* 및 *ORE7*-형질전환 잔디의 개발 및 유전자 도입 확인: 환경 스트레스에 복합적인 내성을 가지는 *AtSIZ*-형질전환 잔디는 들잔디의 완숙종자에서 선발한 배발생 캘러스를 이용하여 생산하였다. *AtSIZ* 유전자를 들잔디 캘러스에 도입하여 형질전환 후보식물을 확보한 후(그림 46A), Trait LL Test Strip(선발마커로 사용된 *bar* 유전자의 단백질 발현 분석에 사용되는 Kit)으로 형질전환 식물을 선발하고(그림 46B), genomic-PCR 을 통하여 *AtSIZ* 유전자의 도입을 확인하였다(그림 46C). 노화지연을 유도하는 *ORE7* 유전자는 현탁배양 방법을 이용하여 크리핑 벤투그라스에서 형질전환체를 생산하였다(그림 47). 1차 선발은 3mg/L phosphinothricin (PPT) 이 첨가된 shoot 유도 배지에 callus를 치상하여 지상부를 유도한 후 25°C, 광 조건에서 8-10주 동안 2-3주 간격으로 계대 배양하여 수행하였고(그림 47A-C), 여기서 선발된 지상부를 5 mg/L의 PPT가 첨가된 상기와 동일한 배지에 치상하여 2차 선발하였다(그림 47D). 선발된 지상부는 1mg/L PPT가 첨가된 뿌리유도배지에 치상하여 충분한 신장을 유도하였다(그림 47E). 신장한 식물체는 유전자 도입 유무를 확인한 후 토양에 이식하여 온실에서 재배, 증식하였다(그림 47F). *ORE7* 유전자의 도입은 Southern blot 및 genomic-PCR을 통하여 확인하였다(그림 48). 그 결과, 유전자가 도입된 위치와 도입 유전자의 copy수가 다른 3개체의 독립된 형질전환 식물이 확보되었음을 확인하였다. 1 copy의 유전자가 도입된 형질전환 식물체를 *ORE7-ox1*, 2 copy의 유전자가 도입된 형질전환 식물체들을 각각 *ORE7-ox2*, *ORE7-ox3* 이라 명명하였고 이후의 분석에 사용하였다. *ORE7* 유전자를 들잔디로 도입시키고자 상당한 노력을 기울였으나 *Agrobacterium* 감염 후 캘러스의 재분화율이 현격히 떨어져 *ORE7* 형질전환 들잔디를 생산하지 못했다(여러 번의 반복 실험에서 같은 결과가 얻어졌음). 반면 같은 캘러스를 이용하여 신규 유전자 및 *ORE7*과 같은 AT-hook family 유전자들인 *ATHG1*, *ATPG7*과 *ATPG8*을 도입하였을 경우 큰 문제없이 들잔디 형질전환체 생산이 가능하였다(해당 연구결과는 뒤에서 별도로 설명).

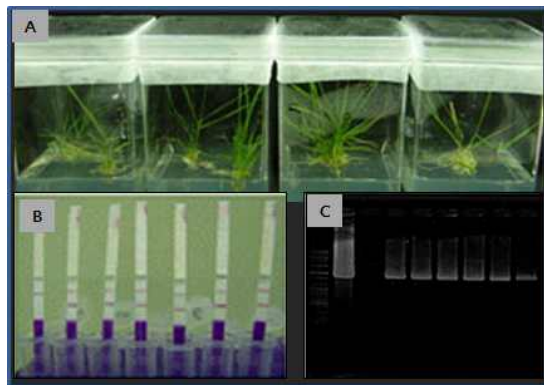


그림 46. *AtSIZ* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 유전자도입 확인

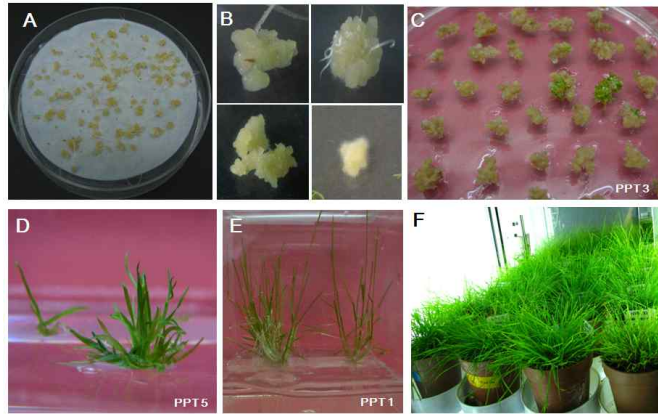


그림 47. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벤트그라스의 선발

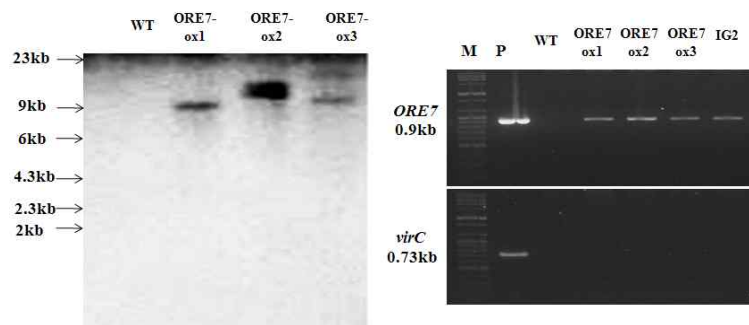


그림 48. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벤트그라스의 유전자 도입 확인

나. *AtGA2ox4*- 및 *ATHG1*-형질전환 잔디의 개발 및 유전자 도입 확인: 왜성 조절관련 유전자인 *AtGA2ox4* 유전자는 들잔디에 도입하여 형질전환체를 선발/증식하였다. *AtGA2ox4* 유전자를 도입한 들잔디는 shoot 유도 및 선발 과정을 거쳐(그림 49A) 재분화 개체들을 PPT 5 mg/L의 뿌리유도 배지에 옮겨 선발하고 있다(그림 49B). 1차년도 연구에서 *AtGA2ox4* 유전자를 도입하여 여러 개체의 형질전환 후보 식물체를 얻었으나 모든 개체에서 유전자의 도입을 확인할 수 없었다. 형질전환체의 선발 과정 중 shoot 유도 및 선발 단계에서 약 0.5cm 이상 성장한 shoot 만을 선발하였는데, *AtGA2ox4* 유전자가 도입된 형질전환체는 shoot의 성장이 억제되어 이 선발 단계에서 제외된 것이 그 이유로 추정된다. 이 결과를 바탕으로 2-3차년도 연구에서는 선발 초기 단계부터 GA_3 를 0.5-1mg/L 의 농도로 첨가한 선발 배지를 사용하여 형질전환체의 선발을 수행하고 있으나 아직 형질전환체를 얻지는 못하였다. 이 유전자 역시 *ORE7*과 같이 형질 전환이 매우 어려운 것으로 판단된다.

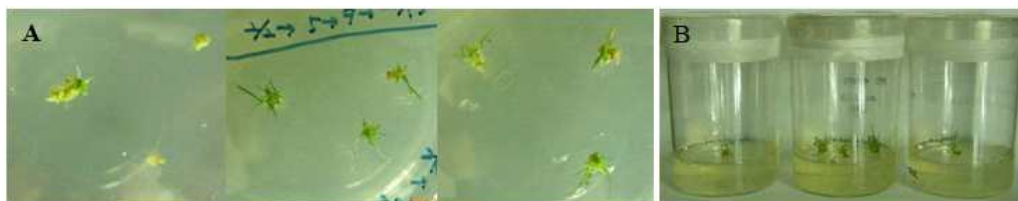


그림 49. *AtGA2ox4* 유전자가 도입된 형질전환 잔디(들잔디)의 선발

녹기 연장을 유도하는 *ATHG1* 유전자는 크리핑 벤트그라스와 들잔디에 도입하여 형질전환체를 선발하였다(그림 50-51). 크리핑 벤트그라스에서는 shoot 유도 및 선발과정을 거쳐(그림 50A) 2개체의 *ATHG1*-형질전환 식물을 확보하였고(그림 50B-C), 현재 순화(그림 50D)하여 특성을 분석하고 있다. 들잔디에서는 총 54개체의 *ATHG1*-형질전환 식물을 확보하였다(그림 51). 그림 51에서는 형질전환 식물의 일부(그림 51A)와 선발마커 유전자인 *bar* 유전자의 도입을 확인한 Trait LL Test Strip 결과(그림 51B) 및 목적 유전자인 *ATHG1* 유전자의 도입을 확인한 genomic-PCR 결과(그림 51C)의 일부를 제시하였다.

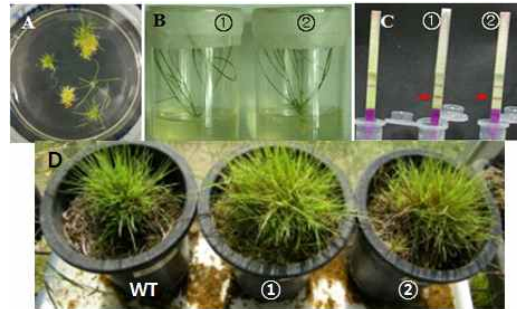


그림 50. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 크리핑 벤트그라스의 선발 및 유전자 도입 확인. A, 형질전환체의 선발; B, 형질전환체의 증식; C, 유전자 도입 확인(*bar* gene); D, 형질전환 식물의 특성분석을 위한 순화/증식

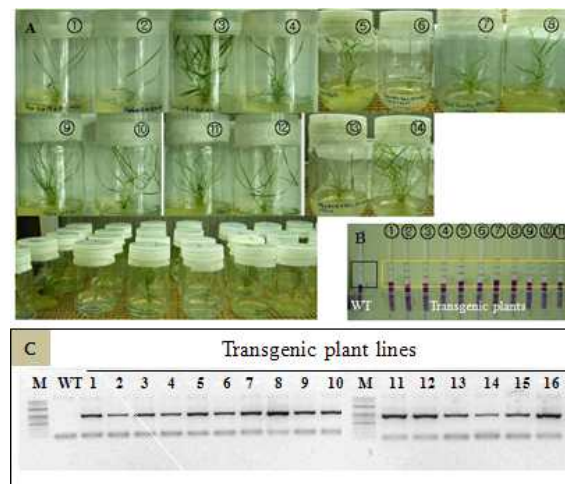


그림 51. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 유전자 도입 확인. A, 들잔디 형질전환체의 선발; B, 유전자 도입 확인(*bar* gene); C, 유전자 도입 확인(genomic-PCR, *ATHG1* 유전자)

다. *ATPG7*- 및 *ATHG8*-형질전환 잔디의 개발: 녹기를 연장할 수 있는 들잔디의 개발을 목적으로 식물의 녹기 연장 기능을 갖는 *ATPG7* 및 *ATPG8* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 식물을 제조하였다. *ATPG7* 및 *ATPG8* 유전자를 들잔디에 도입하여 다수의 형질전환 후보체를 선발하였고(그림 52, 그림 54), 현재까지 *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디 13개체와(그림 53) *ATPG8* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디 18개체를 확보하였다(그림 55).

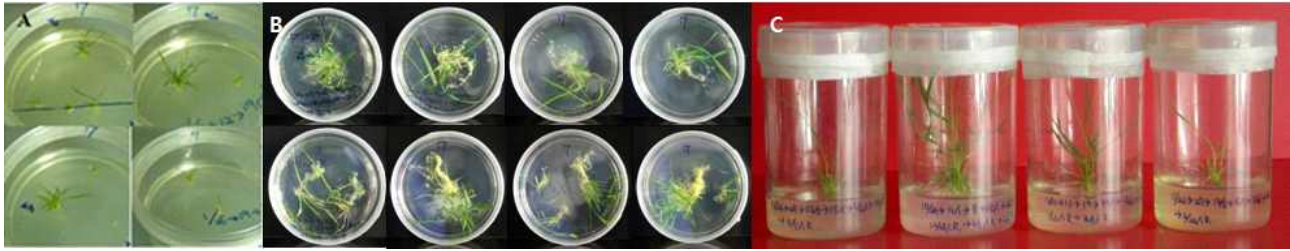


그림 52. *ATPG7* 유전자를 도입한 형질전환 들잔디의 선발

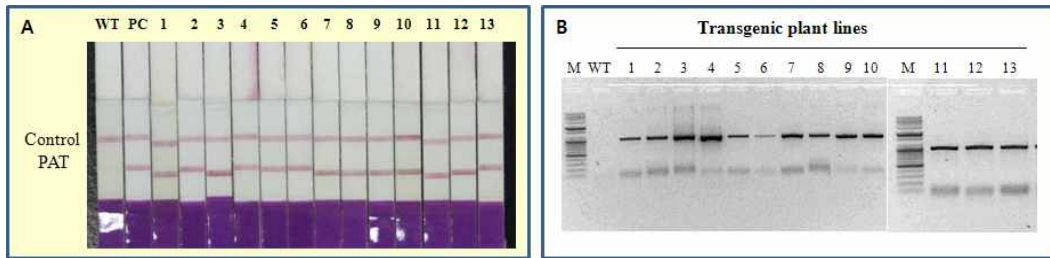


그림 53. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 유전자 도입 확인. A, Trait LL Test Strip analysis; B, genomic-PCR analysis for *ATPG7* gene; WT, Wild type; PC, positive control; 1-13, transgenic plants

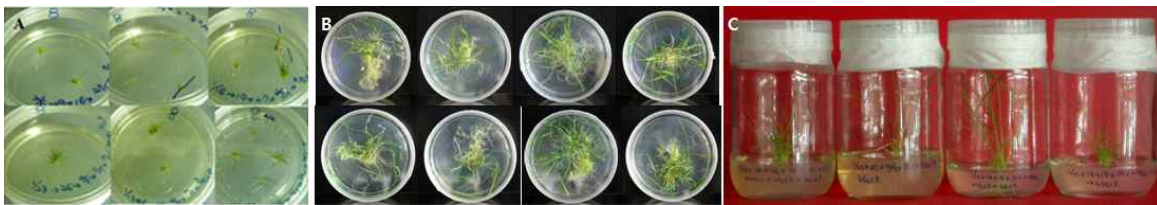


그림 54. *ATPG8* 유전자를 도입한 형질전환 들잔디의 선발

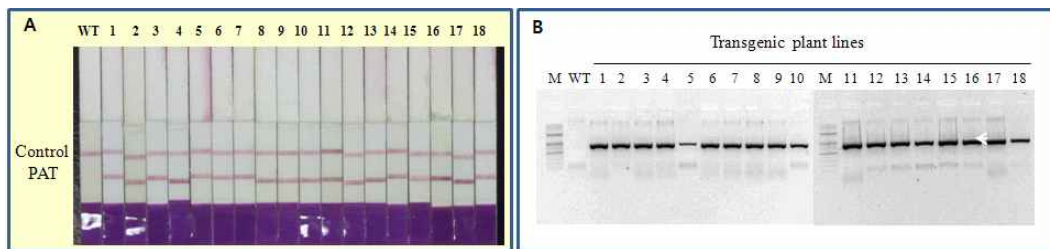


그림 55. *ATPG8* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 유전자 도입 확인. A, Trait LL Test Strip analysis; B, genomic-PCR analysis for *ATPG8* gene; WT, Wild type; 1-18, transgenic plants

라. *ATPG3*- 및 *ATPG4*-형질전환 잔디의 개발: *ORE7*, *ATPG7* 및 *ATPG8*과 같은 AT-hook family 유전자 들인 *ATPG3*과 *ATPG4* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 식물을 선발/제조하고 있다. *ATPG3* 및 *ATPG4* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 후보체를 선발 중에 있으며(그림 56A, 그림 57A), 현재까지 *ATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 식물 3개체와(그림 56B) *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 식물 2개체를 확보하였다(그림 57B). 그 외 현재 뿌

리유도배지에서 선발/증식 중인 다수의 형질전환 후보체를 확보한 상태로 ATHG1-, ATPG7- 및 ATPG8-형질전환 잔디와 같이 여러 개체의 형질전환 식물을 얻을 수 있을 것으로 예상하고 있다.



그림 56. *ATPG3* 유전자를 도입한 형질전환 들잔디의 선발(A) 및 유전자 도입 확인(B, Trait LL Test Strip analysis)

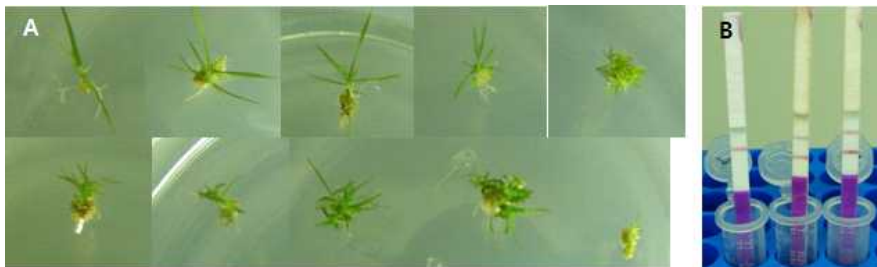


그림 57. *ATPG4* 유전자를 도입한 형질전환 들잔디의 선발(A) 및 유전자 도입 확인(B, Trait LL Test Strip analysis)

4. 형질전환 잔디의 기능 연구

가. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 식물의 발현 분석: Southern blot 및 genomic-PCR 을 통하여 목적유전자의 도입이 확인된 *ORE7*-형질전환 벤투그라스 잔디를 대상으로 목적유전자 및 선발마커 유전자의 발현분석을 실시하였다. 목표유전자의 발현여부는 RT-PCR을 통하여 분석하였으며, 발현량은 qRT-PCR을 수행하여 분석하였다. 도입된 유전자의 발현을 확인하기 위해 total RNA를 분리한 후 1차 cDNA를 합성하였고 이 cDNA를 대상으로 *ORE7* primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 형질전환 잔디에서 *ORE7* 유전자가 성공적으로 발현하고 있음이 확인되었다(그림 58A). 발현량을 비교 분석한 qRT-PCR 결과, *ORE7-ox1* 계통이 *ORE7-ox2*, *ORE7-ox3* 계통에 비해 발현량이 월등히 높은 것으로 나타났다(그림 58B). 선발 마커 유전자의 발현은 Trait LL Test Strip 및 RT-PCR을 수행하여 분석하였다. 야생형 잔디와 형질전환 잔디들을 Trait LL Test Strip을 이용하여 분석한 결과, 형질전환 식물들에서 각각 두 개의 band가 검출되었고 야생형 잔디에서는 한 개의 band만 검출되었다(그림 59A). 이 결과에서 선발마커로 사용한 *bar* 유전자가 단백질 수준에서 성공적으로 발현하고 있음을 알 수 있었다. 또한 *bar* primer를 이용하여 RT-PCR 분석을 수행한 결과에서도 *bar* 유전자가 성공적으로 발현하고 있음이 확인되었다(그림 59B).

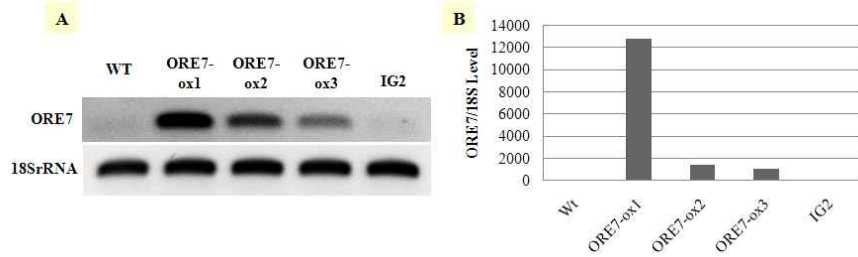


그림 58. ORE7-형질전환 벼트라스에서의 목적 유전자(*ORE7* 유전자)의 발현 확인. A, RT-PCR analysis; B, qRT-PCR analysis; WT, Wild type; *ORE7-ox1*, *ORE7-ox2* and *ORE7-ox3*, transgenic plants; IG2, vector control plant

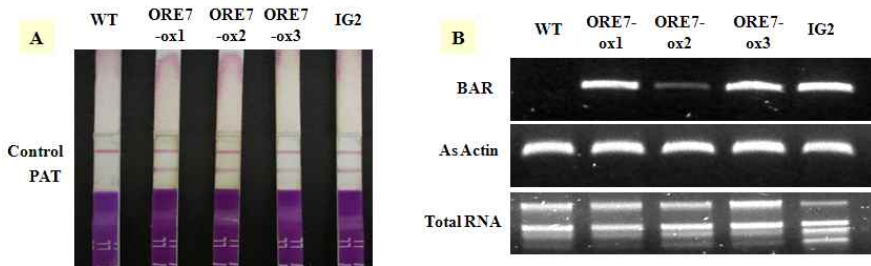


그림 59. ORE7-형질전환 벼트라스에서의 선발마커 유전자(*bar* 유전자)의 발현 확인. A, Trait LL Test Strip analysis; B, RT-PCR analysis; WT, Wild type; *ORE7-ox1*, *ORE7-ox2* and *ORE7-ox3*, transgenic plants; IG2, vector control plant

나. ORE7-형질전환 잔디의 기능 분석

① ORE7-형질전환 잔디의 가시적 표현형 분석: ORE7-형질전환 잔디의 표현형을 분석하기 위하여 형질전환 잔디를 온실에서 순화하여 증식한 후 온실의 자연조건 하에서의 노화 지연 연구를 수행하였고 일부는 제주대학교 농장에 이식한 후 증식시켜 자연 포장에서의 표현형을 관찰하였다. 그 결과, ORE7-형질전환 잔디는 야생형에 비해 왜성인 특성을 가지고 있었으며(그림 60-61), 야생형보다 노화가 상당히 지연됨을 확인할 수 있었다(그림 62).



그림 60. ORE7-형질전환 잔디와 야생형 잔디의 온실에서의 표현형 분석. WT, Wild type; *ORE7-ox1*, *ORE7-ox2*, transgenic plants

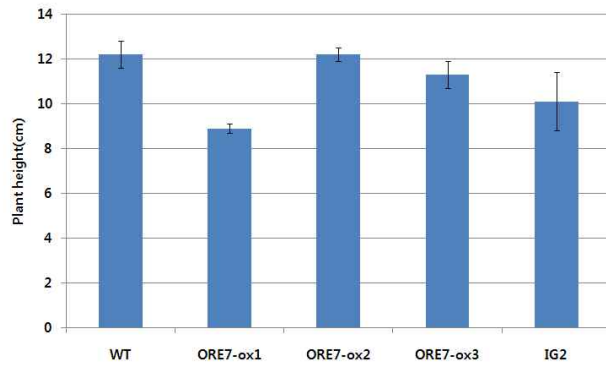


그림 61. ORE7-형질전환 잔디와 야생형 잔디의 온실에서의 표현형 분석. WT, Wild type; ORE7-ox1, ORE7-ox2 and ORE7-ox3, transgenic plants; IG2, vector control plant



그림 62. ORE7 유전자가 도입된 형질전환 벨트그라스와 야생형 잔디의 온실에서의 노화지연 실험. WT, Wild type; ORE7-ox1, ORE7-ox2, transgenic plants

② ORE7-형질전환 잔디의 심화 기능 분석 (생리·생화학적 분석): ORE7 유전자가 도입된 형질전환 잔디를 순화하여 형질전환 식물전용 온실 및 자연 포장에서 재배하여 노화관련 표현형 분석을 수행하였다. 보다 정확한 표현형 분석을 위하여 자연 포장에서 증식시킨 식물의 잎 절편을 노화를 유도하는 암 조건에 처리 후 그 변화를 관찰하였다. 그 결과, 야생형 식물은 처리 후 4일째부터 잎 절편의 노화가 관찰되었으며, 10일째에 잎 절편 전체가 노화되었다. 이와 대조적으로 형질전환 식물은 처리 후 10일째에 약간의 노화가 관찰되기는 하였으나 잎 절편의 대부분에서 녹기를 유지하고 있었으며, ORE7-ox2 계통은 20일째에 완전한 노화가 관찰 되었고 ORE7-ox1 계통은 22일째에도 녹기를 유지하는 절편이 관찰되었다(그림 63A). 광합성 효율을 측정된 결과, 야생형 식물에서는 처리 후 10일째에 광합성 효율이 40% 정도로 감소하였으며 13일째에는 20% 이하의 효율을 나타냈다. 그러나 형질전환 식물의 경우(ORE7-ox1 계통), 처리

후 10일째까지도 처리 전의 광합성 효율과 거의 같은 효율을 보였으며 처리 후 20일째에도 60% 이상의 광합성 효율을 유지하고 있었다(그림 63B). 또한 노화 관련 marker인 *CAB gene*을 이용하여 발현을 분석한 결과, 야생형 식물에서는 암 처리 후 시간이 지남에 따라 *CAB gene*의 발현량이 감소하다가 8일째에 완전히 없어진 반면, 형질전환 식물의 경우(*ORE7-ox1* 계통)에는 처리 후 12일째까지도 발현이 남아있었다(그림 64). 이들 결과에서, *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 크리스프 벤틀그라스는 야생형 식물에 비해 최소 2배 이상 노화가 지연되었음을 확인 할 수 있었다. 형질전환 계통 중 *ORE7-ox1* 계통이 *ORE7-ox2* 계통보다 노화지연 효과가 높게 나타난 것은 *ORE7-ox1* 계통이 *ORE7-ox2* 계통보다 *ORE7* 유전자의 발현량이 높은 것에서 기인한 것으로 추정된다. 본 연구팀은 *ORE7* 유전자의 대표형질인 녹기 연장에 있어서 야생형에 비해 *in vitro*에서 120% 이상의 활성을 가지는 *ORE7-ox1*과 *ORE7-ox2*를 우량 형질전환체로 선별하였으며, 이에 대한 스트레스 저항성을 조사하였다.

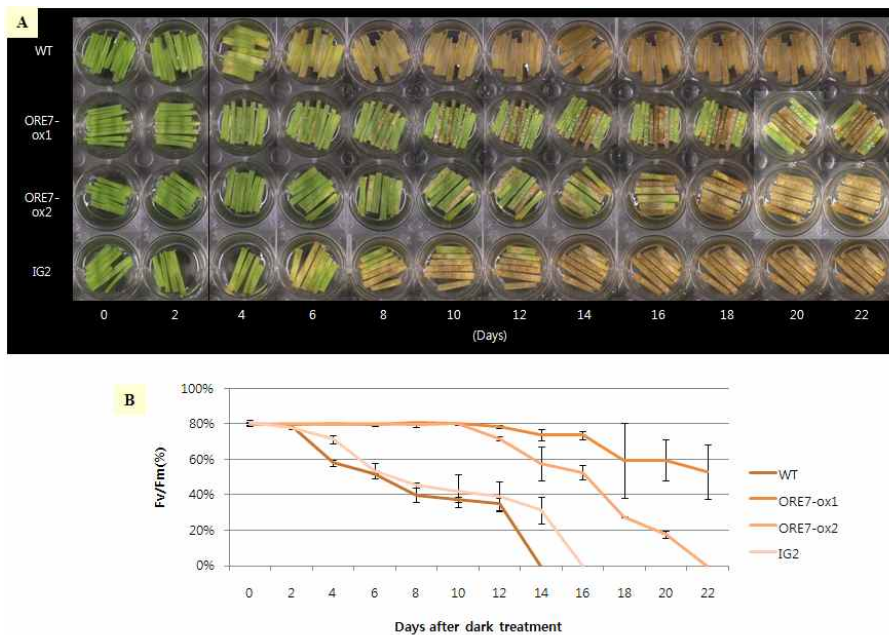


그림 63. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벤틀그라스의 특성분석. 식물의 잎 절편을 노화를 유도하는 암 조건에 처리 후 그 표현형의 변화와(A) 광합성 효율의 변화를 관찰(B)

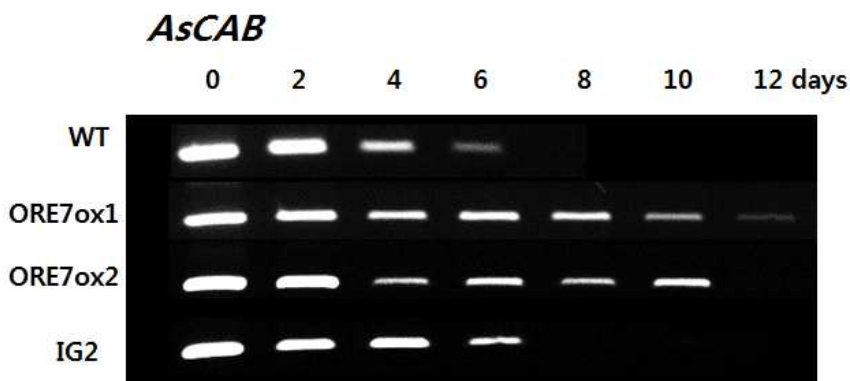


그림 64. 노화관련 marker(*AsCAB*)을 이용한 *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벤틀그라스의 발현분석. 식물의 잎 절편을 노화를 유도하는 암 조건에 처리 후 2일 간격으로 샘플링 하여 발현분석

다양한 농도의 염분 스트레스 조건에 야생형 식물과 형질전환 식물의 절편들을 8일간 암 조건에 처리하고 그 변화를 분석한 결과, 야생형 식물은 모든 처리구에서 노화가 관찰되었으나, 형질전환 식물에서는 모든 처리구에서 녹기가 남아 있는 잎 절편이 관찰되었다(그림 65A). 광합성 효율을 측정된 결과, 야생형 식물에서는 모든 처리구에서 광합성 효율이 40% 이하로 감소하였으나, 형질전환 식물의 경우(*ORE7-ox1* 계통), 모든 처리구에서 80% 이상의 광합성 효율을 유지하고 있었다(그림 65B). 이들 결과에서, *ORE7* 유전자를 도입한 형질전환 식물은 야생형 식물에 비해 염분 스트레스 조건에서도 노화가 지연됨을 확인할 수 있었다.

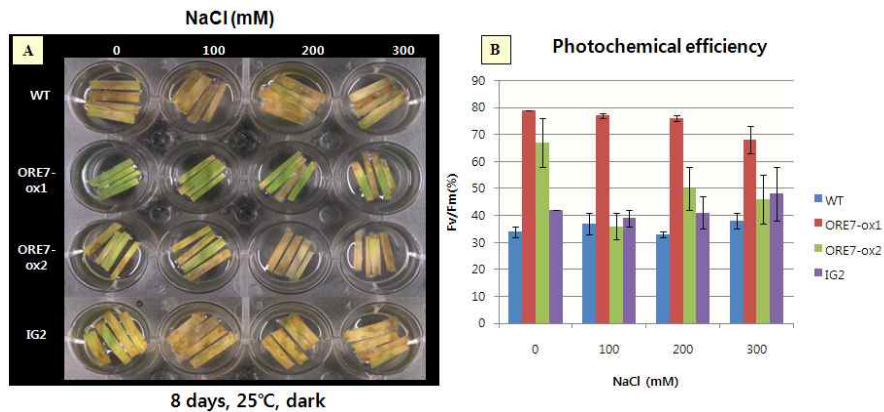


그림 65. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벤투그라스의 특성분석. 식물의 잎 절편을 0-300 mM 농도의 NaCl에 처리 후 그 표현형의 변화와(A) 광합성 효율의 변화를 측정(B)

③ **ORE7-형질전환 잔디의 포장에서의 1차 표현형 분석:** *ORE7*-형질전환 잔디의 포장에서의 표현형을 분석하기 위하여 제주시 및 서귀포시에 있는 포장에 형질전환 잔디를 이식하여 증식시켰다. 포장으로 이식 1년 후(2011. 05-06), *ORE7*-형질전환 잔디의 제주시 및 서귀포시 포장에서의 증식 양상은 비슷하였으나 두 포장 모두에서 *ORE7*-형질전환 잔디는 야생형과 다른 표현형을 나타내었다. 이에 각종 표현형의 차이를 비교 분석하였다. *ORE7*-형질전환 잔디와 야생형 잔디의 생육특성을 관찰한 결과, 야생형 잔디는 증식속도는 빠르지만 밀도가 낮은 반면, *ORE7*-형질전환 잔디는 증식속도는 느리지만 밀도가 높은 생육특성을 보였다(그림 66). 다음으로 Tiller 수를 조사한 결과, *ORE7*-형질전환 잔디는 야생형 잔디에 비하여 Tiller 수가 많음이 확인되었다(그림 67). 특히 *ORE7-ox1* 계통은 Tiller 수가 가장 많았고 엽폭이 매우 좁은 특징을 가지고 있었으며(그림 68) Node의 수가 매우 적은 표현형을 나타내었다(그림 69). Internode의 길이와 Stolon의 길이를 비교 분석한 결과, *ORE7*-형질전환 잔디는 야생형 잔디에 비하여 Internode 길이가 짧은 특성을 보였으며(그림 70) Stolon의 길이 역시 야생형에 비해 짧은 표현형적 특성을 가지고 있었다(그림 71).

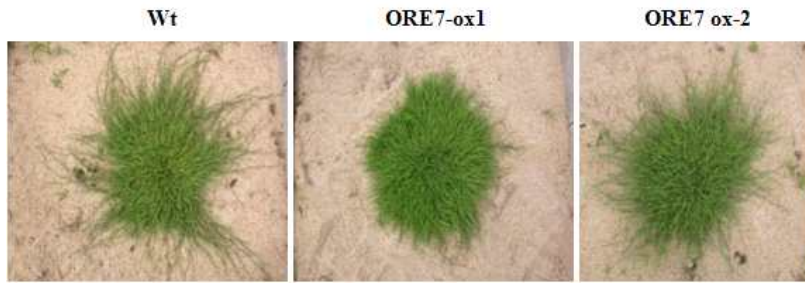


그림 66. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벨트그라스의 포장에서의 생육 특성

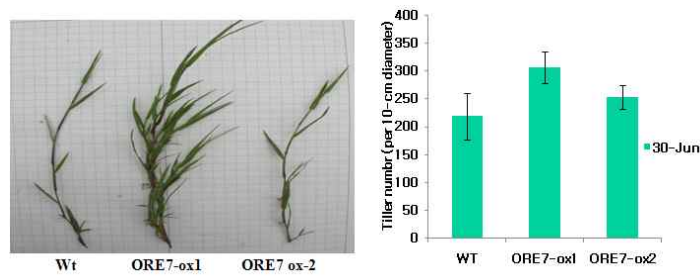


그림 67. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벨트그라스의 표현형 분석(Tiller number). WT, Wild type; *ORE7-ox1*, *ORE7-ox2*, transgenic plants

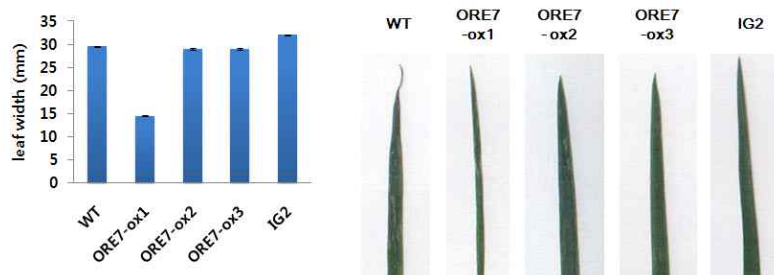


그림 68. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벨트그라스의 표현형 분석(Leaf width). WT, Wild type; *ORE7-ox1*, *ORE7-ox2* and *ORE7-ox3*, transgenic plants; IG2, vector control plant

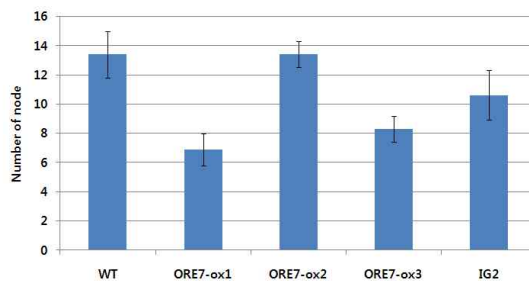


그림 69. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벨트그라스의 표현형 분석(Number of node). WT, Wild type; *ORE7-ox1*, *ORE7-ox2* and *ORE7-ox3*, transgenic plants; IG2, vector control plant

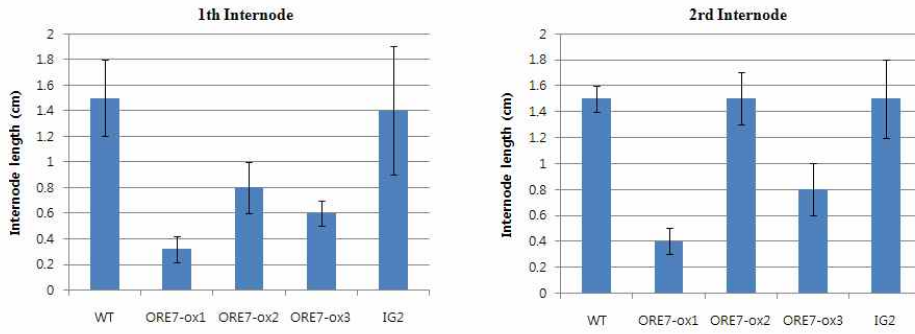


그림 70. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벼트그라스의 표현형 분석(Internode length). WT, Wild type; *ORE7-ox1*, *ORE7-ox2* and *ORE7-ox3*, transgenic plants; IG2, vector control plant

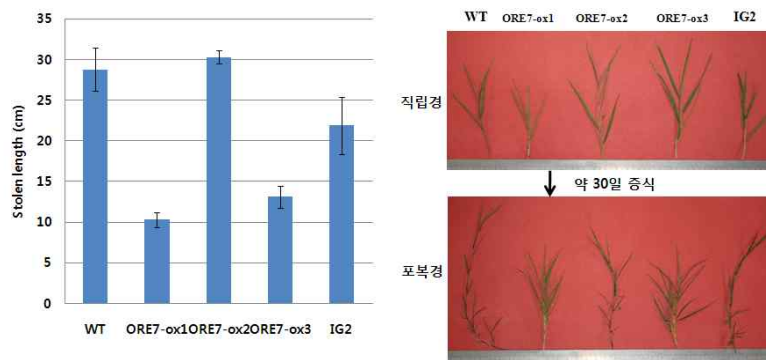


그림 71. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벼트그라스의 표현형 분석(Stolon length). WT, Wild type; *ORE7-ox1*, *ORE7-ox2* and *ORE7-ox3*, transgenic plants; IG2, vector control plant

④ *ORE7*-형질전환 잔디의 포장에서의 증식 및 우수형질 잔디 계통 선발: *ORE7*-형질전환 잔디의 우수형질 계통을 선발하기 위하여 형질전환 잔디 및 야생형 잔디를 포장에 이식하여 증식시킨 후 2년 동안 표현형을 관찰하였다. *ORE7*-형질전환 잔디는 야생형에 비하여 증식속도는 약간 느린 특성을 보였지만 증식밀도는 현저히 높았으며 노화 또한 야생형에 비하여 지연됨이 확인되었고 노화 후 회복속도도 야생형에 비해 현저히 빠른 것을 알 수 있었다(그림 72).

주목할 점은 포장에 이식하여 증식시킨 후 2차년도에 노화 후 회복 속도에 있다. 2011년 10월의 결과를 세밀히 관찰해 보면, 야생형 잔디는 아직 노화 후 표현형 회복이 거의 되지 않은 반면, *ORE7*-형질전환 잔디는 노화 후 표현형 회복이 이루어지고 있음을 알 수 있고, 특히 *ORE7-ox2* 계통은 야생형 및 *ORE7-ox1*에 비하여 노화 후 증식밀도가 매우 빠르고 높음을 확인할 수 있었다(그림 73A). 이와 같은 형질전환 잔디의 표현형적 특징을 확인하기 위하여 본 연구팀은 Tiller 생성과 형질전환 잔디의 유전자 발현 정도를 조사하였다. 노화 지연의 효과가 강하게 나타나는 *ORE7-ox1* 계통이 *ORE7-ox2* 계통보다 *ORE7* 유전자의 발현량이 높게 나타났으며(그림 74B), Tiller 생성에 있어서는 Stolon의 증식 속도가 빠른 *ORE7-ox2* 계통의 Tiller 생성이 *ORE7-ox1* 계통의 그것보다 강한 것으로 나타났다(그림 73C). 이러한 결과는 이식 후 1차년도에는 뿌리 활착의 불안정 등으로 인해 복합 스트레스가 강하게 나타나, 녹기연장 및 외적 스

트레스에 저항성을 제공하는 *ORE7* 유전자의 발현이 강할수록 생존 및 증식에 대한 표현형적 특징이 강하게 나타나지만, 이식 후 2차년도 이후에는 뿌리 활착의 안정화 등으로 정상 생육이 가능해져서 *ORE7* 유전자의 발현이 적정 수준을 유지하면 녹기 연장과 더불어 Stolon의 빠른 증식에 의한 많은 Tiller의 생성으로 증식밀도의 증가와 같은 생산성 증대 표현형질을 제공한다.

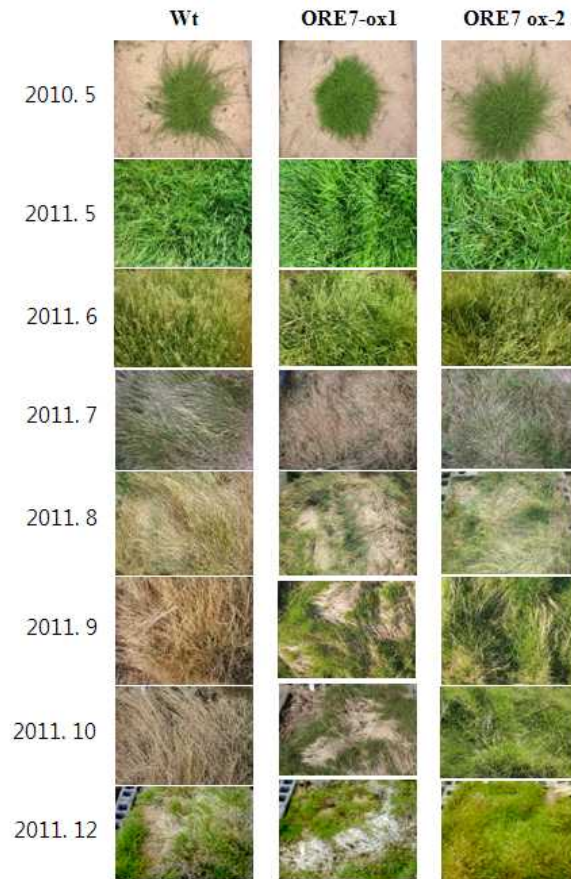


그림 72. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벨트그라스의 2년 이상 동안 포장에서의 특성 분석. WT, Wild type; *ORE7-ox1*, *ORE7-ox2*, transgenic plants

이러한 녹기연장과 tiller 생성 등과 같은 생산성 증대에 대한 농업형질이 포장에서 야생형에 비하여 120% 이상의 형질을 가지는 *ORE7-ox1*과 *ORE7-ox2* 계통을 우수 계통으로 선발하여 포장에서 증식 중에 있으며 이러한 우량 계통은 추후 이벤트를 선발을 통하여 GM 작물 안정성/위해성 평가를 진행하고자 한다. 이러한 과정을 통하여 개발된 GM 품종은 불임성으로 개량한 후 산업화에 적용하고자 한다.

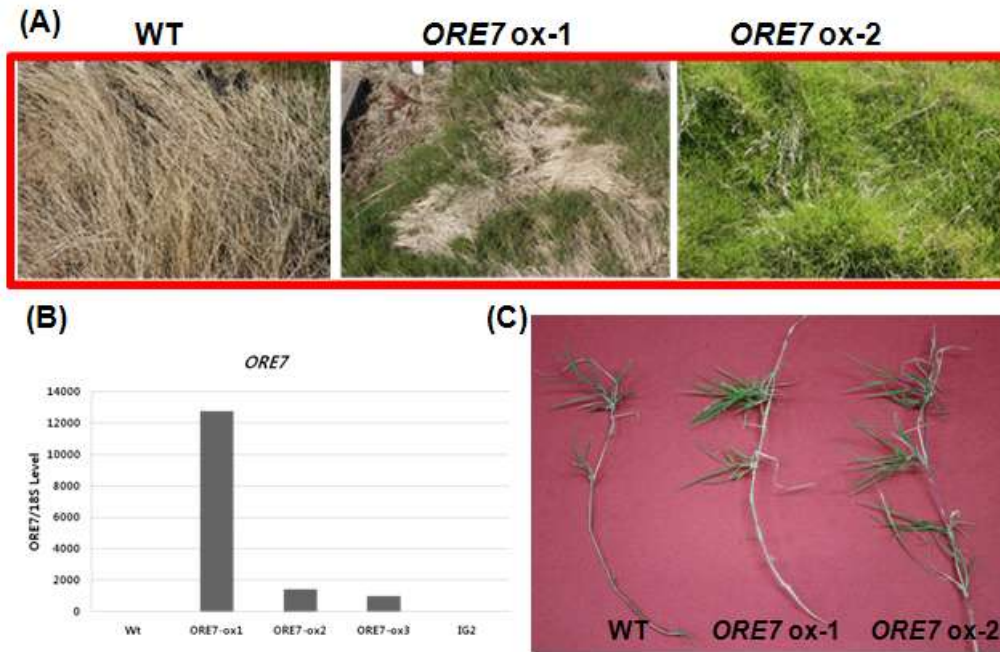


그림 73. *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벤틀그라스의 이식 후 2차년도에의 표현형 회복에 대한 포장에서의 특성 분석 (2011년 10월). (A) 표현형적 특징, (B) qRT-PCR을 통한 목적 유전자(*ORE7* 유전자)의 발현 확인, (C) Tiller 생성에 대한 표현형적 특징. WT, Wild type; *ORE7-ox1*, *ORE7-ox2*, transgenic plants; IG2, vector control plant.

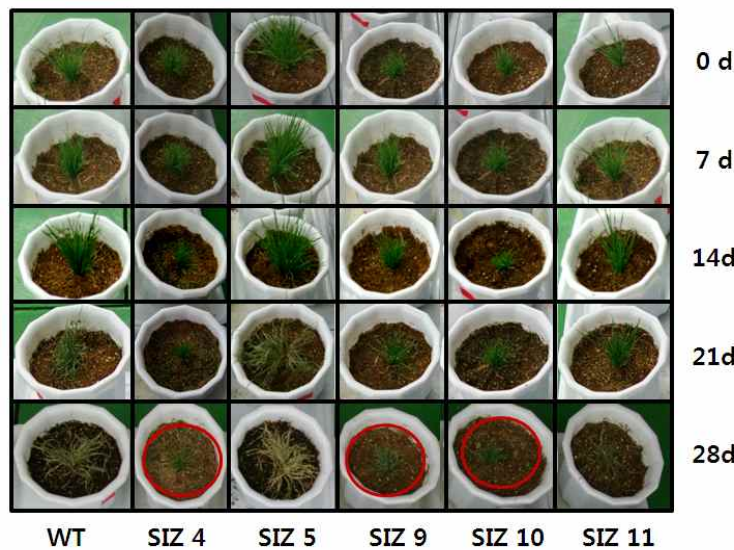


그림 74. *AtSIZ* 유전자가 도입된 형질전환 몽고잔디의 건조 스트레스 조건하에서의 표현형 관찰

다. *AtSIZ*-형질전환 잔디의 기능 분석

① *AtSIZ*-형질전환 몽고잔디의 표현형 분석: 선행연구에서 유전자의 도입과 발현을 확인한 *AtSIZ*-형질전환 몽고잔디가 환경 스트레스에 저항성을 가지는가를 확인하기 위해 건조(그림

74) 및 염(그림 75) 스트레스 조건에서 표현형을 분석하였다. 그 결과, 애기장대 유래의 *AtSIZ* 유전자를 도입한 형질전환 몽고잔디는 야생형의 몽고잔디에 비해 건조 및 염 스트레스에 대해 저항성이 증진되었음이 확인되었다. 이러한 목표 형질을 들잔디에서 확인하기 위하여 본 연구 팀은 *AtSIZ*-형질전환 들잔디를 생산하고 목표 형질에 대한 그들의 기능 분석을 수행하고 있다.

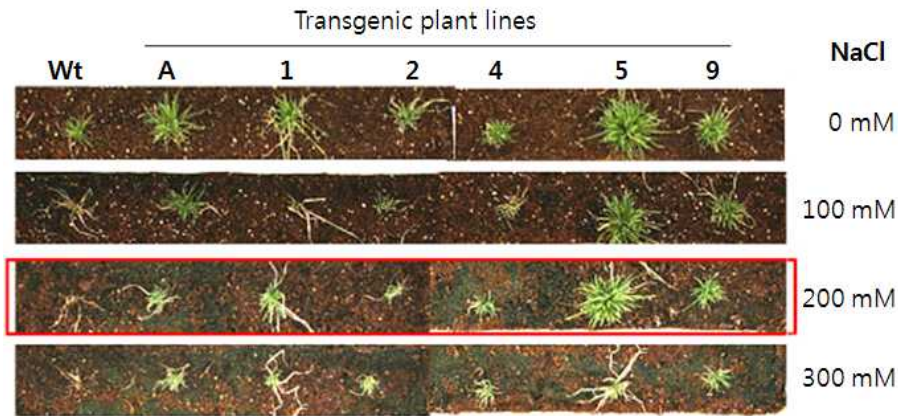


그림 75. *AtSIZ* 유전자가 도입된 형질전환 몽고잔디의 염 스트레스 조건하에서의 표현형 관찰

② *AtSIZ*-형질전환 들잔디의 기능 분석: 들잔디에서 생산한 *AtSIZ*-형질전환 잔디의 기능을 분석하기 위해 형질전환 들잔디를 온실에서 순화/증식하였다(그림 76A-B). 각종 환경스트레스 내성을 분석할 목적으로 각 형질전환 계통에서 증식된 분얼을 이용하여 개체수를 확보하였고(그림 76C) 포장에서의 표현형 및 특성을 분석하기 위해 포장에도 이식하여 증식하였다(그림 76D). 현재 온실에서 증식한 형질전환 식물을 이용하여 염, 건조 등의 스트레스에 대한 내성을 평가하여 야생형에 비하여 120% 이상의 스트레스 저항성 목표 형질을 가지는 우량 형질전환체 후보를 선발하고, 스트레스 저항성이 야생형에 비하여 120% 이상의 농업형질을 가지는 우수 계통을 포장에서 선별 및 증식하고 있으며, 또한 우수 계통에 대한 seedling 상태에서의 특성 분석을 수행할 목적으로 형질전환 잔디에서 종자를 수확 중에 있다(그림 77).

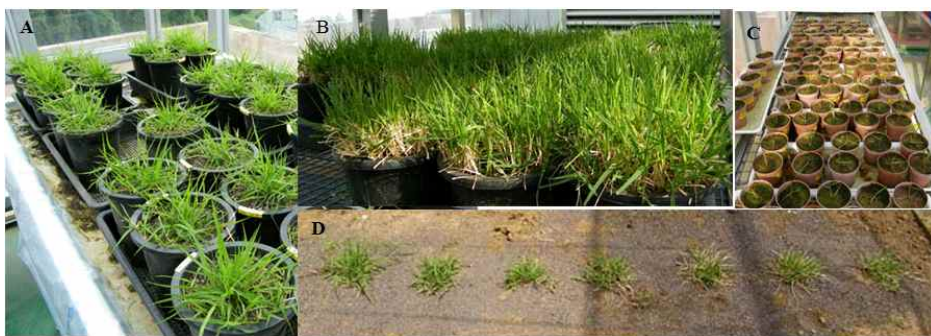


그림 76. *AtSIZ* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 특성분석을 위한 온실 및 포장에서의 증식

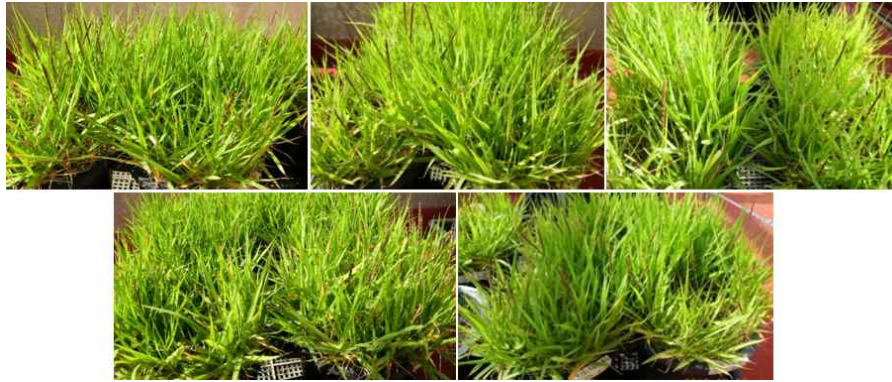


그림 77. *AtSIZ* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 특성분석을 위한 종자 확보

이후 스트레스 저항성에 대한 농업형질이 야생형에 비하여 120% 이상의 형질을 가지는 우수 계통을 포장 증식을 통하여 선별하여, 이벤트 선발 및 GM 작물 안정성/위해성 평가를 진행하고자 한다. 이러한 과정을 통하여 개발된 GM 품종은 불임성으로 개량한 후 산업화에 적용하고자 한다.

라. ATHG1-형질전환 들잔디의 기능 분석

ATHG1-형질전환 들잔디의 유전자 도입 및 발현을 확인하고(그림 78), 야생형 및 형질전환 들잔디 라인들의 잎 절편을 이용하여 노화지연 및 건조 스트레스 내성에 대한 평가를 수행하였다(그림 79-80). 그 결과 분석한 모든 개체에서 유전자의 도입 및 발현을 확인할 수 있었다. 형질전환 식물에는 single copy 유전자가 도입된 라인이 많았고(그림 78A) 1번, 2번 및 5번 라인이 3번과 4번 라인에 비해 목적유전자의 발현량이 높은 것으로 나타났다(그림 78B). ATHG1-형질전환 들잔디가 노화지연의 특성을 가지는 가를 확인하기 위해 수확 후 식물의 노화를 촉진시키는 원인의 하나로 잘 알려진 암 조건에서의 특성을 분석하였다. ATHG1-형질전환 들잔디의 잎 절편을 암 조건에 처리하고 시간경과에 따른 표현형의 변화 및 클로로필 함량의 변화를 측정하였다. 그 결과, 형질전환 식물들은 야생형과 IG-2 공벡터가 도입된 식물에 비해 노화가 지연되는 표현형적 특성을 나타내었다. 특히 형질전환 식물 1번과 2번 라인은 대조구들에 비해 2배 이상 노화가 지연되는 결과를 보였다(그림 79). 클로로필 함량의 변화를 측정한 결과에서도 1번, 2번 및 5번 라인의 형질전환 식물들은 대조구 식물들에 비해 높은 수준의 클로로필 함량을 유지하고 있었다(그림 80). 다음으로 형질전환 식물의 건조스트레스에 대한 내성을 평가하기 위해 200mM Mannitol이 첨가된 MS 고체배지에 형질전환 식물 및 대조구 식물들의 잎 절편을 치상하고 시간경과에 따른 표현형의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 형질전환 잔디 라인들은 야생형과 IG-2 공벡터가 도입된 식물들에 비해 잎의 노화가 더디게 진행됨이 관찰되었다(그림 81). 이들 결과에서 ATHG-형질전환 들잔디는 야생형 잔디에 비해 노화지연 기능 및 건조스트레스에 대한 내성이 증진되었음을 알 수 있었다. 현재 전체 식물체를 이용한 특성 분석을 수행하기 위해 제조한 54개의 형질전환 라인들 중 기내에서 충분히 증식된 30여 라인의 형질전

환 잔디를 온실에 순화하여 증식 중에 있다(그림 82). 각각의 형질전환 잔디 라인들을 충분히 증식시킨 후 ATHG1-형질전환 들잔디의 노화지연 및 건조스트레스 내성 등을 포함한 특성들을 분석할 예정이다. 또한 본 연구팀은 도입 유전자 *ATHG1*의 목표 형질인 노화 지연 및 건조 스트레스에 대하여 *in vitro*에서 120% 이상의 형질을 가지는 H1, H2 그리고 H5 형질전환체를 우량 형질전환체로 선별하였으며, 이에 대한 우수 계통 및 포장 증식을 수행하고자 한다. 우량 형질전환체 H1, H2 그리고 H5는 모두 1 copy clean 형질전환체로 우수 계통 및 이벤트 선발에 있어 많은 장점을 제공하리라 판단되며, 이러한 장점은 추후 GM 작물 안정성/위해성 평가에 있어 조속한 결과를 도출하리라 생각된다.

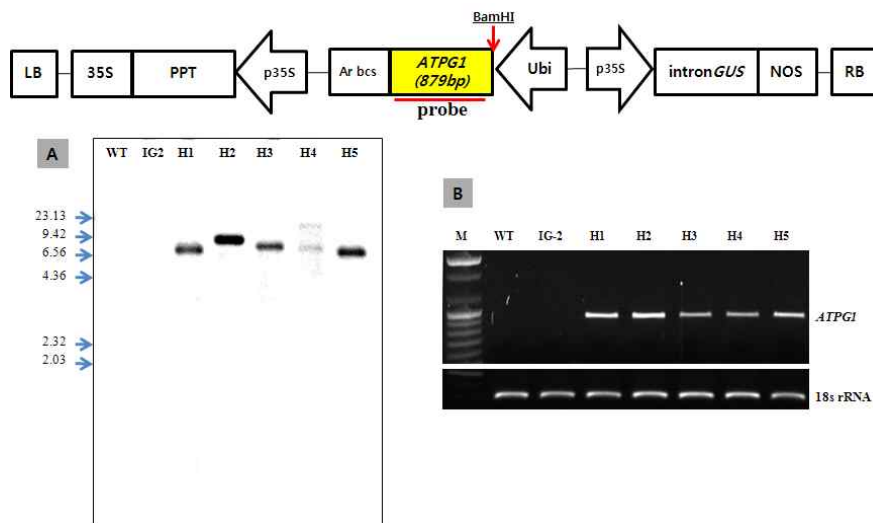


그림 78. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 유전자도입 및 발현확인



그림 79. *ATHG1*-형질전환 들잔디의 암 조건하에서 표현형 변화

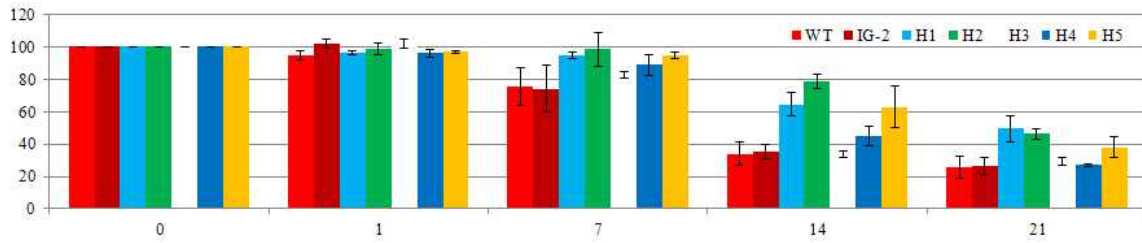


그림 80. ATHG1-형질전환 들잔디의 암 조건하에서의 클로로필 함량의 변화

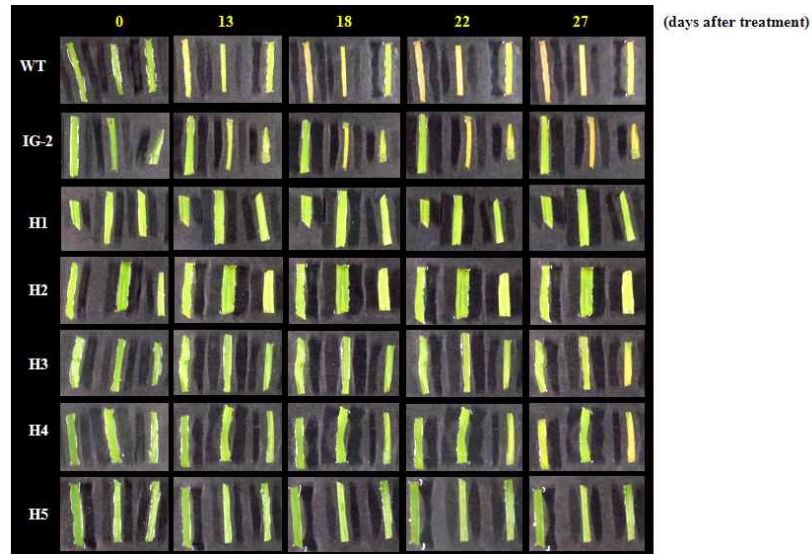


그림 81. ATHG1-형질전환 들잔디의 건조스트레스 조건하에서의 표현형 검증



그림 82. ATHG1-형질전환 들잔디의 특성분석을 위한 순화 및 증식

마. ATPG7-형질전환 들잔디의 기능 분석

ATPG7-형질전환 들잔디의 유전자의 도입을 확인하고, 야생형 및 형질전환 들잔디의 잎 절편을 이용하여 노화지연 및 건조 스트레스 내성에 대한 평가를 수행하였다(그림 83-84). ATPG7-형질전환 들잔디의 잎 절편을 암 조건에 처리하고 시간경과에 따른 표현형의 변화를 관찰한 결과,

형질전환 식물 T1, 그리고 T6번 라인을 제외한 다른 형질전환 식물들은 야생형과 IG-2 공벡터가 도입된 대조구들과 비슷한 노화양상을 나타내었다. 형질전환 T1, 그리고 T6번 라인은 대조구 및 타 형질전환 식물 라인들에 비해 노화가 지연되는 표현형적 특성을 나타내었다(그림 83). 이 결과에서 *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 식물의 노화지연 효과는 앞에서 설명한 *ORE7* 유전자나 *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 식물에 비해 크지 않았으나 여전히 대조구에 비하여 120% 이상의 형질을 가지는 것으로 나타났다. *ATHG1* 및 *ORE7*에 비하여 약한 목표형질의 원인을 확인하기 위해서는 형질전환 식물에서의 목적유전자의 발현량 분석, 더 많은 형질전환 라인을 이용한 분석 및 반복 실험 등이 필요할 것으로 판단된다. 다음으로 *ATPG7*-형질전환 식물의 건조 스트레스에 대한 내성을 평가하기 위해 200mM Mannitol이 첨가된 MS 고체 배지에 형질전환 식물 및 대조구 식물들의 잎 절편을 치상하고 시간경과에 따른 표현형의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 5번 라인을 제외한 형질전환 잔디들은 야생형과 IG-2 공벡터가 도입된 식물들에 비해 잎의 노화가 더디게 진행됨이 관찰되었다(그림 84). 이들 결과에서 *ATPG7*-형질전환 들잔디는 노화지연보다는 건조스트레스에 대한 내성이 더 크게 증진되었음을 알 수 있었다. 본 연구팀은 상기의 형질전환 라인 중 도입 유전자 *ATPG7*의 목표형질인 노화지연 및 건조 스트레스에 대하여 *in vitro*에서 120% 이상의 형질을 가지는 T1과 T6 형질전환 라인을 우량 형질전환체로 선별하였으며, 보다 많은 우량 형질전환체를 확보하기 위하여 제조한 13개의 형질전환 식물 라인들을 온실에서 순화하여 증식 중에 있다(그림 85). 각각의 형질전환 잔디 라인들을 충분히 증식시킨 후 *ATPG7*-형질전환 들잔디의 노화지연 및 건조스트레스 내성 등을 포함한 특성들을 분석해 나갈 것이다.

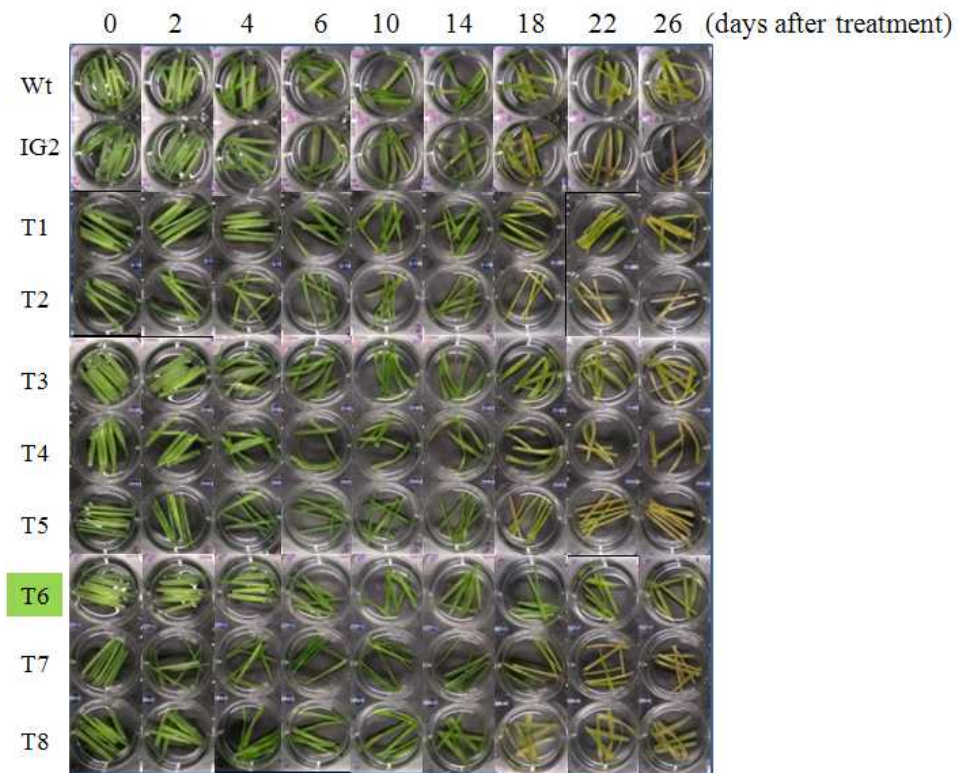


그림 83. *ATPG7*-형질전환 들잔디의 암 조건하에서 표현형 검증

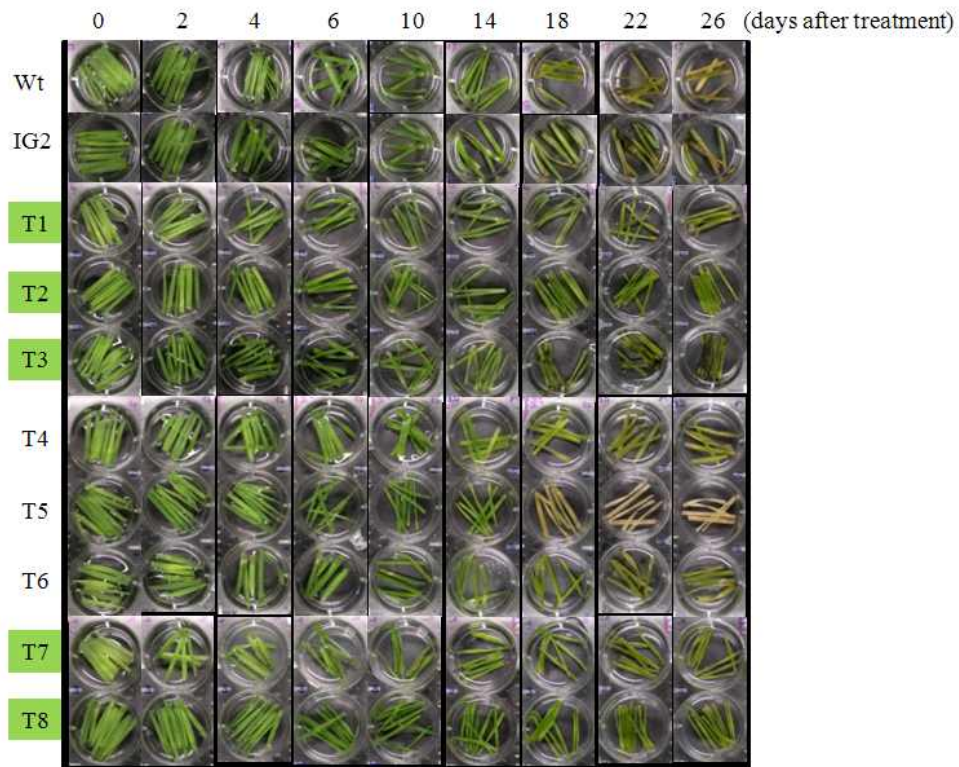


그림 84. ATPG7-형질전환 들잔디의 건조스트레스 조건하에서의 표현형 검증



그림 85. ATPG7-형질전환 들잔디의 특성분석을 위한 순화 및 증식

바. ATPG8-형질전환 들잔디의 기능 분석

유전자의 도입이 확인된 ATPG8-형질전환 들잔디의 노화지연 및 건조 스트레스 내성에 대한 평가를 수행하였다(그림 86-87). ATPG8-형질전환 들잔디의 잎 절편을 암 조건에 처리하고 시간 경과에 따른 표현형의 변화를 관찰한 결과, 형질전환 식물 1번, 2번 및 4번 라인是大조구 및 타 형질전환 식물 라인들에 비해 노화가 지연되는 표현형적 특징을 나타내었으나(그림 86), *ORE7* 유전자나 *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 식물들의 노화지연 효과 보다는 크지 않았다. 다음으로 ATPG8-형질전환 식물의 건조스트레스에 대한 내성을 평가하기 위해 200mM Mannitol이 첨가된 MS 고체배지에 형질전환 식물 및 대조구 식물들의 잎 절편을 치상하고 시

간경과에 따른 표현형의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 형질전환 식물 1번, 3번 및 5번 라인에서 야생형과 IG-2 공벡터가 도입된 식물들에 비해 잎의 노화가 매우 더디게 진행됨이 관찰되었다 (그림 87). 이들 결과에서 ATPG8-형질전환 들잔디는 ATHG7-형질전환 들잔디와 비슷하게 노화 지연보다는 건조스트레스에 대한 내성이 더 크게 증진되었음을 알 수 있었다. 본 연구팀은 상기의 형질전환 라인 중 도입 유전자 *ATPG8*의 목표 형질인 노화 지연 및 건조 스트레스에 대하여 *in vitro*에서 120% 이상의 형질을 가지는 T1 형질전환 라인을 우량 형질전환체로 선별하였으며, 보다 많은 우량 형질전환체를 확보하기 위하여 제조한 18개의 형질전환 식물 라인들을 온실에서 순화하여 증식 중에 있다(그림 88). 각각의 형질전환 잔디 라인들을 충분히 증식시킨 후 ATPG8-형질전환 들잔디의 노화지연 및 건조스트레스 내성 등을 포함한 특성들을 분석해 나갈 것이다.

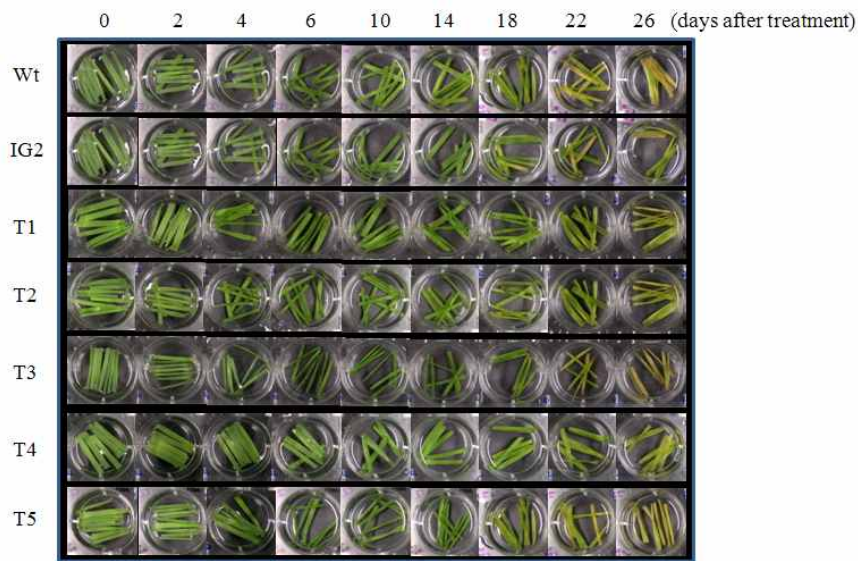


그림 86. ATPG8-형질전환 들잔디의 암 조건하에서 표현형 검증

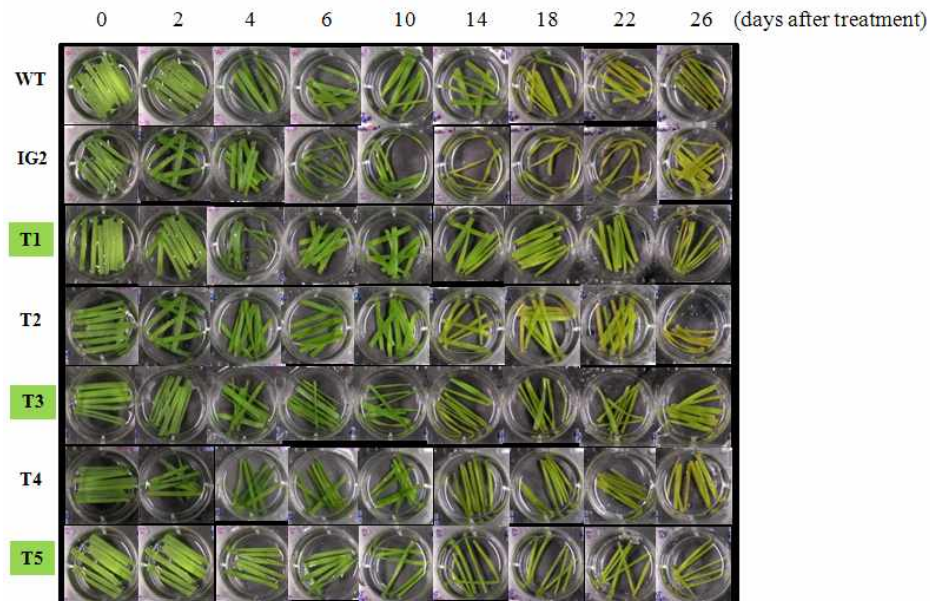


그림 87. ATPG8-형질전환 들잔디의 건조스트레스 조건하에서의 표현형 검증



그림 88. ATPG8-형질전환 들잔디의 특성분석을 위한 순화 및 증식

5. DEG (Differentially Expressed Gene) screening을 통한 노화 특이적 마커의 선발

잔디의 노화특이 마커의 선발을 위해 DEG (Differentially Expressed gene) 기법을 이용해 정상 잎과 노화가 진행된 잎의 특이 발현 유전자를 탐색하였다(그림 89). Total RNA는 정상 잎과 노화가 반 정도 진행되어진 잎에서 Trizol(Invitrogen)을 사용하여 추출하였다. 정상 잎과 노화가 진행된 잎의 total RNA로부터 1차 cDNA는 GeneFishing kit(Seegene)에서 제공하는 ACP(annealing control primer)를 사용하여 Reverse Transcription System(Promega)을 통해 합성하였다. 각각의 sample에서 합성된 1차 cDNA는 특이적 DEG 선별을 위해 GeneFishing kit에서 제공하는 20종의 arbitrary ACT primer로 PCR을 수행하여 특이 발현 유전자를 선별하였다. 실험결과 120개의 arbitrary primer set로부터 정상 잎(Green stage)에서 발현이 높은 40개의 DEG를 분리하였으며(Table 2), 노화진행 잎(half yellowing stage)에서 발현이 높은 47개의 DEG를 분리하였다(Table 3). 각 DEG 유전자들의 염기서열을 결정한 후 database를 이용하여 각 clone들을 분석한 결과 정상적인 잎에서는 unknown protein이 4 clones, hypothetical protein이 9 clones, No Significant similarity가 15 clones이 나왔다. 특히 정상적인 잎에서는 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit, putative ribosomal protein S3, Fructose-1,6-bisphosphatase, cytochrome f, PSI reaction center subunit II, PL3K2 Jacalin-like lectin domain, ubiquitin-conjugating enzyme, retrotransposon protein, photosystem I P700 apoprotein A2, ATP synthase CF0 C subunit과 유사성이 있는 clone들이 분리되었다(Table 2). 노화가 진행된 잎에서는 unknown protein이 2 clones, hypothetical protein이 2 clones, No Significant similarity가 28 clones이 나왔으며 ubiquitination을 control하는 regulator gene인 RING-H2 finger protein ATL2K와 legumain, esterase precursor SGNH-family of hydrolases, plasma membrane H⁺-transporting ATPase-like protein, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases, expansin EXPA5, cytochrome f, glycine-rich protein, RNA binding / hydrolase, acting on ester bonds / protein binding / transcription elongation regulator, temperature-induced lipocalin, SKP1-like protein, senescence-associated protein, RNA-dependent RNA polymerase 와 유사성이 있는 clone들이 분리되었다(Table 3).

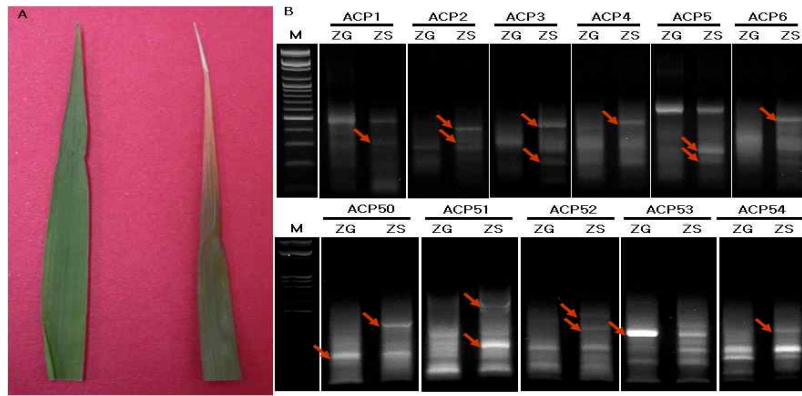


그림 89. 정상 잎과 노화진행 잎의 cDNA로부터 얻어낸 DEG screening의 결과. (A) 실험에 사용된 정상 잎 (Green stage)과 노화진행 잎 (half-yellow stage). B. 정상저인 잎과 노화가 진행된 잎의 특이 발현 DEG. ZG : Zoysiagrass Green Leaf, ZS : Zoysiagrass Senescence Leaf

Table 2. 정상적인 잎에서 얻어진 DEG clone의 염기서열 분석결과

Clone	Size (bp)	Organism and cDNA homology (accession number)	Score	Evalue	Identity
19ZG1(24-1)	133	No significant similarity			
21ZG1(28-3)	472	hypothetical protein [<i>Zea mays</i>] (NP_001140763.1)	72.4	2e-11	75%
24ZG1(31-1)	289	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit [<i>Solanum tuberosum</i>] (ABY21255)	35.4	2.4	83%
23ZG1(75-2)	122	No significant similarity			
31ZG3(94-1)	75	hypothetical protein [<i>Sorghum bicolor</i>] (XP_002456615)	44.7	0.004	100%
37ZG3(114-1)	83	putative ribosomal protein S3 [<i>Vigna unguiculata</i>] (CAO02550)	55.8	2e-06	100%
45ZG2(140-5)	131	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic, putative [<i>Ricinus communis</i>] (XP_002532434)	38.9	0.22	100%
48ZG1(149-2)	122	No significant similarity			
48ZG1(149-3)	156	No significant similarity			
49ZG1(152-3)	249	cytochrome f [<i>Anomachloa marantoides</i>] (YP_003587680)	164	3e-39	100%
49ZG2(153-2)	81	No significant similarity			
49ZG3(154-2)	87	No significant similarity			
43ZG2(131-2)	211	hypothetical protein Osl_32249 [<i>Oryza sativa</i> Indica Group] (EAO29950)	55.1	3e-06	74%
43ZS2(134-1)	160	No significant similarity			
44ZG1(135-1)	232	No significant similarity			
53ZG1(167-1)	250	unknown [<i>Zea mays</i>] (ACR38454)	139	2e-31	88%
60ZG1(180-1)	97	hypothetical protein [<i>Sorghum bicolor</i>] (XP_002489102)	59.3	2e-07	90%
66ZG1(190-1)	118	No significant similarity			
67ZG1(192-3)	263	No significant similarity			
71ZG1(201-2)	262	PSI reaction center subunit II [<i>Citrus sinensis</i>] (BAF80475)	102	2e-20	90%
76ZG1(209-1)	63	No significant similarity			
78ZG1(212-2)	163	unknown protein [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group] (AAV44205)	88.6	2e-16	88%
84ZG2(227-5)	85	hypothetical protein SORBIDRAFT_03g039445 [<i>Sorghum bicolor</i>] (XP_002456615)	53.1	1e-05	100%
87ZG1(242-1)	311	PL3K2, Jacalin-like lectin domain, hypothetical protein [<i>Zea mays</i>] (NP_001106057)	34.7	4.0	73%
87ZG2(243-1)	176	unknown protein [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group] (AAV44205)	108	2e-22	98%
88ZG1(245-4)	436	ubiquitin-conjugating enzyme [<i>Triticum aestivum</i>] (AAU82109)	162	1e-38	100%
89ZG1(246-1)	310	retrotransposon protein [<i>Oryza sativa</i> Indica Group] (ABR26094)	112	2e-23	100%
93ZG1(259-1)	218	hypothetical protein ZeamMp158 [<i>Zea mays</i>] (YP_588403)	59.3	2e-07	100%
93ZG2(260-3)	99	No significant similarity			
97ZG1(267-3)	211	unknown [<i>Zea mays</i>] (ACR35385)	54.3	3.0	100%
100ZG2(274-1)	90	No significant similarity			
101ZG2(278-1)	146	No significant similarity			
103ZG1(282-3)	301	photosystem I P700 apoprotein A2 [<i>Agrostis stolonifera</i>] (YP_874735)	200	6e-50	97%
106ZG1(294-3)	139	hypothetical protein [<i>Sorghum bicolor</i>] (XP_002489117)	76.3	6e-14	94%
110ZG1(303-1)	176	ATP synthase CFO C subunit [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (NP_051046)	106	8e-22	100%
110ZG2(304-1)	177	ATP synthase CFO C subunit [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (NP_051046)	106	8e-22	100%
110ZG4(306-1)	176	ATP synthase CFO C subunit [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (NP_051046)	106	8e-22	100%
118ZG1(330-2)	205	No significant similarity			
120ZG1(339-2)	228	hypothetical protein SORBIDRAFT_0285s002020 [<i>Sorghum bicolor</i>] (XP_002489041)	132	2e-29	91%
120ZG2(340-4)	68	hypothetical protein SORBIDRAFT_0351s002020 [<i>Sorghum bicolor</i>] (XP_002489033)	53.1	1e-05	100%

Table 3. 노화가 진행된 앞에서 얻어진 DEG clone의 염기서열 분석결과

Clone	Size (bp)	Organism and cDNA homology (accession number)	Score	Evalue	Identity
1ZS1(1-1)	235	No significant similarity			
3ZS1(4-1)	369	No significant similarity			
3ZS3(41-1)	327	RING-H2 finger protein ATL2K [<i>Zea mays</i>] (NP_001148308)	54.3	5e-06	73%
5ZS1(7-2)	223	legumain [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare] (CAQ0099)	71.2	4e-11	73%
6ZS1(9-3)	329	esterase precursor,SGNH-family of hydrolases [<i>Zea mays</i>] (NP_001151338)	40.4	0.076	80%
6ZS1-4	400	plasma membrane H ⁺ -transporting ATPase-like protein [<i>Zea mays</i>] (AAM14442)	40.4	0.075	100%
6ZS2-2	236	No significant similarity			
19ZS1(25-1)	100	No significant similarity			
20ZS1(27-1)	271	No significant similarity			
21ZS1(29-2)	270	No significant similarity			
23ZS1(30-2)	62	No significant similarity			
27ZS1(34-1)	409	hypothetical protein, Ion transport protein [<i>Sorghum bicolor</i>] (XP_002447205)	121	3e-26	84%
11ZS2(53-1)	272	No significant similarity			
10ZS2(60-1)	369	MPBQ methyltransferase, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases [<i>Triticum aestivum</i>] (CAX36917)	50.8	6e-05	91%
15ZS1(63-1)	99	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>] (CAN72686)	58.2	3e-07	100%
21ZS1(74-1)	231	No significant similarity			
25ZS2(79-1)	350	No significant similarity			
25ZS3(80-2)	157	No significant similarity			
32ZS1(99-1)	425	expansin EXPAS1 [<i>Triticum aestivum</i>] (AAS48874)	258	1e-67	83%
38ZS1(117-2)	334	No significant similarity			
41ZS3(123-1)	24	No significant similarity			
41ZS5(125-1)	129	No significant similarity			
49ZS1(155-3)	252	cytochrome f [<i>Anomochloa marantoides</i>] (YP_003587680)	167	5e-40	100%
49ZS2(156-1)	119	cytochrome f [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group] (AAS46130)	79.7	1e-13	100%
49ZS3(157-5)	75	No significant similarity			
50ZS1(159-1)	299	No significant similarity			
51ZS2(162-1)	172	glycine-rich protein [<i>Daucus carota</i>] (AAB01097)	35	3.1	43%
52ZS1(164-3)	147	No significant similarity			
54ZS1(170-1)	293	No significant similarity			
54ZS2(171-4)	152	No significant similarity			
55ZS2(165-1)	294	No significant similarity			
56ZS1(176-2)	72	No significant similarity			
60ZS1(181-1)	258	RNA binding / hydrolase, acting on ester bonds / protein binding / transcription elongation regulator [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (NP_176510)	60.1	9E-08	51%
61ZS1(182-1)	448	temperature-induced lipocalin [<i>Saccharum officinarum</i>] (ABB02391)	124	5e-27	93%
68ZS1(197-1)	71	No significant similarity			
97ZS1(269-4)	229	unknown [<i>Zea mays</i>] (ACR35385)	54.3	3.0	100%
98ZS1(271-1)	365	SKP1-like protein 1A [<i>Zea mays</i>] (ACG31014)	80.5	6e-14	97%
100ZS2(276-2)	156	No significant similarity			
103ZS3(287-2)	157	senescence-associated protein [<i>Picea abies</i>] (ACA04850.1)	88.6	2e-16	83%
108ZS3(301-1)	60	No significant similarity			
109ZS1(302-1)	276	hypothetical protein ARALYDRAFT_494434 [<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>] (XP_002863475)	36.6	1.1	30%
111ZS2(309-1)	153	No significant similarity			
111ZS4(311-2)	188	No significant similarity			
116ZS2(324-4)	105	No significant similarity			
117ZS1(328-2)	236	No significant similarity			
118ZS2(332-2)	853	RNA-dependent RNA polymerase [<i>Trichomonas vaginalis</i> virus 2] (AAF29445)	38.1	1.3	38%
120ZS1(341-1)	237	unknown [<i>Zea mays</i>] (ACN33508.1)	58.2	3e-07	76%

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1차 연도 (2010)	고부가 잔디 적용 유용 유전자 발굴	기능성 유전체 연구를 통한 유용 유전자 발굴 및 기능검정 (1종)	· 기능성 유전체 연구를 통한 변이체 로부터 잔디 적용 표현형질 변이체 선별 - 녹기연장 및 생산성 증대 변이체 선별 - Freezing tolerance를 가지는 변이체 선별	100
			· 변이체로부터 신규 유용 유전자 발 굴 및 기능검정 (3종) - <i>ATPG2</i> , <i>ATPG8</i> , <i>DDF1</i>	300
			· 신규 및 유용 유전자 형질전환용 벡터 construct 제작 (3종) - <i>ATPG2</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i>	추가 진행
	우량 잔디 형질전환체 개발	잔디 형질전환 및 형질전환체 생산 (4종)	· 우량 잔디 형질전환체 계통 다수 확보를 위한 잔디 형질전환 수행 (<i>ORE7</i> 및 <i>AtSIZ</i> 유전자가 도입된 잔 디 형질전환체 지속적 생산)	100
			· <i>AtGA2ox4</i> 유전자의 잔디 형질전환 체 생산 및 형질전환체 선별	100
			· <i>ATHG1</i> 유전자의 잔디 형질전환체 생산 및 형질전환체 선별	100
	형질전환 잔디의 기능 분석	형질전환 잔디의 유전자 발현 분석	· <i>ORE7</i> 및 <i>AtSIZ</i> 잔디 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석 (PAT strip test, PCR, RT-PCR, Southern blot등)	100
			· 생산된 <i>ORE7</i> 잔디 형질전환체의 표현형 분석 실시 (자연노화, 암처리 에 의한 노화유도, 스트레스에 의한 노화유도 조건에서 노화 표현형 분 석)	100
		형질전환 잔디 기능 분석	· 생산된 <i>AtSIZ</i> 잔디 형질전환체의 표 현형 분석 실시 (염, 건조 등의 스트 레스 조건에서 표현형 분석)	
	· 잔디 노화 분자마커 탐색 실시			

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
2차 년도 (2011)	고부가 잔디 적용 유용 유전자 발굴	기능성 유전체 연구를 통한 유용 유전자 발굴 및 기능검정 (2종)	· 기능성 유전체 연구를 통한 변이체로 부터 잔디 적용 표현형질 변이체 선 별 - 녹기연장 및 생산성 증대 변이체 선별 - Freezing tolerance를 가지는 변이체 선별	100
			· 변이체로부터 신규 유용 유전자 발굴 및 기능검정 (총 4종) - <i>ATPG2</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG8</i> , <i>DDF1</i>	130
			· 신규 및 유용 유전자 형질전환용 벡 터 construct 제작 (총 5종) - <i>ATPG2</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i>	200
	우량 잔디 형질전환체 개발	잔디 형질전환 및 형질전환체 생 산 (4건) (1-2차년도 총 6건)	· 우량 잔디 형질전환체 계통 다수 확 보를 위한 잔디 형질전환 수행 (<i>ORE7</i> 과 <i>AtSIZ</i> 유전자가 도입된 잔 디 형질전환체 지속적 생산) · 신규 1 및 유용 유전자인 <i>ATPG8</i> 과 <i>ATPG7</i> 에 대한 형질전환체 확보	100
			· <i>AtGA2ox4</i> 유전자의 잔디 형질전환체 생산 및 잠정 형질전환체 선별 · <i>ATHG1</i> 유전자의 잔디 형질전환체 생 산 및 49개의 형질전환체 확보	100
			· 요약: <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> , <i>AtGA2ox4</i> , <i>ATHG1</i> , <i>ATPG7</i> 그리고 <i>ATPG8</i> 유전 자에 대한 잔디 형질전환체 생산 (총 6건)	100
	형질전환 잔디의 기능 분석	형질전환 잔디의 유전자 발현 분 석	· <i>ORE7</i> 및 <i>AtSIZ</i> 잔디 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석 (PAT strip test, PCR, RT-PCR, qRT-PCR, Southern blot등)	100
			· 생산된 <i>ORE7</i> 잔디 형질전환체의 표 현형 분석 실시 (자연노화, 암처리에 의한 노화유도, 스트레스에 의한 노 화유도 조건에서 노화 표현형 분석)	120
		· 생산된 <i>AtSIZ</i> 잔디 형질전환체의 표 현형 분석 실시 (염, 건조 등의 스트 레스 조건에서 표현형 분석)	· <i>ORE7</i> 잔디 형질전환체의 포장에서 가시적 표현형 및 노화 표현형 분석 을 통한 우량 형질전환체 확보	
		· 요약: <i>ORE7</i> 과 <i>AtSIZ</i> 에 대한 2종의 형 질전환 잔디 우수 형질 계통 선발 진행		

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
최종 평가 (3차 년도, 2012)	고부가 잔디 적용 유용 유전자 발굴	기능성 유전체 연구를 통한 유용 유전자 발굴 및 기능검정 (3종)	· 기능성 유전체 연구를 통한 변이체로 부터 잔디 적용 표현형질 변이체 선 별 - 녹기연장/생산성 증대 변이체선별 - Freezing tolerance 변이체 선별	100
			· 변이체로부터 신규 유용 유전자 발굴 및 기능검정 (총 5종) - <i>ATPG2</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG8</i> , <i>DDF1</i> , <i>ATHB23</i>	170
			· 신규 및 유용 유전자 형질전환용 백 터 construct 제작 (총 6종) - <i>ATPG2</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG6</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i>	200
	우량 잔디 형질전환체 개발	잔디 형질전환 및 형질전환체 생 산 (7건)	· 우량 잔디 형질전환체 계통 다수 확 보를 위한 잔디 형질전환 수행 (<i>ORE7</i> 과 <i>AtSIZ</i> 유전자가 도입된 잔 디 형질전환체 지속적 생산)	100
			· 기확보 <i>AtGA2ox4</i> 와 <i>ATHG1</i> 에 대한 형질전환체 선별 및 확보	110
			· 신규 및 유용 유전자 <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> 에 대한 형질전환체 선별 및 확보	
	형질전환 잔디의 기능 분석	형질전환 잔디 기능 분석 및 우수 형질 계통선발 (2건)	· 요약: <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> , <i>AtGA2ox4</i> , <i>ATHG1</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> 그 리고 <i>ATPG8</i> 유전자에 대한 잔디 형 질전환체 생산 (총 8건)	110
			· <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> , <i>ATHG1</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> 그리고 <i>ATPG8</i> 잔디 형질전 환체의 유전자 도입 및 발현 분석 (PAT strip test, PCR, RT-PCR, qRT-PCR, Southern blot등) (총 7건)	100
			· <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> , <i>ATHG1</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , 그리고 <i>ATPG8</i> 잔디 형질전 환체의 가시적 표현형 분석 (총 7건) · <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> , <i>ATHG1</i> , <i>ATPG7</i> , 그리고 <i>ATPG8</i> 잔디 형질전환체의 심화 기 능 분석 (노화 및 염, 건조 등의 스 트레스 조건에서 표현형 분석) (총 5 건) · 심화 기능 분석을 통한 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> , <i>ATHG1</i> , <i>ATPG7</i> , 그리고 <i>ATPG8</i> 5종 의 유전자에 대한 우량 잔디 형질전 환체 확보 · <i>ORE7</i> 과 <i>AtSIZ</i> 에 대한 2종의 형질전 환 잔디의 우수 형질 계통 선발 및 포장 증식 (총 2건)	120
	지적소유권 확보	· 특허 출원 혹은 등록: 3건 · 논문: 3건(SCI 학술지 2건, 기타 1건)	· 국내외 특허 출원: 5건 · 논문: 2건 (SCI 학술지 2건)	110

제 2 절. 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 결과의 활용방안

Advanced RAM approach, promoter trap approach 등의 다양한 기능성 유전체 연구를 통하여 발굴된 노화, 스트레스 저항성 및 왜화 조절 관련 유용 유전자의 발굴을 통한 지적소유권을 확보하고, 본 유전자들에 대한 기술이전을 통하여 경제적 이익을 추구할 것이다. 이때 유전자의 기능을 강화하기 위하여 관련 전공자(식물 생리·생화학자 등)와의 공동연구를 적극 추진할 것이며, 이러한 연구 결과는 유용 유전자의 기술이전에 있어서 보다 부가가치를 높일 것이다.

학술적 측면에서의 활용 방안: 본 과제 수행동안 확보된 advanced RAM 및 promoter trap 변이체들은 본사와의 협의 하에 국내 산·학·연 기관에 보급하여 변이체를 통한 식물 성장·발달 관련 유용 유전자 발굴에 일조하여 국내 농업생명공학 분야의 발전에 도움을 주고자 한다.

신품종 혹은 신기능성 작물 개발: 식물 녹기 연장 및 다양한 환경 스트레스 저항성 관련 유용 유전자를 통한 잔디 신품종의 개발은 형질전환 기술과 형질전환체에 대한 원천 특허출원으로 지적소유권 확보가 가능하여 기술이전 시 고부가 가치 창출을 유도할 수 있을 뿐 아니라 타 경제작물 개발에도 적용이 가능하므로 국가 농업 활성화에 큰 도움을 줄 것이다.

기술 개발된 우수 잔디 계통에 있어서 왜성, 녹기 연장 잔디 품종 개발은 골프장 등에 주로 적용 가능하며, 환경 스트레스 저항성 잔디 품종 개발은 불리한 환경 조건, 특히 염분이 많이 축적된 바닷가 토양 및 전체적인 온도가 낮은 고지대에 적용 가능하며 그 용도는 매우 높으리라 생각된다. 이러한 잔디 품종의 산업화는 기본적으로 국내 기관 혹은 종자회사와 공동연구를 통하여 품종 개발을 수행하고 이를 통한 수익을 창출하고자하며, 지적소유권에 대한 기술이전은 잔디 품종 개발에 집중하고 있는 종자 회사가 주를 이룰 것이며 시장에 있어서 우선 국내 기업을 대상으로 하고 이후 미국, 유럽 쪽이 그 대상이 될 것이다. 대상 업체는 Monsanto, Jacklin 종자 회사, Scotts Co. 등 미국과 유럽에 위치하고 있는 여러 major 회사가 예상된다. 이러한 국외 마케팅의 대부분은 영양 생식 잔디의 수출이 용이하지 않은 관계로 종자 생산을 목적으로 할 것이나, 이 경우 장기 프로젝트로 추진해야 할 것이다. 그리고 국내에서는 단기 프로젝트가 가능한 영양 생식 잔디 품종 개발에 집중할 것이며, 특히 삼성, 현대, LG 및 코오롱 등의 다수의 골프장을 보유하고 있는 대기업이 주 마케팅 대상이 될 것이다. 국내 마케팅의 영역은 공동연구를 통한 품종 개발, 그리고 이를 통한 공동 사업화 등의 형태가 주가 될 것이다.

2. 기대성과

[기술적 측면]

본 연구는 다양한 유전체 기능연구를 적용함으로써 녹기 연장, 스트레스 저항성 및 왜화 조절 관련 유용 기능성 유전자의 대량 발굴 및 이를 활용한 고부가 잔디 신품종 개발을 이룰 수 있으리라 확신하며, 이러한 연구를 통하여 확보된 녹기연장, 스트레스 저항성, 및 왜성 조절 관련 유용 유전자에 대한 지적 소유권 확보는 향후 국가 생명공학 산업화의 경쟁력을 가지는데 일조를 할 것이다.

국가 기간산업으로 그 위치를 공고히 해온 국내 농업이 존재의 위기를 맞고 있는 열악한 상황에서 작물의 생산성 증대 및 농업의 고부가가치화를 통하여 농촌 및 농업 기반을 새로이 구축할 필요가 있다. 따라서 고부가 잔디 신품종 개발은 국가 국내 농가에 경제적 이익을 제공하여 귀농 의지의 고취 및 국가 기반 사업인 농업 활성화에 일조할 것이다.

세부적으로 보면 식물 녹기 연장 및 스트레스 저항성 관련 유전자의 자체 신규 발굴은 식물 노화조절 및 복합 스트레스 조절에 대한 분자적 기작 해명의 전기를 만들고, 다른 작물에서 노화 및 스트레스 조절 유전자의 분리, 노화 및 스트레스 조절기술의 개발 등 광범위한 파급 효과가 있으며, 이러한 새로운 식물 노화 및 스트레스 저항성 조절 기술의 개발은 타 작물의 생산성 조절 기술에 확대 적용되는 파급효과를 가진다.

[경제·산업적 측면]

최근 20년간의 형질전환기술에 있어서 유전자 재조합 및 형질전환 식물체 개발에 대한 특허 출원 현황을 조사해 보면, 우리나라는 미국의 약 10%정도에도 미치지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 과제의 다양한 유전체 기능 연구를 통한 녹기연장, 스트레스 저항성 및 왜성 조절 관련 유용 유전자의 발굴은 일차적으로 식물 유전자를 독점하여 세계 식물 생명공학 사업을 독점적으로 운용하고자 하는 다국적 기업을 견제할 수 있으며, 식물 생명공학에 대한 국가 간의 경쟁력을 강화시키는데 일조할 것이다. 식물의 생산성 증대를 유발할 수 있는 유전자의 잠재적 가치는 약 80억불 이상이 되며, 이러한 유전자를 통한 신품종 혹은 신기능성 작물의 개발에 대한 잠재 시장은 2005년을 기준으로 볼 때 약 200억불 이상이 될 것으로 보고 있다. 따라서 식물 녹기연장 및 스트레스 저항성 관련 유용 유전자를 통한 고부가 잔디 신품종 개발은 유전자의 잠재 가치를 증가시켜 기술이전 시 보다 많은 수익 창출을 가능하게 하고, 신품종 개발을 통한 사업화는 지적소유권을 확보한 상태에서의 사업화이기에 대외적 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 연구개발 성과

1. 연구성과 목표 및 대비실적

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종명 명칭 등록	품종생산 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표	0							0	1	
	달성	1							1	0	
2차년도	목표	1							1		
	달성	3							0		
3차년도	목표	2							1		
	달성	1							1		
계	목표	3							2	1	
	달성	5							2	0	

2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011년 1월	Overexpression ~ ¹⁾	강홍규	임평옥	김준기 등	Plant Science	180: 634-641	국외	SCI
2013년 (accepted)	The homeodomain~ ²⁾	최현모	우혜련 임평옥	정수영 등	Physiologia Plantarum	accepted	국외	SCI

¹⁾Overexpression of *FTL1/DDF1*, an AP2 transcription factor, enhances tolerance to cold, drought, and heat stresses in *Arabidopsis thaliana*

²⁾The homeodomain-leucine zipper ATHB23, a phytochrome B-interacting protein, is important for phytochrome B-mediated red light signaling

3. 특허출원/등록 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011년 4월	식물의 ^{a)}	제노마인(주)	대한민국	10-2011-0038932					
2011년10월	식물의 ^{b)}	제노마인(주)	대한민국	10-2011-0110593					
2012년 4월	식물의 ^{c)}	제노마인(주)	대한민국	10-2012-0039113					
2012년 4월	ATPG8 ^{d)}	제노마인(주)	국제(PCT)	PCT/KR2012/002967					
2012년 10월	ATPG4 ^{e)}	제노마인(주)	국제(PCT)	PCT/KR2012/008798					

^{a)}식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{b)}식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{c)}식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{d)}ATPG8 Protein Providing Yield Increase and Delaying Senescence and Stress Tolerance of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use

^{e)}ATPG4 Protein Delaying Senescence and Providing Yield Increase and Stress Tolerance in Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Uses

4. 학술대회 발표

In-Ja Song, Eun-Jeong Kang, Hyeon-Jin Sun, Tae-Woong Bae, Dong-Hee Lee, Hyo-Yeon Lee, Pyung-Ok Lim (2011.04.29.-30) Transgenic creeping bentgrass expressing the *Arabidopsis ORESARA7* extends leaf longevity and increases tolerance to environmental stresses. 2011 한국자원식물학회 국제 춘계학술발표회 및 녹색환경 천연화장품, 천연비누 공모전 공동심포지엄, 순천대학교

5. 인력활용/양성 성과

[인력지원 성과]

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
24	10	10	4	0	7	17	0	0	24

제 2 절. 성과활용 계획

1. 연구성과 활용목표

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2					
	달성						

2. 연구성과 활용계획

연구 산물의 산업화는 녹기연장의 ORE7 잔디와 스트레스 저항성 AtSIZ 잔디 형질전환체를 중점적으로 실시할 예정이다. 두 형질전환체는 골프장 등에 주로 적용 가능하며, 또한 환경 스트레스 저항성 잔디 품종 개발은 불리한 환경 조건, 특히 염분이 많이 축적된 바닷가 토양 및 전체적인 온도가 낮은 고지대에 적용 가능하여 그 용도는 매우 높으리라 생각된다. 또한 신규 발굴한 유용 유전자의 경우, 녹기연장 및 스트레스 저항성에 대한 목표형질을 뚜렷이 제공하기에 기술사업화에 있어서 우선 대상이 될 것으로 판단한다.

이러한 연구산물에 대한 기술사업화는 2 가지 방안으로 진행될 것이다. 첫 번째는 단기 전략으로 유전자 및 형질전환체에 대한 지적소유권에 대한 국내 기관 혹은 기업, 그리고 다국적 잔디 혹은 종자 회사로의 기술이전이다. 기술이전의 주요 대상은 국내 농업 활성화를 위하여 국내에 우선적으로 기술이전을 실시할 예정이며 이후 다국적 종자 회사인 Monsanto, Jacklin 종자 회사, Scotts Co. 등 미국과 유럽에 위치하고 있는 다국적 종자 회사를 대상으로 기술이전을 실시할 예정이다. 주관기관인 제노마인(주)의 다국적 기업과의 유용 유전자에 대한 기술이전 성공 사례는 본 사업에서 확보하는 우량 형질의 유전자 혹은 형질전환체에 대한 기술이전의 가능성을 보다 올려줄 것으로 판단된다.

본 연구에서 개발하고자 하는 형질전환 잔디에는 복합 환경 스트레스 저항성, 녹기 연장, 왜화 조절 유전자 등의 목적 형질 유전자 이외에 비선택성 제초제 저항성 유전자가 선발마커로 도입되어 있는데, 제초제 저항성 GM 작물은 재배 관리상의 이점과 함께 농약사용량을 감소시키는 효과가 있다고 보고되어 있다(James C, ISAAA Briefs No 23). 이 보고에 따르면 비선택성 제초제 저항성 대두를 각 지역에서 3년간 시험 재배한 결과, 기존의 야생형 대두 재배 시에 비해 제초제 사용량을 25% 이상 감소시키는 효과를 가져왔으며 결과적으로 재배 3년째에는 약 47% 정도 경제적 이득이 증가하였다. 제주대학교의 제초제 저항성 들잔디의 포장 실험에서도 야생형 잔디에 비해 잡초방제 및 관리비용이 연차별로 감소하여 재배 3년째부터는 약 25% 이상의 농약사용량 및 관리비용이 절감됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 비선택성 제초제 저항성 유전자가 도입된 형질전환 잔디는 재배 관리 비용의 절감으로 인한 경제적 이득의 증가뿐만 아니라 제초제 사용량을 줄이는 효과도 있어 보다 환경친화적인 작물이 될 수 있음을 시사한다. 본 연구에서 개발하고 있는 고부가가치 형질전환 잔디는 제초제 저항성 유전자와 함

계 복합 스트레스 내성, 왜성 조절 유전자 등이 도입되어 있으므로, 잔디 재배 관리 비용의 절감 및 경제적 이득 증가에 상승효과를 유발할 수 있을 것으로 보인다. 개발된 GM 작물은 환경위해성 평가를 통해 환경방출 승인을 얻어야만 상업적 재배가 가능한데 여기에서 가장 중요한 항목이 유전자 이동에 의한 주변생태계에 대한 영향이다. 제주대학교의 제초제 저항성 들잔디의 경우, 3m 이상의 거리에서는 야생형 잔디로의 유전자 이동 가능성이 거의 없는 것으로 나타났고, 같은 *Zoysia*속에 속하는 야생 잔디는 금잔디, 갯잔디 등 두 종에 불과할 뿐만 아니라 교배 가능성도 매우 낮은 것으로 확인되었다. 또한, 들잔디의 자연 상태에서의 발아율은 약 4% 이내로 타 작물에 비해 매우 낮으며, 자연 상태에서 발아하였을 경우, 우점잡초에 의해 생육이 억제되어 자연 소멸하는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과로부터, 본 연구에서 개발되는 형질전환 들잔디는 현재까지 환경방출 승인된 타 GM 작물보다 주변 자연환경이 미치는 영향이 매우 적을 것으로 보여 GM 작물의 환경 위해성 평가를 통과하는 데에는 큰 문제가 없을 것으로 판단하고 있다.

이러한 배경을 바탕으로 본 연구 산물의 두 번째 산업화 방안은 확보한 유용 유전자 및 형질 전환체에 대한 공동 사업화를 통한 우량 품종 개발에 대한 자체 사업화이다. 국외 기술사업화의 경우 대부분은 영양 생식 잔디의 수출이 용이하지 않은 관계로 종자 생산을 목적으로 하므로, 보다 장기 프로젝트를 추진해야 할 것으로 판단되며, 국내에서는 영양 생식 잔디 품종 개발이 가능하므로 단·중기 프로젝트로 추진할 예정이다. 대상으로는 삼성, 현대, LG 및 코오롱 등의 다수의 골프장을 보유하고 있는 대기업이 주 마케팅 대상이 될 것이다. 이러한 국내 기술사업화의 영역은 공동 연구를 통한 품종 개발, 그리고 이를 통한 공동 사업화 등의 형태가 주가 될 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

[산업화 현황]

잔디는 단위면적당 생산단가가 타 작물에 비해 월등히 높은 고부가 경제 작물이며(작물 평균 323불/acre, 잔디 3,300불/acre, 2007 Census of Agriculture Data Release), 세계 4대 작물 중 하나인 옥수수 다음으로 시장 규모가 크다. 이러한 잔디 시장은 약 50조 원의 규모를 가지는 것으로 알려지고 있다. 미국의 경우, 잔디 시장 규모는 2002년 1,000백만 불에서 2007년 1,354억 불로 증가하였으며(그림 A), 최근의 TPI(Turfgrass Producers International) 자료에 의하면 2010년의 시장 규모가 2009년에 비하여 약 35%의 신장세를 가지는 것으로 나타났다. 이러한 사실은 잔디 품종 개발이 매력적인 사업이며, 고부가 가치 창출이 가능한 사업이라 예측된다.

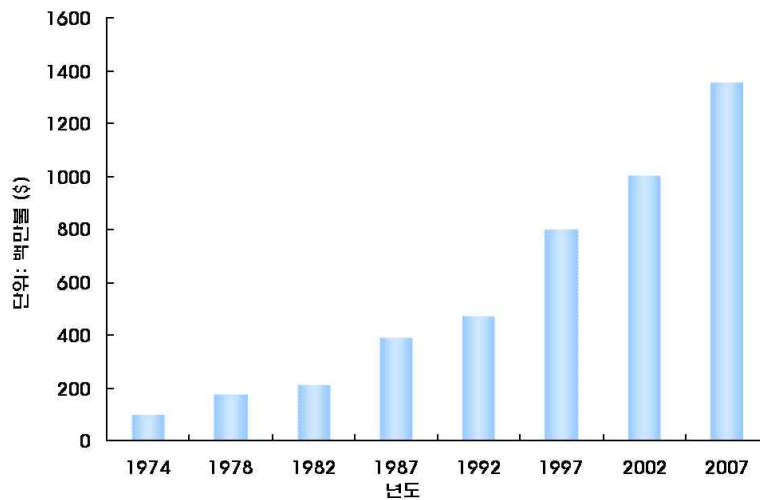


그림 A. Turfgrass comparison chart 1974 to 2007 in USA (2007 Census of agriculture data release, 2007)

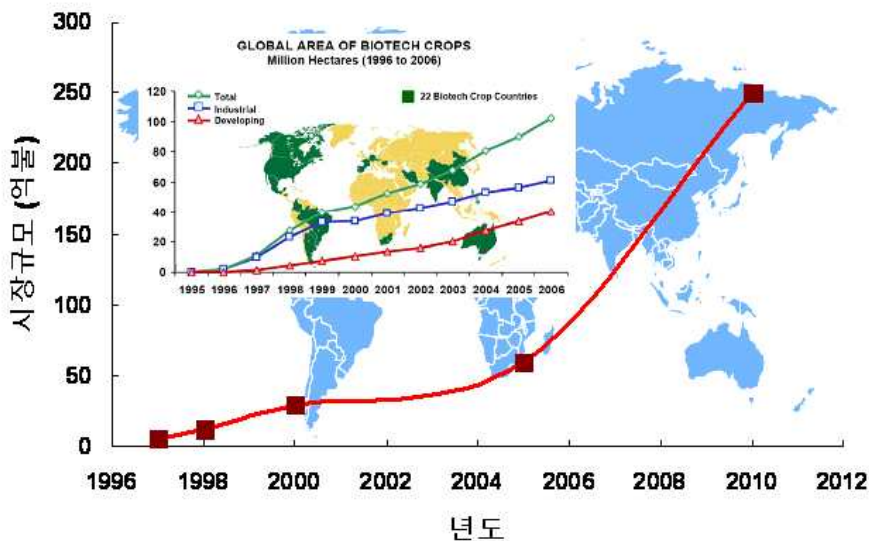


그림 B. 유전자 변형 작물의 세계 시장 및 재배 면적 동향 (식물개량기술, 2003, 특허청; Clive James, 2006)

한편 유전자 변형 작물에 대한 재배 면적 증가 및 세계 시장규모가 2010년경에는 약 250억불로 증가할 것으로 추정하고 있으나(그림 B), 최근 고유가 지속에 의한 국가 바이오 안보 문제, 환경오염 문제, 그리고 에너지 수입 대처 효과 등으로 인하여 유전자 변형 작물 개발이 급속도로 진행됨에 따라 그 시장 규모는 훨씬 커질 것으로 추정된다. 따라서 상기의 유전자 변형 작물 시장의 급속한 신장세는 본 사업의 필요성을 인지시키고 있다.

[기술개발 현황]

국내외 잔디의 품종 개발은 전통적인 육종 방법을 이용하고 있으나, 최근 분자생물학적 방법을 이용하여 신품종 개발이 시도되고 있다. 그럼에도 불구하고 전 세계적으로 벤틀그라스 등 극히 몇몇 품종에서만 형질전환의 성공 사례가 보고되고 있을 뿐 아직 잔디에 대한 안정적인 형질전환에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 잔디 품종 개발에 있어서 유용 유전자 삽입이 가능한 형질전환 기법은 전 세계적으로 공통적인 기술 적용의 범위이며, 국내외에서 가지는 유전자 변형 작물에 대한 문제는 최근 안정성 평가 등의 방법을 통하여 부분적으로 해결되고 있는 실정이다. 따라서 이와 같은 유전자 변형 작물 문제 해결 능력은 이후 보다 좋은 품질의 신 기능성 우량 잔디 품종 개발에 크게 이바지할 것이며, 이러한 예측은 형질전환을 통한 잔디 신품종 개발에 있어서 보다 많은 기회를 제공할 것이다.

국의 잔디 품종 개발에 있어서 거의 대부분은 기능성 신품종 개발 쪽으로 방향성을 잡고 품종 개발에 집중하고 있다. 특히 제초제 저항성 잔디 개발이 가장 보편화된 기술 개발로 들 수 있으며, 최근 표현형이 확실한 우량 잔디 품종, 예를 들면 왜성 잔디 품종, 다양한 biotic 그리고 abiotic 스트레스 저항성 잔디 개발에 많은 투자를 하고 있는 실정이다.

최근 잔디 품종 개발의 많은 부분이 형질전환 기술을 통한 유전자 변형 잔디 품종 개발에 집중하고 있으며, 특히 제초제 저항성, biotic/abiotic 스트레스 저항성 등과 같은 기능성 잔디 품종 개발에 집중하고 있다. 또한 잔디 관리의 편리성을 제공하는 크리핑 벤틀그라스의 기능성 품종 개발에도 많은 연구를 집중시키고 있는 중이다. 이러한 품종 개발에 대한 동향 및 사례를 아래 Table A에서 제시하였다.

Table A. 식물 유전공학 기법을 이용한 잔디 품종 개발에 대한 동향

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 Rutgers 대학, Monsanto사, Scott사	왜소형 형질전환 잔디 개발 (크리핑 벤틀그라스)	판매 준비 중
Monsanto 사	제초제 저항성 잔디 품종 개발	마지막 승인 절차 준비 및 판매 준비 중
중국 Zhejiang 대학	제초제 저항성 버뮤다 잔디 품종 개발	형질전환 성공 및 품종 개발
미국 캔사스 주립대학	크리핑 벤틀그라스에서 T-DNA 융합의 특성 분석	연구 진행 중
제주대학교	제초제 저항성 잔디 품종 개발	품종의 안정성 평가 중
금호연구소, 제주대학교	음지 내성형 제초제 저항성 잔디 품종 개발	애기장대 유전자의 잔디 적용 가능성 제시

식물의 녹기 연장 및 다양한 환경 스트레스 조절은 생물학적 중요성뿐만 아니라 작물의 생산성 조절 가능성 때문에 많은 생리학적, 생화학적 연구가 수행되어 왔으며 유전학적, 분자생물학적 연구는 최근 수년 사이에 많이 진행되고 있다. 최근 많은 연구팀들이 식물의 녹기 연장 및 다양한 환경 스트레스 조절 관련 유용 유전자를 이용한 생산성 증대 및 기능 강화 신품종 혹은 신기능성 작물의 개발에 연구를 집중하고 있으며, 최근 애기장대 유전자를 통한 우수 작물 개발을 여러 연구팀이 시도하고 있는 중이다.

애기장대에서 발굴한 유용 유전자의 고부가가치 작물 개발에 대한 적용은 다양한 작물에서 알려지고 있다. 애기장대 *PHYB* 유전자 도입으로 감자에서 광합성 효율 및 기공의 conductance 증가를 유발하여 high intensity 조건하에서 tuber number 및 yield의 증가가 유발되었으며 이러한 표현형을 가진 고부가 형질전환 감자 품종 개발에 집중하고 있다(Boccalandro *et al.*, 2003). 또한 미국의 Texas Tech. Univ.와 Univ. of California Davis 연구팀은 애기장대의 vacuolar sodium/proton antiporter 유전자인 *AtNHX1*을 면화에 도입하여 salt stress에 대한 저항성뿐만 아니라 필드에서 보다 양질의 fiber 생산량 증가 표현형을 가지는 우수 면화 품종 개발에 집중하고 있다(He *et al.*, 2005).

그러나 전체적으로 잔디의 품종 개량에 대한 애기장대 유용 유전자의 적용은 아직 미미한 실정이다. 최근 국내에서 송필순 박사 연구팀은 애기장대 유전자인 *phyA*를 잔디에 도입하여 음지 내성형 고부가 잔디 품종 개발에 집중하고 있다. 또한 본 연구팀은 애기장대 유전자인 *ORE7*을 통한 녹기연장 잔디 형질전환체 개발, *AtSIZ*를 통한 염 스트레스 저항성 잔디 형질전환체 개발, 그리고 *PAPP5*의 TPR domain을 통한 왜화 잔디 형질전환체 개발을 성공하였다.

제 7 장 참고문헌

- Achard, P, H Cheng, L De Grauwe, J Decat, H Schoutteten, T Moritz, D Peng, J Van Der Straeten and NP Harberd (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals, *Science* **311**, 91-4.
- Achard, P, JP Renou, R Berthome, NP Harberd and P Genschik (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species, *Curr. Biol.* **18**, 656-60.
- Achard, P, L Liao, C Jiang, T Desnos, J Bartlett, Xi. Fu and NP Harberd (2007) DELLAs contribute to plant photomorphogenesis, *Plant Physiol.* **143**, 1163-172.
- Achard, P, PF Gong, S Cheminant, M Alioua, P Hedden, and P Genschik (2008) The cold-inducible CBF1 actor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism, *Plant Cell* **20**, 2117-129.
- Aravind L and Landsman D (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **19**, 4413-4421.
- Bae, TW, E Vanjildorj, SY Song, S Nishiguchi, SS Yang, IJ Song, T Chandrasekhar, TW Kang, JI Kim, YJ Koh (2008) Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide tolerant *Zoysia japonica*. *J. Environ. Qual.* **37**, 207-218.
- Boccalandro HE, Ploschuk EL, Yanovsky MJ, Sanchez RA, Gatz C and, Casal JJ (2003) Increased phytochrome B alleviates density effects on tuber yield of field potato crops. *Plant Physiol* **133(4)**, 1539-46.
- Bohnert, HJ, DE Nelson and RG Jensen (1995) Adaptations to environmental stresses, *Plant Cell* **7**, 1099-111.
- Boyer, JS (1982) Plant productivity and environment, *Science* **218**, 443-48.
- Chinnusamy, V, K Schumaker and JK Zhu (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants, *J. Exp. Bot.* **55**, 225-36.
- Clough, S and AF Bent (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* **16**, 735-43.
- Fowler, S and MF Thomashow (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway, *Plant Cell* **14**, 1675-690.
- Gan, S and Amasino, RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.
- Gilmour, SJ, AM Sebolt, MP Salazar, JD Everard and MF Thomashow (2000) Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation, *Plant Physiol.* **124**, 1854-865.
- Guiame't JJ, Teeri JA, Noode'n LD (1990) Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean. *Plant and Cell Physiology* **31**, 1123-130.
- Haake, V, D Cook, JL Riechmann, O Pineda, MF Thomashow and JZ Zhang (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **130**, 639-48.
- He C, Yan J, Shen G, Fu L, Holaday AS, Auld D, Blumwald E and Zhang H (2005) Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant Cell Physiol.* **46(11)**, 1848-54.

- Jung, KH, MJ Han, DY Lee, YS Lee, L Schreiber, R Franke, A Faust, A Yephremov, H Saedler, YW Kim, I Hwang and G An** (2006) Wax-deficient anther1 is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development, *Plant Cell* **18**, 3015–032.
- Kasuga, M, Q Liu, S Miura, K Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki** (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor, *Nat. Biotechnol.* **17**, 287–91.
- Lefebvre, V, H North, A Frey, B Sotta, M Seo, M Okamoto, E Nambara and A Marion-Poll** (2006) Functional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy, *Plant J.* **45**, 309–19.
- Li G, TC Hall and R Holmes-Davis** (2002) Plant chromatin: development and gene control. *BioEssays* **24**, 234-243.
- Lichtenthaler H and Wellburn AR** (1983). Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* **603**, 591–93.
- Lim PO and Nam HG** (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in Arabidopsis. *Curr Top Dev Biol* **67**, 49–3.
- Lim PO, Kim Y, Breeze E, Koo JC, Woo HR, Ryu JS, Park DH, Beynon J, Tabrett A, Buchanan-Wollaston V and Nam HG** (2007) Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants. *The Plant Journal* **52**, 1140-1153.
- Lim PO, Woo HR and Nam HG** (2003) Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **8**, 272–78.
- Liu, Q, M Kasuga, Y Sakuma, H Abe, S Miura, K Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki** (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis, *Plant Cell* **10**, 1391–406.
- Magome, H, S Yamaguchi, A Hanada, Y Kamiya and K Oda** (2004) dwarf and delayedflowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor, *Plant J.* **37**, 720–29.
- Magome, H, S Yamaguchi, A Hanada, Y Kamiya and K. Oda** (2008) The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, GA2ox7, under high-salinity stress in Arabidopsis, *Plant J.* **56**, 613–26.
- Matsushita A, Furumoto T, Ishida S and Takahashi Y** (2007) AGF1, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of AtGA3ox1 encoding GA 3-oxidase. *Plant Physiol* **143**, 1152-1162.
- Nakashima, K, Y Ito and K. Yamaguchi-Shinozaki** (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses, *Plant Physiol.* **149**, 88–95.
- Nakashima, K, ZK Shinwari, Y Sakuma, M Seki, S Miura, K Shinozaki and K Yamaguchi-Shinozaki** (2000) Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and highsalinity-responsive gene expression, *Plant Mol. Biol.* **42**, 657–65.
- Nam HG** (1997) Molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 200–07.
- Oh SA, Lee SY, Chung IK, Lee CH and Nam HG** (1996) A senescence-associated gene of Arabidopsis thaliana is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Molecular*

- Oh, SA, Park, JH, Lee, GI, Paek, KH, Park, SK and Nam, HG** (1997) Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**, 527-535.
- Panchuk, II, RA Volkov and F. Schoffl** (2002) Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **129**, 838-53.
- Prandl, R, K Hinderhofer, G Eggers-Schumacher and F Schoffl** (1998) HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants, *Mol. Gen. Genet.* **258**, 269-78.
- Robert-Seilaniantz, A, R Bari and JDG Jones** (2010) Abiotic or abiotic stress? in: A Pareek, SK Sopory, HJ Bohnert, Govindjee (Eds.), *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*, Springer, Dordrecht, pp. 113-16.
- Sakuma, Y, K Maruyama, Y Osakabe, F Qin, M Seki, K Shinozaki and K Yamaguchi-Shinozaki** (2006) Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression, *Plant Cell* **18**, 1292-309.
- Sakuma, Y, Q Liu, JG Dubouzet, H Abe, K Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki** (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 998-009.
- Sgarra R, Lee J, Tessari MA, Altamura S, Spolaore B, Giacotti V, Bedford MT and Manfioletti G** (2006) The AT-hook of the chromatin architectural transcription factor high mobility group A1a is arginine-methylated by protein arginine methyltransferase 6. *J Biol Chem* **281**, 3764-3772.
- Shameer, K, S Ambika, SM Varghese, N Karaba, M Udayakumar and R. Sowdhamini** (2009) STIFDB-*Arabidopsis* stress responsive transcription factor database, *Int. J. Plant Genomics* **2009**, 583429.
- Shinozaki, K and K. Yamaguchi-Shinozaki** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance, *J. Exp. Bot.* **58**, 221-27.
- Street IH, Shah PK, Smith AM, Avery N and Neff MM** (2008) The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Plant J* **54**, 1-14.
- Street IH, Shah PK, Smith AM, Avery N and Neff MM** (2008) The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **54**, 1-4
- Su Y, Kwon CS, Bezhani S, Huvermann B, Chen C, Peragine A, Kennedy JF, and Wagner D** (2006) The N-terminal ATPase AT hook-containing region of the *Arabidopsis* chromatin-remodeling protein SPLAYED is sufficient for biological activity. *Plant J* **46**, 685-699.
- Sun J, Jiang H, Xu Y, Li H, Xie Q and C Li** (2007) The CCCH-Type Zinc Finger Proteins AtSZF1 and AtSZF2 Regulate Salt Stress Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **48(8)**, 1148-158 (2007)
- Toyama, K, CH Bae, JG Kang, YP Lim, T Adachi, KZ Riu, PS Song and HY Lee** (2003) Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Cells.* **16**, 19-7.
- Watrud, LS, EH Lee, A Fairbrother, C Burdick, JR Reichman, M Bollman, M Storm, G King and KV Water** (2004) Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with CP4 EPSPS as a marker. *PNAS* **101**, 14533-4538.
- Weigel, D, JH Ahn, MA Blazquez, JO Borevitz, SK Christensen, C Fankhauser, C Ferrandiz, I Kardailsky, EJ**

Neff, MM Malancharuvil, JT Nguyen, S Sato, ZY Wang, Y Xia, RA Dixon, MJ Harrison, CJ Lamb, MF Yanofsky and J Chory (2000) Activation tagging in Arabidopsis, *Plant Physiol.* **122**, 1003-013.

남홍길, 김진희, 우혜련 (2005) 식물 잎 수명 조절 단백질, 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2005-0079892 (출원인; 포항공대, 제노마인(주))

이동희, 김국진, 이인철, 김동수 (2010) 식물체의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2010-0010652 (출원인; 제노마인(주))

이동희, 이인철, 김국진 (2011) 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0038932, (출원인; 제노마인(주))

이동희, 이인철, 김국진, 김동수 (2011) 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0038929, (출원인; 제노마인(주))

이동희, 이인철, 김국진, 김동수, 박경목 (2011) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0110593, (출원인; 제노마인(주))

이동희, 이인철, 김국진, 김동수, 박경목 (2012) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2012-0016951 (출원인; 제노마인(주))

이동희, 이인철, 김국진, 김동수 (2013) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG6 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2013-0075018 (출원인; 제노마인(주))

[부록 1] 특허출원 (PCT/KR2012/008798)

【명세서】

【발명의 명칭】

식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도{ATPG4 Protein Delaying Senescence and Providing Yield Increase and Stress Tolerance in Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Uses}

【기술분야】

본 발명은 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

식물의 노화는 식물 발생의 마지막 단계로서, 세포, 조직, 기관 혹은 생물체 수준에서 나이-의존적 붕괴 과정이며, 성장 및 발생 단계를 거쳐 치사 단계를 유도한다. 식물은 노화가 진행됨에 따라 점차적으로 합성능력이 저하되고 세포 내구조물과 거대분자들이 순차적으로 분해되면서 세포의 항상성을 잃게 되어, 결국 죽음에 이르게 된다(Thomas et al., 1993). 이러한 식물의 노화는 일련의 연속된 생화학적 및 생리학적 현상으로 유전적으로 계획되어 있어 세포, 조직 및 기관의 수준에서 매우 정교하고, 능동적으로 진행된다. 세포 구조에 있어서 노화의 초기 현상은 잎 단백질의 70% 이상을 함유하고 있는 소기관인 엽록체의 분해이다. 대사적인 측면에서 보면, 식물체내 탄소 동화작용이 엽록소와 단백질, 막 지질, 그리고 RNA와 같은 거대분자의 이화작용으로 전환되는 것을 의미한다. 노화를 통하여 증가된 이화 작용 활성은 성장 동안 동화조직인 잎에 축적된 세포성분들이 종자 혹은 다른 저장 기관의 발달을 위해 공급되는 배출성 세포 성분으로 전환되는 것을 유도한다. 따라서 식물의 노화는 세포가 퇴화하는 과정인 동시에 진화 과정 동안 환경에 적응하기 위해 능동적으로 획득한 유전형질이라고 생각되고 있다(Buchanan-Wollaston et al., 2003; Lim and Nam, 2005; Nam, 1997)

이와 같은 식물의 노화는 식물 호르몬 등과 같은 내적 환경요인 및 가뭄, 영양소 제한, 병원균 침투 등과

같은 외적 환경 요인에 의하여 영향을 받는다. 식물 호르몬 중 cytokinin은 생리학적으로 노화 지연 호르몬으로서 이를 이용한 노화조절 기술이 많이 보고되고 있다. Amasino 그룹은 노화 특이적인 *SAG12* 유전자의 promoter에 *IPT* 유전자를 재조합하여 노화 단계 특이적인 cytokinin 합성 조절 방법을 개발하였으며, 상기 방법으로 노화를 지연시킨 담배에서 50%의 생산성 증대를 볼 수 있었다. 같은 방법으로 상추에 도입시켰을 때 수확 후 저장성이 크게 증가되는 것을 알 수 있었다(McCabe et al., 2001). 또한 *SAG12* promoter에 옥수수의 homeobox gene (*knotted1*)을 발현시킨 담배에서 cytokinin의 level이 증가하였고 잎의 노화도 지연된다는 보고가 있었다. 토마토의 경우 ethylene 조절을 통해 과일의 숙성을 조절한 사례가 보고되고 있으며, 또한 세포벽 분해와 관련된 polygalacturonase 유전자의 발현을 억제시켜 토마토의 운송성과 저장성을 증가시킨 Flav-O-Savor의 경우가 대표적으로 상업화 된 예가 될 수 있다. 사과와 같은 경우, 노화가 지연되도록 육종된 국내 품종의 하나가 ethylene 합성 유전자인 ACC oxidase 유전자의 변이를 동반하고 있음이 보고되었다.

최근 노화 조절 현상을 구명하기 위하여 노화시기에 발현이 유도되는 유전자의 분리 및 이들의 발현 양상 분석에 관한 많은 연구가 수행되었다. 노화 시 발현이 증가되는 유전자들의 분석은 애기장대, 무, 토마토 등에서 연구가 수행되었으며, 이러한 발현 양상 분석을 통해 노화의 pathway들은 매우 복잡한 network을 이루고 있음이 제시되었고, 최근에는 subtractive hybridization과 microarray 등의 방법을 이용하여 노화시기에 유도되는 유전자들을 다량으로 분리하고 있고, 이들 중 노화 조절 유전자로 추정되는 transcription factor, 혹은 receptor-like kinase 등과 같은 유전자들을 주target으로 하여 발현 분석을 실시하고 있다. 노화 과정 동안 발현이 증가되는 전사인자 중 많은 부분은 NAC, WRKY, C2H2-type zinc finger, Ap2/EREBP, 그리고 MYB 도메인을 가지는 단백질들이었다(Lim et al., 2007). *WRKY* 전사인자 중 *WRKY33* 유전자의 발현 억제는 식물체에서 노화지연을 유발하는 반면, 발현 증가는 식물체의 조기 노화

현상을 유발하였다. 따라서 *WRKY53* 유전자는 식물체 노화에 대한 positive regulator인 것으로 보인다(Miao et al., 2004). 또한 NAC 전사인자 중 *AtNAP* 유전자도 상기 유전자와 마찬가지로 식물체 노화에 대한 positive regulator인 것으로 보고되고 있다(Guo and Gan, 2006).

한편 Receptor-like kinase중 하나인 콩의 *GmSARK*의 발현은 자연 발생적 노화뿐만 아니라 암 처리에 의한 인위적 노화 과정에서도 up-regulation되며, 본 유전자의 억제제는 잎 노화의 지연을 유발한다고 알려지고 있다(Li et al., 2006).

최근 활성산소종(ROS; reactive oxygen species)이 식물체 노화에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려지고 있다. 특히 peroxysome에서 유래된 catalase isoform들은 *APXI*과함께 식물체의 노화를 조절한다고 애기장대를 재료로 하여 Zentgraf 그룹에서 제안하고 있다(Zimmermann et al., 2006).

한편, 농업적인 측면에서 보면 식물의 노화는 식물의 성장 단계에 대한 제한으로 인하여 작물의 생산성을 제한할 수 있으며 또한 채소 작물 등에서 잎의 황화 현상과 영양소 소실 등과 같은 품질 손실율을 유발할 수도 있다. 따라서 식물 노화에 대한 연구는 기본적으로 식물의 생육 과정에 대한 이해도를 증가시킬 뿐만 아니라 식물 노화 조절을 제공하여 작물의 생산성, 저장성 등과 같은 농업적 형질의 향상을 유발할 수 있다. Gan 등(1995)은 담배에서 노화 조절을 통해 생산성을 최고 50%까지 증가시킬 수 있었으며, 또한 콩(Guiamett et al., 1990)과 같은 곡물류에서도 노화 조절을 통해 생산성이 30% 이상의 증대 효과를 얻을 수 있었다. 그러나 여전히 식물 노화를 조절을 통한 생산성 증대에 대한 연구는 극히 제한적이다.

이러한 이유에서 식물 분야 생명공학 종사자들은 식물에서 수명 연장에 관여하는 유전자나 단백질 등을 찾아내고자 노력하고 있다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명의 목적은 식물의 노화 지연 기능을 가지고 생산성 증대 기능을 가지며 스트레스 내성 기능을 가지는 ATPG4 단백질을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 생산량 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 스트레스 내성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 기타의 목적은 이하에서 제시될 것이다.

【과제의 해결 수단】

본 발명은 일 측면에 있어, 식물의 노화 지연 기능을 가지고 생산성 증대 기능을 가지며 스트레스 내성 기능을 가지는 ATPG4 단백질에 관한 것이다.

본 발명자(들)는 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, 애기장대의 AT-HOOK MOTIF NUCLEAR-LOCALIZED PROTEIN (GeneBank accession number NP_566232.1) 염기서열을 기초로 상기 단백질의 유전자를 분리하고 상기 유전자를 애기장대에 형질전환시켜 과발현시켰을 때, 식물의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타나고, 이와 더불어 개체의 생체량 증가 및/또는 종자 생산성 증가라는 생산성 증대 특성도 뚜렷하게 나타나며, 더불어 가뭄 스트레스 또는 산화적 스트레스에 대한 내성 특성도 뚜렷하게 나타남을 확인하였다.

이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이 식물체의 노화를 지연시키고 식물의 생산성을 증대시키는 데 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

본 발명자들은 상기 유전자를 *ATPG4* (*AT-hook protein of Genomine 4*) 유전자 및 ATPG4 단백질로 명명하였으며, 이들 염기 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 및 2에 개시되어 있다.

본 발명의 ATPG4 단백질은 하기 (a), (b) 및 (c)의 폴리펩티드들 중 하나이다.

(a) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드

(b) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드 및

(c) 상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드.

본 명세서에서, "단백질"이라는 용어는 폴리펩티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용되며, "유전자"라는 용어는 폴리뉴클레오티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용된다.

본 명세서에서, "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교하였을 때 여전히 식물 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분한 정도의 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로서 정의된다. 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분하면 되므로, 상기 폴리펩티드의 길이 그리고 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도는 문제되지 않는다. 즉 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 활성이 낮더라도, 여전히 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 폴리펩티드라면 그 길이가 어떻든 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"에 포함된다는 것이다. 당업자라면, 즉 본 출원서를 기준으로 공지된 관련 선행기술을 숙지하고 있는 자라면, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 일부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 여전히 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유할 것이라고 기대할 것이다. 그러한 폴리펩티드로서 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실된 폴리펩티드를 들 수 있다. 그것은 일반적으로 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 가진다고 당업계에 공지되어 있기 때문이다. 물론 경우에 따라서는, N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 단백질의 기능 유지에 필수적이어서 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실된 폴리펩티드가 상기 기능을 나타내지 않는 경우가 있을 수 있겠지만, 그럼에도 그러한 비활성의 폴리펩티드를 활성의 폴리펩티드와 구분하고 검출해내는 것은 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속한다. 나아가 N-말단 부분 또는 C-말단 부분뿐만 아니라 그이외의 다른 부분이 결실되더라도

본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 가질 수 있다. 여기서도 당업자라면 그의 통상의 능력의 범위 내에서 이러한 결실된 폴리펩티드가 여전히 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 가지는가를 충분히 확인할 수 있을 것이다. 특히 본 명세서가 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 개시하고 있고 나아가 서열번호 1의 염기서열에 의해 암호화되고 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하는지를 확인한 실시예를 개시하고 있다는 점에서, 서열번호 2의 아미노산 서열에서 일부 서열이 결실된 폴리펩티드가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것인가를 당업자는 그의 통상의 능력 범위 내에서 충분히 확인할 수 있다는 것이 매우 자명해진다. 그러므로 본발명에 있어서 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 상기 정의와 같이 본 명세서의 개시 내용에 기초하여 당업자가 그의 통상의 능력 범위 내에서 제조 가능한 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 결실된 형태의 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미로서 이해되어야 한다.

또한 본 명세서에서, "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"란 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하지만, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 기능, 즉 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하는 폴리펩티드를 말한다. 여기서도 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기만 한다면 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도나 아미노산이 치환된 정도는 문제되지 않는다. 바꿔 얘기해서, 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 그 활성이 아무리 낮더라도 또 많은 수의 치환된 아미노산을 포함하고 있다고 하더라도 그러한 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기만 한다면 본발명에 포함된다는 것이다. 하나 이상의 아미노산이

치환되더라도 치환되기 전의 아미노산이 치환된 아미노산과 화학적으로 등가라면, 그러한 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 여전히 본래의 폴리펩티드의 기능을 보유할 것이다. 예컨대, 소수성 아미노산인 알라닌이 다른 소수성의 아미노산, 예를 들면 글리신, 또는 보다 더 소수성인 아미노산, 예를 들면 발린, 류신 또는 이소류신으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드는 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 마찬가지로, 음으로 하전된 아미노산 예컨대, 글루탐산이 다른 음으로 하전된 아미노산, 예컨대 아스파르산으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드도 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이며, 또한 양으로 하전된 아미노산, 예컨대 아르기닌이 다른 양으로 하전된 아미노산, 예컨대, 리신으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드 또한 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 또한 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 부분에서 치환된 아미노산(들)을 포함하는 폴리펩티드도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 당업자라면, 그 전술한 바의 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 여전히 보유하는 폴리펩티드를 제조할 수 있다. 또한 당업자라면 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 여전히 위 기능을 가지는가를 확인할 수 있다. 더구나 본 명세서가 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 개시하고 있고 또한 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지님을 확인한 실시예를 개시하고 있기 때문에, 본 발명의 "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 당업자에게 용이하게 실시 가능한 것임이 분명하다. 그러므로 "상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도 여전히

식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미로서 이해되어야 한다. 이처럼 "상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미이지만, 그럼에도 활성의 정도라는 관점에서 봤을 때, 상기 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 서열 상동성이 높을수록 바람직하다. 상기 폴리펩티드는 서열 상동성의 하한에 있어서 60% 이상의 서열 상동성을 지니는 것이 바람직한 반면, 서열 상동성의 상한에 있어서는 당연히 100%의 서열 상동성을 지니는 것이 바람직하다. 보다 더 구체적으로 위 서열 상동성은 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 순서대로 높아질수록 바람직하다. 그리고 본 발명의 "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 "서열번호 2의 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드" 뿐만 아니라 '서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드'를 포함하므로 전술한 바의 모든 설명은 "서열번호 2의 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드"에 대해서 뿐만 아니라 "서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드"에 대해서도 적용되어진다.

본 발명은 다른 측면에 있어서, 전술한 바의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 대한 것이다. 여기서 "전술한 바의 폴리펩티드"란 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지니면서 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드, 및 위 폴리펩티드들과 실질적으로 유사한 폴리펩티드를

포함할 뿐만 아니라, 전술한 바의 바람직한 양태의 모든 폴리펩티드들을 포함하는 의미이다. 그러므로 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지니면서, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체 또는 그 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드 및 이러한 폴리펩티드들에 실질적으로 유사한 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 나아가 바람직한 양태로서 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지니면서 전술한 바의 서열 상동성의 순서대로 그 서열 상동성을 지니는 모든 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 아미노산 서열이 밝혀졌을 때, 그러한 아미노산 서열에 기초하여 그러한 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 당업자라면 용이하게 제조할 수 있다.

한편 본 명세서에서 상기 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 화학적으로 합성된 폴리뉴클레오티드, 생물체 특히 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 분리된 폴리뉴클레오티드 및 변형된 뉴클레오티드를 함유한 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하며, 단일 가닥 또는 이중 가닥의 RNA 또는 DNA의 중합체를 모두 포함하는 것으로서 정의된다.

본 발명은 또 다른 측면에 있어, 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법은 (a) 식물체에서 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 과발현시키는 단계 및 (b) 노화가 지연된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.

본 명세서에서, "노화 지연"이란 야생형 식물체에 비하여 식물 수명이 연장된 특성을 말하며, 구체적으로는 잎 및/또는 줄기의 황화 현상 및/또는 괴사 현상이 야생형 식물체 비하여 지연되거나 식물체의 엽록소 함량이 야생형 식물체에 비하여 많거나 식물체의 광합성 효율이 야생형 식물체 비하여 높은 특성 말한다.

또한 본 명세서에서, "식물체"란 성숙한 식물, 미성숙

식물(유식물체), 식물 종자, 식물 세포, 식물 조직 등을 포함하는 의미이다. 식물 세포나 식물 조직이 형질전환에 사용될 경우에 형질전환된 식물 세포나 식물 조직은 유럽특허 EP0116718, 유럽특허 EP0270822, 국제특허 WO 84/02913, 문헌[Gould et al. 1991, Plant Physiol 95,426-434] 등에 개시된 방법을 사용하여 성숙한 식물체로 발육·성장시킬 수 있다.

또한 본 명세서에서, "식물"이란 노화 지연이 인간에게 유용한 결과를 줄 수 있는 모든 식물을 포함한다. 노화 지연은 생산량 증가 즉 종자 생산성 및/또는 개체의 생체량 증가와 직결되므로, 상기 식물의 의미에는 일차적으로 생산성 증대가 인간에게 유용한 식물인 작물, 예컨대 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수, 십자화과 채소(배추, 청경채, 케일, 콜리플라워, 브로콜리, 열무(young radish), 무, 갓 등), 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나 등이 포함될 것이고, 기타 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립 등이 포함될 것이다.

또한 본 명세서에서 "서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자"란 첫째 서열번호 2의 아미노산을 암호화하면서도 코돈의 축퇴성(codon degeneracy)으로 인하여 서열번호 1의 유전자와 다른 염기서열을 갖는 유전자와, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자의 동족체(homologue)로서 식물의 노화 지연 기능을 지니면서 식물의 종류에 따른 진화적 경로의 상이로 인하여 서열번호 1의 염기서열과 다른 염기서열로 이루어진 모든 유전자를 포함하는 의미이다. 여기서 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 서열 상동성이 높을수록 바람직하고, 가장 바람직하게는 당연히 100%의 서열 상동성을 지닐 때이다. 한편, 서열 상동성의 하한에 있어서는 상기 유전자가 서열번호 1의 염기서열과 60% 이상의 서열 상동성을 지니는 경우가 바람직할 것이다. 보다 더

구체적으로는 위 서열 상동성이 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 순서대로 높아질수록 바람직하다.

또한 본 명세서에서, "과발현"이란 야생형 식물체에서 발현되는 수준 이상의 발현을 의미한다. 이러한 "과발현"여부는 상기 서열번호 1의 유전자나 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자(예컨대 cDNA)를 정량하여 직접적으로 결정하거나 그 유전자가 암호화하는 단백질을 정량하여 간접적으로 정량할 수 있다. 또한 그 유전자의 특성에 따라 나타난 표현형을 통해서도 확인할 수 있다.

본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 있어서, 상기 단계 (a)는 유전공학적인 방법으로 수행될 수 있다.

유전공학적인 방법은 (i) 상기 서열번호 1의 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계, 및 (ii) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하여 구성된다.

본 명세서에서, "작동 가능하게"란 어떤 유전자의 전사 및/또는 번역이 영향을 받도록 연결된다는 의미이다. 예컨대 어떠한 프로모터가 그것에 연결된 어떤 유전자의 전사에 영향을 준다면 그 프로모터와 그 유전자는 작동 가능하게 연결된 것이다.

또 본 명세서에서, "조절 서열"이란 그것의 존재가 그것에 연결된 유전자의 전사 및/또는 번역에 영향을 미칠 수 있는 모든 서열을 포함하는 의미이며, 이러한 조절 서열에는 프로모터 서열, 전사종결 서열(polyadenylation signal), 복제 개시점을 포함한다.

또한 본 명세서에서, "프로모터"는 당업계에 알려진 통상의 의미를 따르는데, 구체적으로는 어떤 유전자의 전사 개시점을 기준으로 상류(5'쪽)에 위치하고, DNA-의존 RNA 중합효소에 대한 결합 부위, 전사 개시점, 전사 인자 결합 부위 등을 포함하는, 하나 이상의 유전자의 전사를 제어하는 기능을 갖는 핵산

서열을 의미한다. 이러한 프로모터는 그것이 진핵생물 유래일 경우 전사 개시점 상류에 있는 TATA 박스(통상 전사 개시점(+1) -20 내지 -30 위치에 존재), CAAT 박스(통상 전사 개시 부위와 비교하여 대략 -75 위치에 존재), 5'인핸서, 전사 억제 인자 등을 포함한다. 사용 가능한 프로모터는 그것에 연결된 서열번호 1의 유전자를 과발현시킬 수 있는 프로모터라면 구성적 프로모터(모든 식물체 조직에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터), 유도성 프로모터(특정 외부 자극에 반응하여 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터 또는 특정 발달 시기나 특정 조직에서 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터) 모두 사용될 수 있다. 사용 가능한 구성적 프로모터의 대표적인 예로는 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터를 들 수 있고, 그 밖에 유비퀴틴(ubiquitin) 계열의 프로모터 (Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18, 675-689; EP0342926; Cornejo et al., 1993, Plant Mol. Biol. 23, 567-581), 벼 액틴 프로모터(Zhang et al. 1991, The Plant Cell 3, 1155-1165) 등을 들 수 있다. 사용 가능한 유도성 프로모터의 예로는 구리 이온에 의해 활성화되는 효모 메탈로티오네인 프로모터(Mett 등, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 90:4567, 1993), 치환 벤젠설폰아미드에 의해 활성화되는 In2-1 및 In2-2 프로모터(Hershey 등, Plant Mol. Biol., 17:679, 1991), 글루코코르티코이드에 의해 조절되는 GRE 조절 서열(Schena 등, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 88:10421, 1991), 에탄올 조절성 프로모터(Caddick 등, Nature Biotech., 16:177, 1998), 리블로스 비스-포스페이트 카르복실라제(ssRUBISCO)의 소서브유니트에서 유래한 광조절성 프로모터(Coruzzi 등, EMBO J., 3:1671, 1984; Broglie 등, Science, 224:838, 1984), 만노핀 신타제 프로모터(Velten 등, EMBO J., 3:2723, 1984), 노팔린 신타제(NOS) 프로모터, 옥토펜 신타제(OCS) 프로모터, 열충격 프로모터(Gurley 등, Mol. Cell. Biol., 6:559, 1986; Severin 등, Plant Mol. Biol., 15:827, 1990) 벼 글루테린(glutelin) 프로모터, 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 등을 들 수 있다.

전사 종결 서열은 poly(A) 첨가 신호(polyadenylation signal)로 작용하는 서열로서 전사의 완결성 및 효율성을 높이기 위한 것이다. 사용될 수 있는 전사 종결 서열의 예로는 노팔린 신타아제(NOS) 유전자의 전사 종결 서열, 베타-아밀라아제 RAmy1 A 유전자의 전사 종결 서열, 아그로박테리움 투메파시엔스의 옥토파인 (Octopine) 유전자의 전사 종결 서열, 밀 열 쇼크 단백질 17의 전사 종결 서열, 밀 유비퀴틴 유전자의 전사 종결 서열, 베타 글루테린 유전자의 전사 종결 서열, 베타 락테이트 디하이드로게나제 유전자의 전사 종결 서열 등을 들 수 있다.

상기 발현벡터는 선별 마커 유전자를 포함할 수 있다. 여기서 "마커 유전자"란 그러한 마커 유전자를 포함하는 식물체의 선별을 가능하게 하는 형질을 암호화하는 유전자를 의미한다. 마커 유전자는 항생물질 내성 유전자일 수 있고 제초제 내성 유전자일 수도 있다. 적합한 선별 마커유전자의 예로는 아데노신 데아미나제의 유전자, 디히드로폴레이트 리덕타제의 유전자, 하이그로마이신-B-포스포트랜스퍼라제의 유전자, 티미딘 키나제의 유전자, 크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제의 유전자, 포스핀-노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자 등을 들 수 있다. 본 명세서에서, 상기 "형질전환"이란 왜래 유전자가 도입됨에 의한 숙주 식물체의 유전자형의 변형을 의미하며, 그 형질전환에 사용된 방법과 상관없이 그 왜래 유전자가 숙주 식물체, 더 정확하게는 숙주 식물의 세포 내로 도입되어 세포의 게놈에 통합된 것을 의미한다. 여기서 왜래 유전자에는 동종성 유전자와 이종성 유전자가 포함되는데, "동종성 유전자"란 숙주 유기체 또는 그와 동일한 생물종의 내인성 유전자를 의미하며, "이종성 유전자"란 그것이 형질전환되는 유기체에서는 존재하지 않는 유전자를 말한다. 예컨대 애기장대 유래 유전자는 애기장대 식물에게는 동종성 유전자이지만 토마토 식물에서는 이종성 유전자가 된다.

한편, 외래성 유전자로 식물을 형질전환시키는 방법은 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있는데, 예컨대 유전자 총을 사용한 직접적인 유전자 전달 방법, 프로탈 딥(floral dip)을 이용한 *in planta* 형질전환 방법,

화분 매개 형질전환 방법, 원형질체의 형질전환 방법, 바이러스 매개 형질전환 방법, 리포솜 매개 형질전환 방법 등을 사용할 수 있다. 또한 특정 식물체에 적합한 형질전환 방법을 선택하여 사용할 수도 있는데, 예컨대 옥수수를 형질전환시키는 방법은 미국특허 US 6,140,553, 문헌(Fromm et al, 1990, Bio/Technology 8, 833-839), 문헌(Gordon-Kamm et al, 1990, The Plant Cell 2, 603-618) 등에 개시된 방법을 사용할 수 있으며, 벼를 형질전환시키기 위한 방법은 문헌(Shimamoto et al, 1989, Nature 338, 274-276), 문헌(Datta et al 1990, Bio/Technology 8, 736-740), 국제특허 WO 92/09696, 국제특허 WO 94/00977, 국제특허 WO 95/06722 등에 개시된 방법을 사용할 수 있다. 또 토마토나 담배 형질전환에 있어서는 문헌(An G. et al., 1986, Plant Physiol. 81: 301-305), 문헌 (Horsch R.B. et al, 1988, In: Plant Molecular Biology Manual A5, Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp 1-9), 문헌(Koormeef M. et al, 1986, In: Nevins DJ. and R.A. Jones, eds. Tomato Biotechnology, New York, NY, USA, Alan R. Liss, Inc. pp 169-178) 등에 개시된 방법을 사용할 수 있다.

일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이, 형질전환된 아그로박테리움으로 유식물체, 식물 종자 등을 감염시키는 방법이다.

이러한 아그로박테리움이 매개된 형질전환 방법은 당업계에 잘 공지되어 있으며(Chilton 등, 1977, Cell 11:263:271; 유럽특허 EP 0116718; 미국특허 US 4,940,838), 특정 식물체에 적합한 방법도 당업계에 공지되어 있다. 예컨대 목화에 대해서는 미국특허 US 5,159,135, 콩에 대해서는 미국특허 US 5,824,877, 옥수수에 대해서는 미국특허 US 5,591,616 등을 참조할 수 있다. 아그로박테리움 매개 형질전환 방법은 Ti-플라스미드를 이용하는데, 이 플라스미드에는 T-DNA를 식물 세포의 게놈으로 통합시킬 수 있는 좌우 경계(border) 서열이 포함될 것이다.

한편, 상기 (b) 선별 단계는 형질전환된 식물체를 발육·성장시켜, 잎의 황화 현상의 진행 정도나 잎의 괴사 현상의 진행 정도 등을 통해 육안으로 선별하거나, 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께

형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있으며, 나아가 엽록소 함량, 광합성 효율 등을 정량하는 방법, 상기 방법들을 혼합한 방법 등을 통하여 선별할 수 있다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법은 (a) 식물체에서 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 과발현시키는 단계 및(b) 생산성 증대 특성을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.

본 명세서에서, "생산성 증대 특성"이란 식물체의 전체, 줄기, 뿌리 및/또는 잎의 생체량(biomass; 크기 및/또는 질량)이 야생형 식물체에 비하여 증가한 특성 및/또는 식물체의 종자의 생산성(식물 1개체 당 종자의 수 및/또는 질량)이 야생형 식물체에 비하여 증가한 특성을 말한다.

상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적인 방법에 대해서는 상기 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

상기 (b) 단계는 식물체의 생체량 및/또는 종자 생산성을 비교하여 선별하거나, 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있으며, 또는 이들의 방법을 혼합하여 선별할 수도 있다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 스트레스 내성 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 스트레스 내성 식물체의 제조 방법은 (a) 식물체에서 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 과발현시키는 단계 및(b) 스트레스 내성 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.

본 명세서에서, "스트레스"는 가뭄 스트레스 및/또는 산화적 스트레스를 의미한다.

상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적인 방법에 대해서는 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와

같다.

상기 (b) 단계는 식물체의 스트레스 내성을 비교하여 선별하거나(예컨대 잎의 황화 현상의 진행 정도, 잎의 괴사 현상의 진행 정도, 잎 및/또는 줄기의 생체량, 엽록소 함량, 광합성 효율 등) 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있으며, 또는 이들의 방법을 혼합하여 선별할 수도 있다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체의 노화를 지연시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 식물체의 노화를 지연시키는 방법은 (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키고 (b) 그 발현 벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체의 생산성 증대 방법에 관한 것이다.

본 발명의 식물체의 생산성 증대 방법은 (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키고 (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법은 (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키고 (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.

상기 방법들에서 상기 (a) 및(b) 단계는 상기 본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법에 의하여 얻어진, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호

1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자가 과발현된 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG4 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자로 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 의하여 얻어진, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자가 과발현된 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG4 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG4*이 도입되어 과발현됨으로써 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 스트레스 내성 식물체의 제조 방법에 의하여 얻어진, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자가 과발현된 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG4 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG4*이 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체이다.

본 명세서에서, 상기 "형질전환 식물체"는 성숙한 식물로 발육·성장할 수 있는 식물 세포, 식물 조직, 또는 식물 종자에 상기 유전자가 도입되어 형질전환된 경우뿐만 아니라 형질전환된 식물과의 교배에 의해 얻어지는 계놈이 변형된 식물체, 식물 종자, 식물 세포를 포함한다.

【발명의 효과】

전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는

ATPG4 단백질과 그 유전자를 제공할 수 있다. 상기 유전자는 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 제공하므로, 이 유전자로 식물체를 형질전환시킬 경우, 식물의 노화를 지연시키거나 생산성을 증대시키거나 스트레스 내성을 가지는 식물체를 제작할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 가지는 *ATPG4* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 2는 상기 도1의 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 발아 후 50일과 70일 동안 생육시킨 애기장대의 사진이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

ATPG4 ox-2: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-5: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-7: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 3은 상기 도1의 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 자엽 생성 후 20일 동안 생육시킨 애기장대의 *ATPG4* 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

Wt: 애기장대 야생형

ATPG4 ox-2: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-5: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-7: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 4는 애기장대 야생형의 다양한 식물 기관에서 *ATPG4* 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

S: seedling, R: root, Ar: arial region, GL: green leaf, YL: yellow leaf, St: stem, F: inflorescence organ

도 5는 상기 도3의 애기장대 라인의 생산성 증대에 대한 그림이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

ATPG4 ox-2: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-5: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-7: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

Height: 키, NTS: 장각과 수, Dry-W: 생체 건량, TSW: 총종자 무게, TNS: 총종자 수, 1,000SW: 1,000개의 종자 무게

도 6은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 7은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 8은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

도 9는 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, *ACT2*를 PCR 양성 대조구로 사용하였다. *CAB2*은 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자이고, *SEN4* 및 *SAG12*는 노화 유전자로서, 노화 마커 유전자들이다.

도 10은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 11은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 12는 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

도 13은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, *ACT2*를 PCR 양성 대조구로 사용하였다. *CAB2*, *SEN4*, 그리고 *SAG12*는 노화 마커 유전자이다.

도 14는 상기 도1의 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 발아 후 55일 동안 생육시킨 애기장대의 사진이다.

Col-0: 애기장대 야생형

Con: 애기장대 대조구

ATPG4 ox-1: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-2: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-3: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-4: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-5: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-6: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-7: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG4 ox-8: pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 15는 상기 13의 형질전환 애기장대의 T₂ 라인들에 대한 자엽 생성 후 24일째 식물의 *ATPG4* 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 상기 13의 형질전환 애기장대의 T₂ 라인들에 대한 생산성 증대 지표로서 총중량 수확량에 대한 그림이다.

도 17은 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어난 식물의 표현형적 변화를 도시한 그림이다.

도 18은 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어난 식물의 잎 무게 변화를 도시한 그림이다.

도 19는 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 표현형 변화를 도시한 그림이다.

도 20은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 엽록소 함량 변화를 도시한 그림이다.

도 21은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*, 그리고 *ATPG4 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 광합성 효율 변화를 Fv/Fm로 도시한 그림이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하 본발명의 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 애기장대로부터 식물의 생산성 증대와 노화 지연을 조절하고 또한 스트레스 내성을

제공하는 ATPG4 유전자의 분리

식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 *ATPG4* 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다.

<실시예 1-1> 애기장대의 재배 및 배양

애기장대는 토양을 담은 화분에서 재배하거나, 2% 수크로스(sucrose, pH 5.7)와 0.8% 아가(agar)가 포함된 MS(Murashige and Skoog salts, Sigma, USA) 배지를 넣은 페트리 디쉬에서 재배하였다. 화분에서 재배할 때는 22°C의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 성장 조절기(growth chamber)내에서 재배하였다.

<실시예 1-2> RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

애기장대 cDNA 라이브러리를 만들기 위해서 여러 분화 단계의 애기장대 전체 기관으로부터 RNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하여 RNA를 추출하였고, 추출된 전체 RNA로부터 Superscript III Reverse Transcriptase (INVITROGEN, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

<실시예 1-3> 식물의 생산성 증대와 노화 지연을 조절하고 또한 식물의 스트레스 내성을 제공하는 ATPG4 유전자분리

애기장대의 AT-HOOK MOTIF NUCLEAR-LOCALIZED PROTEIN (GeneBank accession number NP_566232.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머 (*PacI*/AT3G04570 SOE-F, 5'-TTA ATT AAA TGG CGA ATC CAT GGT GGA CAG-3')와 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*XbaI*/AT3G04570 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA AAA TCC TGA CCT AGC TTG AGC -3')를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 상기 <실시예 1-2>에서 제조된 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 32 kDa의 분자량을 갖는 315개의 아미노산을 암호화하는 948bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG4*(AT-hook protein of

Genomine 4)로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 ATPG4 단백질의 등전점(isoelectric point)은 6.3으로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "ATPG4" 혹은 "ATPG4 유전자"라하고, 단백질은 "ATPG4" 혹은 "ATPG4 단백질"이라고 한다).

<실시예 2> ATPG4 유전자에 대한 센스 구성체 (construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 노화에 대한 특성 분석

<실시예 2-1> ATPG4 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

상기 유전자가 식물의 생산성 증대와 노화 지연을 조절하고 또한 식물의 스트레스 내성을 제공하는지를 확인하기 위하여 ATPG4 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 ATPG4 전사체의 발현을 변화시켰다.

서열번호 3으로 표시되고 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머 및 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 ATPG4 cDNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *PacI*과 *XbaI*으로 절단하고, 유도성 프로모터(inducible promoter)인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 ATPG4 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

한편, 도 1은 pCSEN 벡터에 ATPG4 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터를 도시한 그림이다. 도1에서 BAR는 바스타 제초제에 대한 저항성을 부여하는 BAR 유전자(phosphinothricin acetyltransferase gene)를 가리키고, RB는 오른쪽 경계(Right Border), LB는 왼쪽 경계(Left Border), P35S는 CaMV 35S 프로모터, 35S-A는CaMV 35S RNA polyA, PSEN은 SEN1 프로모터, Nos-A는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를가리킨다.

상기 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)에

일렉트로포레이션(electroporation) 방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28°C에서 O.D.₆₀₀값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25°C에서 5,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 최종 O.D.₆₀₀값이 2.0이 될 때까지Infiltration Medium (IM; 1X MS SALTS, 1X B5 vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77, Lehle Seed, USA) 배지에 현탁하였다. 4주된 애기장대를 진공 챔버(vacuum chamber)에 있는 아그로박테리움 현탁액에 침지시키고, 10분 동안 10⁴Pa의 진공 하에 두었다. 침지 후, 애기장대를 24시간 동안 폴리에틸렌 백(polyethylene bag)에 두었다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T₁)를 수확하였다. 대조군으로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 ATPG4 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

<실시예 2-2> T₂ 형질전환 애기장대의 특성 분석

상기 <실시예 2-1>에서와 같이 형질전환한 애기장대에서 수확한 종자는 0.1% 바스타(Basta) 제초제(경농, 한국) 용액에서 30분 동안 침지시키고 배양함으로써 선별하였다. 이후 형질전환한 애기장대의 생육 동안 상기 화분에 바스타 제초제를 5회 처리한 후, 각 화분에서 형질전환된 애기장대를 선별하였다. pCSEN-ATPG4 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조군(ATPG4 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 변이체들은 뚜렷한 노화 지연 특성을 보였다. 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 우선, 3일 동안 저온 처리(4°C)한 T₂ 형질전환 종자를 화분에서 재배한 후 바스타 제초제 처리를 통하여 T₂ 형질전환 애기장대를 선별하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 받아 후50일째, 그리고 70일째 수행하였다(도 2). pCSEN-ATPG4 구성체를 가지고 있는 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼때, 식물체의 노화 지연

현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 노화 지연 표현형뿐만 아니라 노화 지연 동안 개체 크기와 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 노화 지연 현상과 생산성 증대는 라인 마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 도 3에서 나타나듯이 유전자의 과발현이 라인 마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다.

선별된 노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 *ATPG4* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체의 잎으로부터 RNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하여 전체 RNA를 각각 추출하였다. 각각 1µg의 RNA를 주형으로 하고, Superscript III Reverse Transcriptase (INVITROGEN, USA)을 이용하여 65°C에서 5분 50°C에서 60분 및 70°C에서 15분의 조건으로 cDNA를 합성하였다. 이후, 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 하기 *ATPG4* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C에서 2분간 가열하여 주형 DNA를 변성시킨 후, 94°C에서 1분 55°C에서 1분 30초 및 72°C에서 1분을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72°C에서 15분간 최종 반응시켜 수행하였다. 이후, 1% 아가로스 겔 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였으며, 그 결과는 도3에 도시되었다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체의 *ATPG4* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG4* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

ATPG4 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체들은 모두 대조구에 비하여 개체 크기, 종자 수확량 등의 생산성 증대 형질이 높은 것으로 나타났다. 그런데 흥미로운 사실은 유전자의 상대적 발현 정도가 가장 높은 *ATPG4 ox-5* 변이체는 *ATPG4 ox-2*와 *ATPG4 ox-7* 변이체에 비하여 생산성 증대에 대한 효과는 상대적으로 약한 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 생산성 증대와 노화 지연에 대한

표현형적 특징을 가진 식물을 임의로 제작할 수 있을 것으로 판단된다

【표 1】 *ATPG4* 유전자와 *ACT* 유전자 발현을 위한 프라이머 서열 및 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	<i>ATPG4</i>	CTCGCGATTCTCCAAATGCT(서열번호 5)/ GCTAGGGTTTCGATGACGTCAGT'(서열번호 6)
2	<i>ACT</i>	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAACCCAGCCTTC (서열번호 8)

한편 애기장대 야생형의 *ATPG4* 유전자의 식물체 기관별 발현 양상을 분석하기 위하여 애기장대 야생형의 다양한 발달 단계에서 기관별 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 이를 주형으로 하여 *ATPG4* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과는 도4에서 도시된 바와 같이, *ATPG4* 유전자의 발현은 주로 잎에서 이루어지는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 줄기와 Inflorescence organ에서도 발현이 이루어짐을 알 수 있었다. 그런 반면, 발달 초기의 유식물(seedling)과 뿌리에서는 유전자의 발현이 현저히 낮음을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자는 식물의 잎, 줄기와 Inflorescence organ에서 주로 기능을 가져 식물의 노화 조절에 관여할 것으로 판단되는 반면, 뿌리와 발달 초기의 유식물 등식물의 발달 초기에는 기능을 거의 가지지 않은 것으로 판단된다.

<실시에 3> *ATPG4* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석

ATPG4 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 라인별로 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다.

적용된 생산성 증대 지표는 식물의 키(height), 장각과(silique) 수(NTS), 생체건량(dry-W), 총 종자 무게(TSW), 총 종자 수(TNS), 그리고 1,000개의 종자

무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20개체의 평균값이다.

ATPG4 ox-2, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 1.5배 이상 종자 무게에 있어서 증가하는 것으로 나타났으며, 종자 1,000개의 무게에는 *ATPG4 ox-2* 변이체가 대조구에 비하여 1.4배 이상 증가한 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 본유전자의 발현은 종자의 개별 크기와 전체 무게에 대해 모두 증가 현상을 제공하는 것으로 사료된다. 그리고 생체량과 생체 건량에 있어서도 과발현 변이체는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상을 가졌다. 이러한 사실은 *ATPG4* 유전자가 노화 지연과 더불어 개체 크기, 종자 크기 및 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다(도5). 따라서 본 유전자의 타작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

<실시예 4> *ATPG4* 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석

ATPG4 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T₂ 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

<실시예 4-1> *ATPG4* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 잎의 표현형적 변화

자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 28일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일 이후부터 일어남을 확인할 수 있었다(도6). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG4* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다.

<실시예 4-2> *ATPG4* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 엽록소 함량 변화

엽록소의 함량 측정을 위해 각 시료 잎을 80% (V/V) acetone을 사용하여 엽록소를 추출하였다. 엽록소 함량은 663.2 nm와 664.8 nm의 흡광 계수를 이용하여 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(Biochemical Society Transduction 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였다. 그 결과, 도7에 도시된 바와 같이, 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격한 감소를 보이며 36일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 경우 자엽 생성 후 28일이 되었을 때도 측정 초기의 60% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다.

<실시예 4-3> *ATPG4* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 광합성 효율 변화

오 등의 방법(Plant Mol. Biol. 30:939, 1996)을 이용하여 광합성 효율을 측정하였다. 우선 각 DAE(day after emersion)의 잎을 15분간 암 처리한 후, 식물 효율 분석기(Plant Efficiency Analyzer)(Hansatech)를 이용하여 엽록소의 형광을 측정하였다. 광합성 효율은 엽록소의 형광도 특성을 이용한 PS II(photosystem II)의 광화학적 효율(photochemical efficiency)로 나타내었는데, 형광도 최대치(maximum value of fluorescence; F_m)에 대한 최대 변형 형광도(maximum variable fluorescence; F_v)의 비율(F_v/F_m)로 나타내었다. 상기 수치가 높을수록 광합성 효율이 우수함을 나타낸다.

그 결과, 도 8에 도시된 바와 같이, 야생종은 자엽 생성 후 32일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 36일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 경우 자엽 생성 후 36일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않다가 40일째 이후 활성 소실이 일어났다. 상기 결과로부터, *ATPG4* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG4* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

<실시예 4-4> *ATPG4* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 노화 관련 유전자의 발현 변화

야생종과 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence associated

gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG4* 유전자와 각노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다.

Total RNA의 분리는 WelPrep™ Total RNA Isolation Reagent (JBI)를 이용하였으며, DNase I (Ambion)을 처리한 후, 정량을 통해 0.75ug을 ImProm-II™ Reverse TranscriptionSystem (Promega)을 이용해 first cDNA를 합성하였다.

ATPG4 유전자 및 노화에 대한 마커(marker) 유전자들에 대한 정량적인 분석은 Applied Bio-systems의 7300 Real Time PCR System을 이용한 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 과정을 통해 확인하였다. 노화 마커 유전자로는 *SAG12*, *SEN4* 및 *CAB2* 유전자를 사용하였으며, qRT-PCR 양성 대조구로는 *ACT2* 유전자를 사용하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 2에서 제시하였다.

【표 2】

노화관련 유전자의 발현을 위한 프라이머 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	<i>CAB2</i>	CCGAGGACTTGCTTTACCCC (서열번호 9)/ AACTCAGCGAAGGCCTCTGG (서열번호 10)
2	<i>SEN4</i>	CGTCGATGACACACCCATTAGAG(서열번호 11)/ CATCGGCTGTCTCTTGGAAAC(서열번호 12)
3	<i>SAG12</i>	ACGATTTTGGCTGCGAAGG (서열번호 13)/ TCAGTTGTCAAGCCGCCAG (서열번호 14)
4	<i>ACT2</i>	ATGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAACCAGCCTTC (서열번호 8)
5	<i>ATPG4</i>	CTCGCGATTCTCAAATGCT (서열번호 5)/ GCTAGGGTTTCGATGACGTCACT (서열번호 6)

야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 야생형과 *ATPG4* 과발현 변이체들은 비슷한 감소 양상을 나타내었다. 그러나 노화의 signal로 사용되는 *SAG12* 발현의 경우, 야생종은 32일째 최대 발현을 나타내는 반면, *ATPG4* 과발현 변이체들은 36일까지 증가 현상이 거의 나타나지 않다가 40일째에도 야생종에 하여 약한 signal을 나타냈다. 그리고 식물의 노화동안 점진적으로 발현이 증가되는 것으로 알려진 *SEN4*의 발현은 야생종에서는

20일 이후 급격하게 증가하는 반면, *ATPG4* 과발현 변이체들은 노화 전 과정동안에도 *SEN4*의 발현 증가가 크게 나타나지 않았다. 한편 *ATPG4* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 전체적으로 *ATPG4* 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 발현 수준이 현저히 높으며 노화 동안 라인별로 정도의 차이는 있지만 28일 이후 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(도 9). 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG4* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

<실시예 4-5> *ATPG4* 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG4* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액(2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 상기 <실시예 4-1 내지 4-4>와 동일한 방법으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 6일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 보여지며, 특히 *ATPG4 ox-5*의 경우 지연현상이 더욱 뚜렷함을 확인할 수 있었다(도 10). 암 처리에 의한 노화 동안 엽록소 함량과 광합성 효율 변화에 있어서도 야생종에 비하여 *ATPG4* 변이체들은 정도의 차이는 있지만 함량 및 활성 감소가 지연됨을 알 수 있었다(도 11과 12).

또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 상기 <실시예 4-4>와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 도 13에 도시된 바와 같이, 야생형에 비하여 *ATPG4*

변이체들은 *SAG12*의 발현이 지연되고, *SEN4*의 발현율이 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 보아 *ATPG4* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

<실시예 5> *ATPG4* 과발현으로 인한 식물 노화 지연과 생산성 증대의 상관관계 분석

ATPG4 과발현 정도에 따른 변이체의 노화 지연과 생산성 증대에 대한 상관관계를 분석하기 위하여, T₂ 세대 10 라인을 선별하여 노화 지연 및 생산성 증대에 대한 그들의 표현형적 특징, 변이체 라인들의 *ATPG4* 과발현 정도, 그리고 변이체 라인들의 생산성 증대를 조사하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

<실시예 5-1> *ATPG4* 과발현 변이체의 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특성 분석

ATPG4 과발현 변이체의 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특성을 분석하기 위하여 <실시예 2-2>에서 분석한 T₂ 형질전환 애기장대 3라인 외에 추가로 5라인을 선별하여 총 8라인의 T₂ 형질전환 애기장대 라인과 애기장대 야생형(Col-0)과 대조구(Con)의 표현형적 변화를 비교하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 55일째 수행하였다(도 14).

전체적으로 *ATPG4 ox-1*과 *ATPG4 ox-8* 변이체 라인을 제외하고 나머지 6 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 노화 지연의 표현형적 특징을 가지고 있으며, 특히 *ATPG4 ox-3*, *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체 라인들은 노화 지연의 표현형적 특징이 강력하게 나타나는 것으로 확인되었다. 그런 반면 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 노화 지연 현상보다 개체 크기와 silique 생산량 등의 생산성 증대에 있어서 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌다. 변이체 라인들의 이러한 표현형적 특징은 앞서 언급한 바와 같이 변이체 라인별로 유전자의 상대적 발현 정도의 차이에 기인하는 것으로 판단되며, 이를 증명하기 위하여 각 라인들에 대한 유전자 발현 정도를 분석하였다.

<실시예 5-2> 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특성을 가지는 *ATPG4* 과발현 변이체의 *ATPG4* 유전자 과발현 정도 분석

실시예 5-1에서와 같이 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특징과 *ATPG4* 유전자의 상대적 과발현 정도와의 상관관계를 분석하기 위하여 자엽 생성 후 24일째의 변이체의 *ATPG4* 유전자의 발현 양상을 조사하였다. *ATPG4* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자에 대해 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용한 결과는 도15에서 도시되었다.

변이체 8라인 모두 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG4* 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG4* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

흥미롭게도, 노화지연 표현형이 강력한 *ATPG4 ox-3*, *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체들은 *ATPG4* 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 반면, 개체 크기와 silique 생산량 증가와 같은 생산성 증대의 표현형적 특징을 가지는 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체들은 모두 *ATPG4* 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 식물의 생산성 증대 혹은 노화지연의 표현형적 특징을 가지는 작물을 임의적으로 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

<실시예 5-3> *ATPG4* 과발현 변이체의 *ATPG4* 유전자 과발현 정도와 생산성 증대에 대한 특성 분석

ATPG4 과발현 변이체의 *ATPG4* 유전자 과발현 정도와 생산성 증대에 대한 특성을 보다 정확히 분석하기 위하여 변이체 라인들의 총 종자 무게를 애기장대 야생형과 비교, 분석하였다.

ATPG4 ox-3, *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체들에 비하여 *ATPG4* 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체들은 종자 수확량에 있어서 애기장대 대조구에 비하여 1.7배 이상 증가하는 것으로 나타난 반면, 유전자의 발현 정도가 상대적으로 높은 *ATPG4 ox-3*, *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체들은 애기장대 대조구에 비하여 1.3배 이하의 증가율, 심지어 *ATPG4 ox-6* 변이체는 오히려 감소율을 가지는 것으로 나타났다(도 16).

흥미로운 사실은 생산성 증대 특정 형질을 가지는 변이체 라인들의 수확 시기는 애기장대 대조구와 큰 차이가 없다는 것이다. 이러한 사실은 본유전자의 과발현으로 인한 생산성 증대는 대조구의 수확시기가 비슷하여 작물의 수확시기에 대한 문제점을 최소화할 수 있다는 것이다.

이러한 실시예 5의 결과를 종합해보면, 먼저 *ATPG4* 유전자의 발현 정도가 높으면 높을수록 식물의 노화지연 특징이 강력하게 나타나는 것으로 판단되며, 이러한 제안은 본 유전자의 적용은 녹기 연장을 요구하는 식물 혹은 작물에 많은 장점을 제공할 것이라 생각된다. 또한 *ATPG4* 유전자 발현의 적정 범위 조절은 수확시기가 대조구와 비슷한 식물의 생산성 증대 특징을 강력하게 나타내는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 발현을 조절할 수 있는 프로모터(비교적 발현이 낮은 프로모터, 유도성 프로모터, 기관 혹은 화합물 특이적 프로모터 등)를 적용하면 생산성 증대 작물 개발에 많은 장점을 제공하리라 판단된다.

<실시예 6> *ATPG4* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석

<실시예 6-1> *ATPG4* 과발현 변이체의 가뭄 스트레스에 대한 특성 분석

ATPG4 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성 (drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 도17과 18에 도시되었다. 야생형 애기장대는 가뭄에 의해 잎의 황화 현상이 급속히 진행됨을 알 수 있었으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 가뭄에 의하여 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그에 비하여 *ATPG4* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG4*가 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을

제공한다는 것을 의미한다.

<실시예 6-2> *ATPG4* 과발현 변이체의 H_2O_2 스트레스에 대한 특성 분석

ATPG4 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H_2O_2 을 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 2일 간격으로 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H_2O_2 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG4* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소에 있어서도 지연됨을 확인할 수 있었다(도19, 20과 21). 이러한 사실은 *ATPG4*가 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

따라서 *ATPG4* 유전자는 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성을 제공하여 스트레스 저항성 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 2에 개시된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 갖고, 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 *ATPG4* 단백질.

【청구항 2】

제1항의 단백질을 암호화하는 *ATPG4* 유전자.

【청구항 3】

- (a) 제2항의 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계,
- (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계, 및
- (c) 노화가 지연된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 노화가 지연된 식물체의 제조 방법.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 노화가

지연된 식물체의 제조 방법.

【청구항 5】

제3항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 1의염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 노화가 지연된 식물체의 제조 방법.

【청구항 6】

(a) 제2항의 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계,

(b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계, 및

(c) 생산성이 증대된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 7】

제6항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 8】

제6항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 1의염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 9】

(a) 제2항의 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계,

(b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계, 및

(c) 생산성이 증대된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 스트레스 내성 식물체의 제조 방법.

【청구항 10】

제9항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 스트레스 내성 식물체의 제조 방법.

【청구항 11】

제9항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 1의염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 스트레스 내성 식물체의 제조 방법.

【청구항 12】

(a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계, 및

(b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는

식물체의 노화를 지연시키는 방법.

【청구항 13】

(a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계, 및

(b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 생산성을 증대시키는 방법.

【청구항 14】

(a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계, 및

(b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법.

【청구항 15】

제3항기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체.

【청구항 16】

제6항기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체.

【청구항 17】

제9항기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성 증대 특성을 갖는

형질전환 식물체.

【요약서】

【요약】

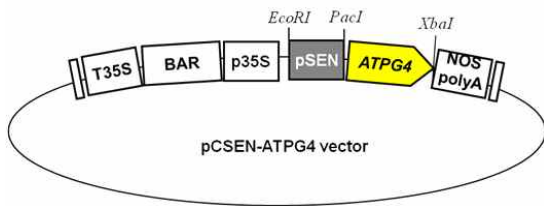
본 발명은 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도를 개시한다. 상기 형질전환되어 과별현된 식물체는 식물체의 노화가 지연되고 생산성이 증대되는 특성을 보일 뿐만 아니라 스트레스 내성 증대 특성을 보인다.

【대표도】

도 1

【도면】

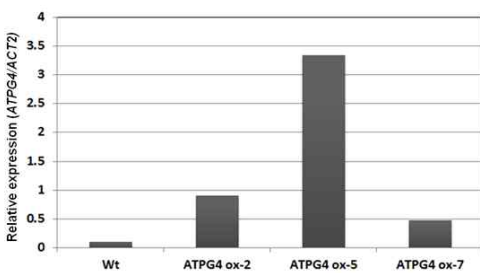
【도 1】



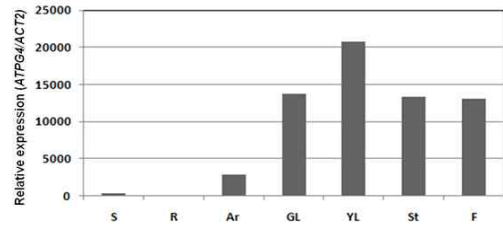
【도 2】



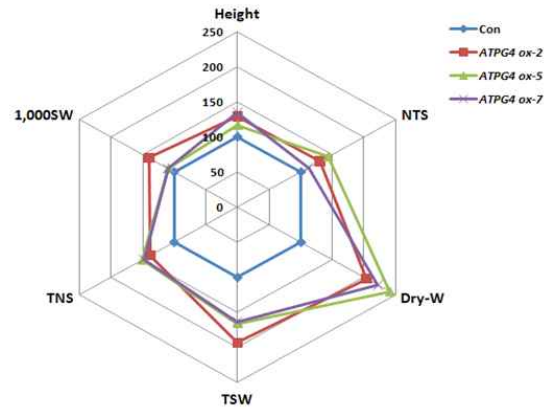
【도 3】



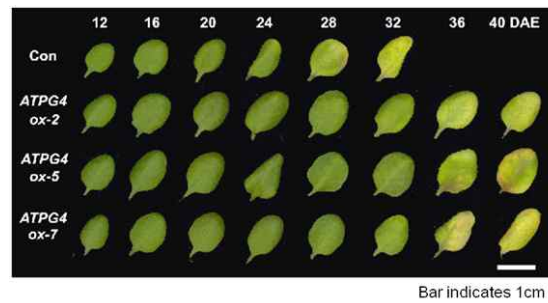
【도 4】



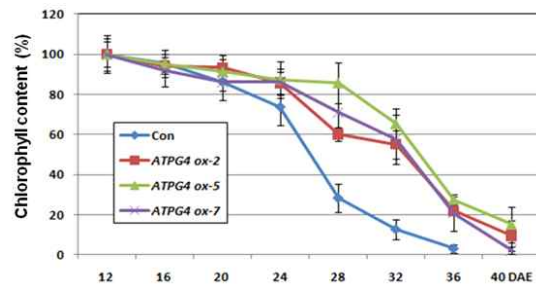
【도 5】



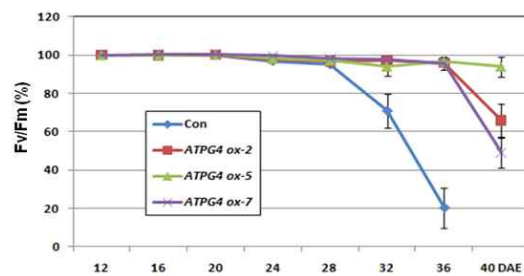
【도 6】



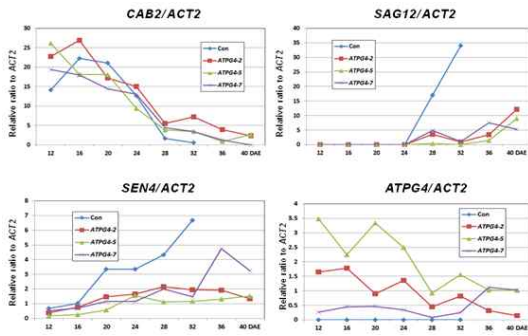
【도 7】



【도 8】



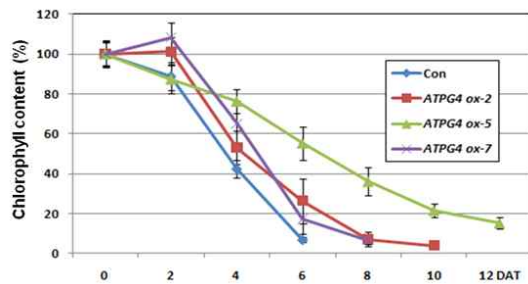
【도 9】



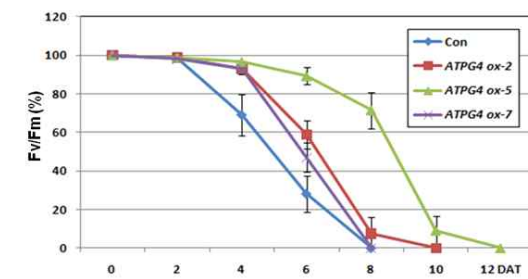
【도 10】



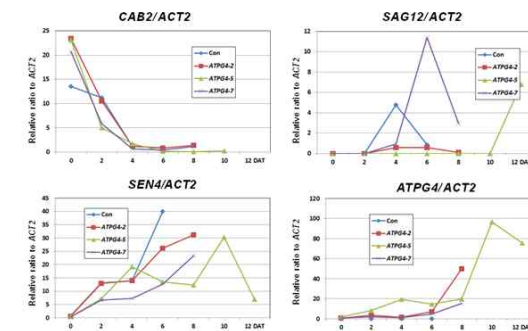
【도 11】



【도 12】



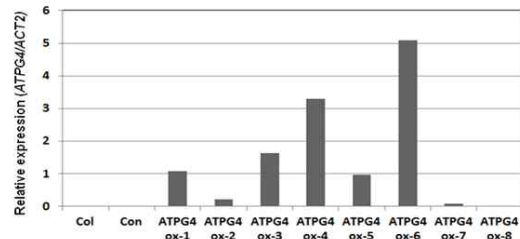
【도 13】



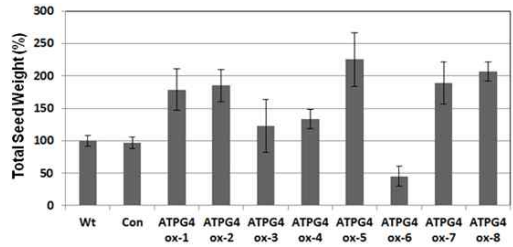
【도 14】



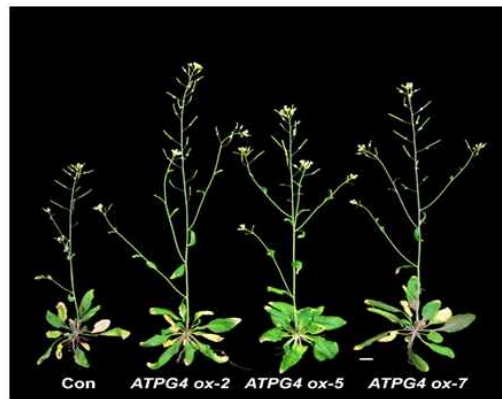
【도 15】



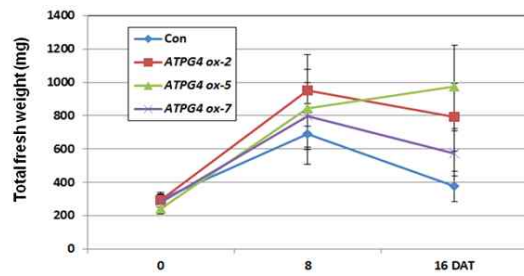
【도 16】



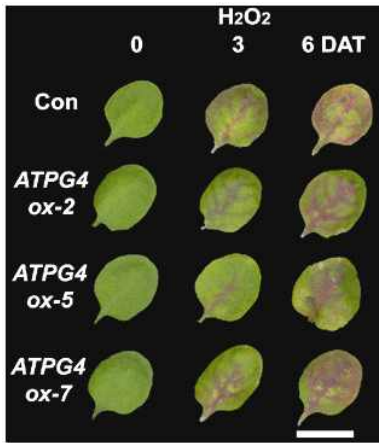
【도 17】



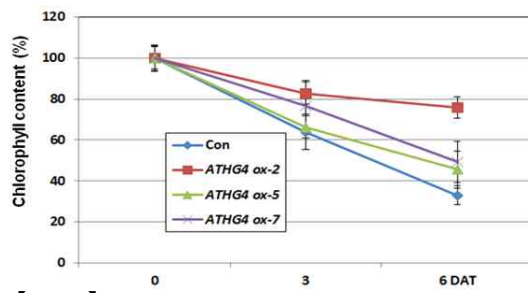
【도 18】



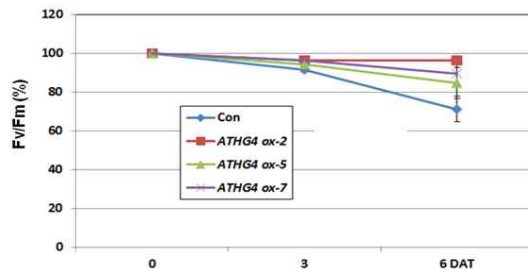
【도 19】



【도 20】



【도 21】



[부록 2] 특허출원 (PCT/KR2012/002967)

【명세서】

【발명의 명칭】

식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도{ATPG8 Protein Providing Yield Increase and Delaying Senescence and Stress Tolerance of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use}

【기술분야】

본 발명은 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

식물의 노화는 식물 발생의 마지막 단계로서, 세포, 조직, 기관 혹은 생물체 수준에서 나이-의존적 붕괴 과정이며, 성장 및 발생 단계를 거쳐 치사 단계를 유도한다. 식물은 노화가 진행됨에 따라 점차적으로 합성능력이 저하되고 세포 내 구조물과 거대분자들이 순차적으로 분해되면서 세포의 항상성을 잃게 되어, 결국 죽음에 이르게 된다(Thomas et al., 1993). 이러한 식물의 노화는 일련의 연속된 생화학적 및 생리학적 현상으로 유전적으로 계획되어 있어 세포, 조직 및 기관의 수준에서 매우 정교하고, 능동적으로 진행된다. 세포 구조에 있어서 노화의 초기 현상은 잎 단백질의 70% 이상을 함유하고 있는 소기관인 엽록체의 분해이다. 대사적인 측면에서 보면, 식물체내 탄소 동화작용이 엽록소와 단백질, 막 지질, 그리고 RNA와 같은 거대분자의 이화작용으로 전환되는 것을 의미한다. 노화를 통하여 증가된 이화 작용 활성은 성장 동안 동화조작인 잎에 축적된 세포성분들이 종자 혹은 다른 저장 기관의 발달을 위해 공급되는 배출성 세포 성분으로 전환되는 것을 유도한다. 따라서 식물의 노화는 세포가 퇴화하는 과정인 동시에 진화 과정 동안 환경에 적응하기 위해 능동적으로 획득한 유전형질이라고 생각되고 있다(Buchanan-Wollaston et al., 2003; Lim and Nam, 2005; Nam, 1997)

이와 같은 식물의 노화는 식물 호르몬 등과 같은 내적 환경요인 및 가뭄, 영양소 제한, 병원균 침투 등과 같은 외적 환경 요인에 의하여 영향을 받는다. 식물 호르몬 중 cytokinin은 생리학적으로 노화 지연 호르몬으로서 이를 이용한 노화조절 기술이 많이 보고되고 있다. Amasino 그룹은 노화 특이적인 *SAG12*

유전자의 promoter에 *IPT* 유전자를 재조합하여 노화 단계 특이적인 cytokinin 합성 조절 방법을 개발하였으며, 상기 방법으로 노화를 지연시킨 담배에서 50%의 생산성 증대를 볼 수 있었다. 같은 방법으로 상추에 도입시켰을 때 수확 후 저장성이 크게 증가되는 것을 알 수 있었다(McCabe et al., 2001). 또한 *SAG12* promoter에 옥수수의 homeobox gene (knotted1)을 발현시킨 담배에서 cytokinin의 level이 증가하였고 잎의 노화도 지연된다는 보고가 있었다. 토마토의 경우 ethylene 조절을 통해 과일의 숙성을 조절한 사례가 보고되고 있으며, 또한 세포벽 분해와 관련된 polygalacturonase 유전자의 발현을 억제시켜 토마토의 운송성과 저장성을 증가시킨 Flav-O-Savor의 경우가 대표적으로 상업화 된 예가 될 수 있다. 사과와 같은 경우, 노화가 지연되도록 육종된 국내 품종의 하나가 ethylene 합성 유전자인 ACC oxidase 유전자의 변이를 동반하고 있음이 보고되었다.

최근 노화 조절 현상을 구명하기 위하여 노화 시기에 발현이 유도되는 유전자의 분리 및 이들의 발현 양상 분석에 관한 많은 연구가 수행되었다. 노화 시 발현이 증가되는 유전자들의 분석은 애기장대, 무, 토마토 등에서 연구가 수행되었으며, 이러한 발현 양상 분석을 통해 노화의 pathway들은 매우 복잡한 network을 이루고 있음이 제시되었고, 최근에는 subtractive hybridization과 microarray 등의 방법을 이용하여 노화 시기에 유도되는 유전자들을 다량으로 분리하고 있고, 이들 중 노화 조절 유전자로 추정되는 transcription factor, 혹은 receptor-like kinase 등과 같은 유전자들을 주 target으로 하여 발현 분석을 실시하고 있다. 노화 과정 동안 발현이 증가되는 96개의 전사인자 중 많은 부분은 NAC, WRKY, C2H2-type zinc finger, Ap2/EREBP, 그리고 MYB 도메인을 가지는 단백질들이었다(Lim et al., 2007). WRKY 전사인자 중 *WRKY53* 유전자의 발현 억제는 식물체에서 노화지연을 유발하는 반면, 발현 증가는 식물체의 조기 노화 현상을 유발하였다. 따라서 *WRKY53* 유전자는 식물체 노화에 대한 positive regulator인 것으로 보인다(Miao et al., 2004). 또한 NAC 전사인자 중 *AtNAP* 유전자도 상기 유전자와 마찬가지로 식물체 노화에 대한 positive regulator인 것으로 보고되고 있다(Guo and Gan, 2006). 한편 Receptor-like kinase중 하나인 콩의 *GmSARK*의 발현은 자연 발생적 노화뿐만 아니라 암 처리에 의한 인위적 노화 과정에서도 up-regulation되며, 본 유전자의

억제는 잎 노화의 지연을 유발한다고 알려지고 있다(Li et al., 2006).

최근 활성산소종(ROS; reactive oxygen species)이 식물체 노화에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려지고 있다. 특히 peroxysome에서 유래된 catalase isoform들은 APX1과 함께 식물체의 노화를 조절한다고 애기장대를 재료로 하여 Zentgraf 그룹에서 제안하고 있다 (Zimmermann et al., 2006).

한편, 농업적인 측면에서 보면 식물의 노화는 식물의 성장 단계에 대한 제한으로 인하여 작물의 생산성을 제한할 수 있으며 또한 채소 작물 등에서 잎의 황화 현상과 영양소 소실 등과 같은 품질 손실율을 유발할 수도 있다. 따라서 식물 노화에 대한 연구는 기본적으로 식물의 생육 과정에 대한 이해도를 증가시킬 뿐만 아니라 식물 노화 조절을 제공하여 작물의 생산성, 저장성 등과 같은 농업적 형질의 향상을 유발할 수 있다. Gan 등(1995)은 담배에서 노화 조절을 통해 생산성을 최고 50%까지 증가 시킬 수 있었으며, 또한 콩(Guiamett et al., 1990)과 같은 곡물류에서도 노화 조절을 통해 생산성이 30% 이상의 증대 효과를 얻을 수 있었다. 그러나 여전히 식물 노화를 조절을 통한 생산성 증대에 대한 연구는 극히 제한적이다.

이러한 이유에서 식물 분야 생명공학 종사자들은 식물에서 수명 연장에 관여하는 유전자나 단백질 등을 찾아내고자 노력하고 있다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명의 목적은 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 생산량 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 스트레스 내성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 기타의 목적은 이하에서 제시될 것이다.

【과제의 해결 수단】

본 발명은 일 측면에 있어, 식물의 노화 지연 기능을

갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질에 관한 것이다.

본 발명자(들)는 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질 (DNA-binding protein-related, GeneBank accession number NP 191646.1)의 염기서열을 기초로 상기 단백질의 유전자를 분리하고 상기 유전자를 애기장대에 형질전환시켜 과발현시켰을 때, 식물의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타나고, 이와 더불어 개체의 생체량 증가 및/또는 종자 생산성 증가라는 생산성 증대 특성도 뚜렷하게 나타남을 확인하였다.

이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이 식물체의 노화를 지연시키고 식물의 생산성을 증대시키는 데 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

본 발명자들은 상기 유전자를 ATPG8(AT-hook protein of Genome 8) 유전자 및 ATPG8 단백질로 명명하였으며, 이들 염기 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 및 2에 개시되어 있다.

본 발명의 ATPG8 단백질은 하기 (a), (b) 및 (c)의 폴리펩티드들 중 하나이다.

(a) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드

(b) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드 및

(c) 상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드.

본 명세서에서, "단백질"이라는 용어는 폴리펩티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용되며, "유전자"라는 용어는 폴리뉴클레오티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용된다.

본 명세서에서, "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교하였을 때 여전히 식물 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분한 정도의 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로서 정의된다. 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분하면 되므로, 상기 폴리펩티드의 길이 그리고 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도는 문제되지 않는다. 즉 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 활성이 낮더라도, 여전히 노화 지연 기능 및

생산성 증대 기능을 가지는 폴리펩티드라면 그 길이가 어떻든 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"에 포함된다. 당업자라면, 즉 본 출원시를 기준으로 공지된 관련 선행기술을 숙지하고 있는 자라면, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 일부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 여전히 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유할 것이라고 기대할 것이다. 그러한 폴리펩티드로서 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실된 폴리펩티드를 들 수 있다. 그것은 일반적으로 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 가진다고 당업계에 공지되어 있기 때문이다. 물론 경우에 따라서는, N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 단백질의 기능 유지에 필수적이어서 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실된 폴리펩티드가 상기 기능을 나타내지 않는 경우가 있을 수 있겠지만, 그럼에도 그러한 비활성의 폴리펩티드를 활성의 폴리펩티드와 구분하고 검출해내는 것은 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속한다. 나아가 N-말단 부분 또는 C-말단 부분뿐만 아니라 그 이외의 다른 부분이 결실되더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 가질 수 있다. 여기서도 당업자라면 그의 통상의 능력의 범위 내에서 이러한 결실된 폴리펩티드가 여전히 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 가지는가를 충분히 확인할 수 있을 것이다. 특히 본 명세서가 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 개시하고 있고 나아가 서열번호 1의 염기서열에 의해 암호화되고 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하는지를 확인한 실시예를 개시하고 있다는 점에서, 서열번호 2의 아미노산 서열에서 일부 서열이 결실된 폴리펩티드가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것인가를 당업자는 그의 통상의 능력 범위 내에서 충분히 확인할 수 있다는 것이 매우 자명해진다. 그러므로 본 발명에 있어서 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 상기 정의와 같이 본 명세서의 개시 내용에 기초하여 당업자가 그의 통상의 능력 범위 내에서 제조 가능한 식물의 노화 지연 기능

및 생산성 증대 기능을 가지는 결실된 형태의 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미로서 이해되어야 한다. 또한 본 명세서에서, "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"란 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하지만, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 기능, 즉 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하는 폴리펩티드를 말한다. 여기서도 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기만 한다면 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도나 아미노산이 치환된 정도는 문제되지 않는다. 바꿔 얘기해서, 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 그 활성이 아무리 낮더라도 또 많은 수의 치환된 아미노산을 포함하고 있다고 하더라도 그러한 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기만 한다면 본 발명에 포함된다. 하나 이상의 아미노산이 치환되더라도 치환되기 전의 아미노산이 치환된 아미노산과 화학적으로 등가라면, 그러한 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 여전히 본래의 폴리펩티드의 기능을 보유할 것이다. 예컨대, 소수성 아미노산인 알라닌이 다른 소수성의 아미노산, 예를 들면 글리신, 또는 보다 더 소수성인 아미노산, 예를 들면 발린, 류신 또는 이소류신으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드는 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 마찬가지로, 음으로 하전된 아미노산 예컨대, 글루탐산이 다른 음으로 하전된 아미노산, 예컨대 아스파르산으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드도 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이며, 또한 양으로 하전된 아미노산, 예컨대 아르기닌이 다른 양으로 하전된 아미노산, 예컨대, 리신으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드 또한 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 또한 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 부분에서 치환된 아미노산(들)을 포함하는 폴리펩티드도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 당업자라면, 그 전술한 바의 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도, 서열번호 2의 아미노산

서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 여전히 보유하는 폴리펩티드를 제조할 수 있다. 또한 당업자라면 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 여전히 위 기능을 가지는가를 확인할 수 있다. 더구나 본 명세서가 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 개시하고 있고 또한 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지님을 확인할 실시예를 개시하고 있기 때문에, 본 발명의 "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 당업자에게 용이하게 실시 가능한 것임이 분명하다. 그러므로 "상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미로서 이해되어야 한다. 이처럼 "상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미이지만, 그럼에도 활성의 정도라는 관점에서 봤을 때, 상기 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 서열 상동성이 높을수록 바람직하다. 상기 폴리펩티드는 서열 상동성의 하한에 있어서 60% 이상의 서열 상동성을 지니는 것이 바람직한 반면, 서열 상동성의 상한에 있어서는 당연히 100%의 서열 상동성을 지니는 것이 바람직하다. 보다 더 구체적으로 위 서열상동성은 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 순서대로 높아질수록 바람직하다. 그리고 본 발명의 "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 "서열번호 2의 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드" 뿐만 아니라 '서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드'를 포함하므로 전술한 바의 모든 설명은 "서열번호 2의 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드"에 대해서 뿐만 아니라 "서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인

부분을 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드"에 대해서도 적용되어진다.

본 발명은 다른 측면에 있어서, 전술한 바의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 대한 것이다. 여기서 "전술한 바의 폴리펩티드"란 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지니면서 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드, 및 위 폴리펩티드들과 실질적으로 유사한 폴리펩티드를 포함할 뿐만 아니라, 전술한 바의 바람직한 양태의 모든 폴리펩티드들을 포함하는 의미이다. 그러므로 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지니면서, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체 또는 그 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드 및 이러한 폴리펩티드들에 실질적으로 유사한 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 나아가 바람직한 양태로서 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지니면서 전술한 바의 서열 상동성의 순서대로 그 서열 상동성을 지니는 모든 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 아미노산 서열이 밝혀졌을 때, 그러한 아미노산 서열에 기초하여 그러한 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 당업자라면 용이하게 제조할 수 있다.

한편 본 명세서에서 상기 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 화학적으로 합성된 폴리뉴클레오티드, 생물체 특히 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 분리된 폴리뉴클레오티드 및 변형된 뉴클레오티드를 함유한 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하며, 단일 가닥 또는 이중 가닥의 RNA 또는 DNA의 중합체를 모두 포함하는 것으로서 정의된다.

본 발명은 또 다른 측면에 있어, 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법은 (a) 식물체에서 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 과발현시키는 단계 및 (b) 노화가 지연된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.

본 명세서에서, "노화 지연"이란 야생형 식물체에

비하여 식물 수명이 연장된 특성을 말하며, 구체적으로는 잎 및/또는 줄기의 황화 현상 및/또는 괴사 현상이 야생형 식물체 비하여 지연되거나 식물체의 엽록소 함량이 야생형 식물체에 비하여 많거나 식물체의 광합성 효율이 야생형 식물체 비하여 높은 특성 말한다.

또한 본 명세서에서, "식물체"란 성숙한 식물, 미성숙 식물(유식물체), 식물 종자, 식물 세포, 식물 조직 등을 포함하는 의미이다. 식물 세포나 식물 조직이 형질전환에 사용될 경우에 형질전환된 식물 세포나 식물 조직은 유럽특허 EP0116718, 유럽특허 EP0270822, 국제특허 WO 84/02913, 문헌[Gould et al. 1991, *Plant Physiol* 95,426-434] 등에 개시된 방법을 사용하여 성숙한 식물체로 발육·성장시킬 수 있다.

또한 본 명세서에서, "식물"이란 노화 지연이 인간에게 유용한 결과를 줄 수 있는 모든 식물을 포함한다. 노화 지연은 생산량 증가 즉 종자 생산성 및/또는 개체의 생체량 증가와 직결되므로, 상기 식물의 의미에는 일차적으로 생산성 증대가 인간에게 유용한 식물인 작물, 예컨대 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수, 십자화과 채소(배추, 청경채, 케일, 콜리플라워, 브로콜리, 열무(young radish), 무, 갓 등), 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나 등이 포함될 것이고, 또한 스위치그라스, 억새, 갈대 등과 같은 바이오에너지 작물과 기타 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립 등이 포함될 것이다.

또한 본 명세서에서 "서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자"란 첫째 서열번호 2의 아미노산을 암호화하면서도 코돈의 축퇴성(codon degeneracy)으로 인하여 서열번호 1의 유전자와 다른 염기서열을 갖는 유전자와, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자의 동족체(homologue)로서 식물의 노화 지연 기능을 지니면서 식물의 종류에 따른 진화적 경로의 상이로 인하여 서열번호 1의 염기서열과 다른 염기서열로 이루어진 모든 유전자를 포함하는 의미이다. 여기서 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 서열 상동성이 높을수록 바람직하고, 가장

바람직하게는 당연히 100%의 서열상동성을 지닐 때이다. 한편, 서열 상동성의 하한에 있어서는 상기 유전자가 서열번호 1의 염기서열과 60% 이상의 서열 상동성을 지니는 경우가 바람직할 것이다. 보다 더 구체적으로는 위 서열 상동성이 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 순서대로 높아질수록 바람직하다.

또한 본 명세서에서, "과발현"이란 야생형 식물체에서 발현되는 수준 이상의 발현을 의미한다. 이러한 "과발현"여부는 상기 서열번호 1의 유전자나 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자(예컨대 cDNA)를 정량하여 직접적으로 결정하거나 그 유전자가 암호화하는 단백질을 정량하여 간접적으로 정량할 수 있다.

본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 있어서, 상기 단계 (a)는 유전공학적인 방법으로 수행될 수 있다.

유전공학적인 방법은 (i) 상기 서열번호 1의 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현백터에 삽입시키는 단계, 및 (ii) 그 발현백터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하여 구성된다.

본 명세서에서, "작동 가능하게"란 어떤 유전자의 전사 및/또는 번역이 영향을 받도록 연결된다는 의미이다. 예컨대 어떠한 프로모터가 그것에 연결된 어떤 유전자의 전사에 영향을 준다면 그 프로모터와 그 유전자는 작동 가능하게 연결된 것이다.

또 본 명세서에서, "조절 서열"이란 그것의 존재가 그것에 연결된 유전자의 전사 및/또는 번역에 영향을 미칠 수 있는 모든 서열을 포함하는 의미이며, 이러한 조절 서열에는 프로모터 서열, 전사종결 서열(polyadenylation signal), 복제 개시점을 포함한다.

또한 본 명세서에서, "프로모터"는 당업계에 알려진 통상의 의미를 따르는데, 구체적으로는 어떤 유전자의 전사 개시점을 기준으로 상류(5'쪽)에 위치하고, DNA-의존 RNA 중합효소에 대한 결합 부위, 전사 개시점, 전사 인자 결합 부위 등을 포함하는, 하나 이상의 유전자의 전사를 제어하는 기능을 갖는 핵산 서열을 의미한다. 이러한 프로모터는 그것이 진행생물

유래일 경우 전사 개시점 상류에 있는 TATA 박스(통상 전사 개시점(+1) -20 내지 -30 위치에 존재), CAAT 박스(통상 전사 개시 부위와 비교하여 대략 -75 위치에 존재), 5'인핸서, 전사 억제 인자 등을 포함한다. 사용 가능한 프로모터는 그것에 연결된 서열번호 1의 유전자를 과발현시킬 수 있는 프로모터라면 구성적 프로모터(모든 식물체 조직에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터), 유도성 프로모터(특정 외부 자극에 반응하여 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터 또는 특정 발달 시기나 특정 조직에서 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터) 모두 사용될 수 있다. 사용 가능한 구성적 프로모터의 대표적인 예로는 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터를 들 수 있고, 그 밖에 유비퀴틴(ubiquitin) 계열의 프로모터(Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18, 675-689; EP0342926; Cornejo et al., 1993, Plant Mol. Biol. 23, 567-581), 벼 액틴프로모터(Zhang et al. 1991, The Plant Cell 3, 1155-1165) 등을 들 수 있다. 사용 가능한 유도성 프로모터의 예로는 구리 이온에 의해 활성화되는 효모 메탈로티오네인 프로모터(Mett 등, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 90:4567, 1993), 치환 벤젠설폰아미드에 의해 활성화되는 In2-1 및 In2-2 프로모터(Hershey 등, Plant Mol. Biol., 17:679, 1991), 글루코코르티코이드에 의해 조절되는 GRE 조절 서열(Schena 등, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 88:10421, 1991), 에탄올 조절성 프로모터(Caddick 등, Nature Biotech., 16:177, 1998), 리블로스 비스-포스페이트 카르복실라제(ssRUBISCO)의 소 서브유니트에서 유래한 광 조절성 프로모터(Coruzzi 등, EMBO J., 3:1671, 1984; Broglie 등, Science, 224:838, 1984), 만노핀 신타제 프로모터(Velten 등, EMBO J., 3:2723, 1984), 노팔린 신타제(NOS) 프로모터, 옥토판 신타제(OCS) 프로모터, 열 충격프로모터(Gurley 등, Mol. Cell. Biol., 6:559, 1986; Severin 등, Plant Mol. Biol., 15:827, 1990) 벼 글루테린(glutelin) 프로모터, 콩 유래렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 등을 들 수 있다.

전사 종결 서열은 poly(A) 첨가 신호(polyadenylation signal)로 작용하는 서열로서 전사의 완결성 및 효율성을 높이기 위한 것이다. 사용될 수 있는 전사 종결 서열의 예로는 노팔린 신타아제(NOS) 유전자의 전사 종결 서열, 벼 α -아밀라아제 *RAmyl A* 유전자의

전사 종결 서열, 아그로박테리움 투메파시엔스의 옥토판인(Octopine) 유전자의 전사 종결 서열, 밀 열 쇼크 단백질 17의 전사종결 서열, 밀 유비퀴틴 유전자의 전사 종결 서열, 벼 글루테린 유전자의 전사 종결 서열, 벼 락테이트 디하이드로게나제 유전자의 전사 종결 서열 등을 들 수 있다.

상기 발현벡터는 선별 마커 유전자를 포함할 수 있다. 여기서 "마커 유전자"란 그러한 마커 유전자를 포함하는 식물체의 선별을 가능하게 하는 형질을 암호화하는 유전자를 의미한다. 마커 유전자는 항생물질 내성 유전자일 수 있고 제초제 내성 유전자일 수도 있다. 적합한 선별 마커유전자의 예로는 아데노신 데아미나제의 유전자, 디히드로폴레이트 리덕타제의 유전자, 하이그로마이신-B- 포스포트랜스퍼라제의 유전자, 티미딘 키나제의 유전자, 크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제의 유전자, 포스핀-노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자 등을 들 수 있다. 본 명세서에서, 상기 "형질전환"이란 왜래 유전자가 도입됨에 의한 숙주 식물체의 유전자형의 변형을 의미하며, 그 형질전환에 사용된 방법과 상관없이 그 왜래 유전자가 숙주 식물체, 더 정확하게는 숙주 식물의 세포 내로 도입되어 세포의 게놈에 통합된 것을 의미한다. 여기서 왜래 유전자에는 동종성 유전자와 이종성 유전자가 포함되는데, "동종성 유전자"란 숙주 유기체 또는 그와 동일한 생물종의 내인성 유전자를 의미하며, "이종성 유전자"란 그것이 형질전환되는 유기체에서는 존재하지 않는 유전자를 말한다. 예컨대 예기장대 유래 유전자는 예기장대 식물에게는 동종성 유전자이지만 토마토 식물에서는 이종성 유전자가 된다.

한편, 외래성 유전자로 식물을 형질전환시키는 방법은 당업계에서 공지된 방법을 사용할 수 있는데, 예컨대 유전자 총을 사용한 직접적인 유전자 전달 방법, 프로탈 딥(floral dip)을 이용한 *in planta* 형질전환 방법, 화분 매개 형질전환 방법, 원형질체의 형질전환 방법, 바이러스 매개 형질전환 방법, 리포솜 매개 형질전환 방법 등을 사용할 수 있다. 또한 특정 식물체에 적합한 형질전환 방법을 선택하여 사용할 수도 있는데, 예컨대 옥수수를 형질전환시키는 방법은 미국특허 US 6,140,553, 문헌(Fromm et al, 1990, Bio/Technology 8, 833-839), 문헌(Gordon-Kamm et al, 1990, The Plant Cell 2, 603-618) 등에 개시된 방법을 사용할 수 있으며, 벼를 형질전환시키기 위한 방법은 문헌(Shimamoto et

al, 1989, Nature 338, 274-276), 문헌(Datta et al 1990, Bio/Technology 8, 736-740), 국제특허 WO 92/09696, 국제특허 WO 94/00977, 국제특허 WO 95/06722 등에 개시된 방법을 사용할 수 있다. 또 토마토나 담배 형질전환에 있어서는 문헌(An G. et al., 1986, Plant Physiol. 81: 301-305), 문헌(Horsch R.B. et al, 1988, In: Plant Molecular Biology Manual A5, Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp 1-9), 문헌(Koornneef M. et al, 1986, In: Nevins DJ. and R.A. Jones, eds. Tomato Biotechnology, New York, NY, USA, Alan R. Liss, Inc. pp 169-178) 등에 개시된 방법을 사용할 수 있다.

일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이, 형질전환된 아그로박테리움으로 유식물체, 식물 종자 등을 감염시키는 방법이다.

이러한 아그로박테리움이 매개된 형질전환 방법은 당업계에서 잘 공지되어 있으며(Chilton 등, 1977, Cell 11:263:271; 유럽특허 EP 0116718; 미국특허 US 4,940,838), 특정 식물체에 적합한 방법도 당업계에서 공지되어 있다. 예컨대 목화에 대해서는 미국특허 US 5,159,135, 콩에 대해서는 미국특허 US 5,824,877, 옥수수에 대해서는 미국특허 US 5,591,616 등을 참조할 수 있다. 아그로박테리움 매개 형질전환 방법은 Ti-플라스미드를 이용하는데, 이 플라스미드에는 T-DNA를 식물 세포의 계층으로 통합시킬 수 있는 좌우 경계(border) 서열이 포함될 것이다.

한편, 상기 (b) 선별 단계는 형질전환된 식물체를 발육성장시켜, 잎의 황화 현상의 진행 정도나 잎의 괴사 현상의 진행 정도 등을 통해 육안으로 선별하거나, 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있으며, 나아가 엽록소 함량, 광합성 효율 등을 정량하는 방법, 상기 방법들을 혼합한 방법 등을 통하여 선별할 수 있다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법은 (a) 식물체에서 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 과발현시키는 단계 및 (b) 생산성 증대 특성을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.

본 명세서에서, "생산성 증대 특성"이란 식물체의 전체,

줄기, 뿌리 및/또는 잎의 생체량(biomass; 크기 및/또는 질량)이 야생형 식물체에 비하여 증가한 특성 및/또는 식물체의 종자의 생산성(식물 1개체 당 종자의 수 및/또는 질량)이 야생형 식물체에 비하여 증가한 특성을 말한다.

상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적인 방법에 대해서는 상기 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

상기 (b) 단계는 식물체의 생체량 및/또는 종자 생산성을 비교하여 선별하거나, 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있으며, 또는 이들의 방법을 혼합하여 선별할 수도 있다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 스트레스 내성 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 스트레스 내성 식물체의 제조 방법은 (a) 식물체에서 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 과발현시키는 단계 및 (b) 스트레스 내성 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.

본 명세서에서, "스트레스"는 가뭄 스트레스 및/또는 산화적 스트레스를 의미한다.

상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적인 방법에 대해서는 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

상기 (b) 단계는 식물체의 스트레스 내성을 비교하여 선별하거나(예컨대 잎의 황화 현상의 진행 정도, 잎의 괴사 현상의 진행 정도, 잎 및/또는 줄기의 생체량, 엽록소 함량, 광합성 효율 등) 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있으며, 또는 이들의 방법을 혼합하여 선별할 수도 있다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 식물체의 노화를 지연시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 식물체의 노화를 지연시키는 방법은 (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키고 (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 식물체의 생산성 증대 방법에 관한 것이다.

본 발명의 식물체의 생산성 증대 방법은 (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키고 (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법은 (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키고 (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.

상기 방법들에서 상기 (a) 및 (b) 단계는 상기 본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법에 의하여 얻어진, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자가 과발현된 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG8 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자로 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 의하여 얻어진, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자가 과발현된 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG8 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG8*이 도입되어 과발현됨으로써 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의

스트레스 내성 식물체의 제조 방법에 의하여 얻어진, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자가 과발현된 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG8 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG8*이 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체이다.

본 명세서에서, 상기 "형질전환 식물체"는 성숙한 식물로 발육·성장할 수 있는 식물 세포, 식물 조직, 또는 식물 종자에 상기 유전자가 도입되어 형질전환된 경우뿐만 아니라 형질전환된 식물과의 교배에 의해 계놈이 변형된 식물체, 식물 종자, 식물 세포를 포함한다.

【발명의 효과】

전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자를 제공할 수 있다. 상기 유전자는 노화 지연 기능을 갖고 생산성 증대 기능을 가지므로, 이 유전자로 식물체를 형질전환시킬 경우, 식물의 노화를 지연시키고, 식물의 생산성 증대 기능을 갖도록 할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG8* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 2는 상기 도 1의 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₁ 식물을 발아 후 60일 동안 생육한 애기장대의 사진이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

AT8-10: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₁ 식물

도 3은 상기 도 1의 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대의 *ATPG8* 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

Wt: 애기장대 야생형

ATPG8 ox-5: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG8 ox-9: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG8 ox-10: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 4는 애기장대 야생형의 다양한 식물 기관에서 *ATPG8* 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

S: seedling, R: root, Ar: arial region, GL: green leaf, YL: yellow leaf, St: stem, F: inflorescence organ

도 5는 상기 도 1의 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 발아 후 50일과 70일 동안 생육한 애기장대의 사진이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

ATPG8 ox-5: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG8 ox-9: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG8 ox-10: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 6은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 7은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 8은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

도 9는 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, *ACT*를 PCR 양성 대조구로 사용하였다. *CAB2*는 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자이고, *SEN4* 및 *SAG12*는 노화 유전자로서, 노화 마커 유전자들이다.

도 10은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*,

그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 11은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 12는 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

도 13은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, *ACT*를 PCR 양성 대조구로 사용하였다. *CAB2*, *SEN4*, 그리고 *SAG12*는 노화 마커 유전자이다.

도 14는 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어난 식물의 표현형적 변화를 도시한 그림이다.

도 15은 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어난 식물의 잎 무게 변화를 도시한 그림이다.

도 16은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 표현형 변화를 도시한 그림이다.

도 17은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 엽록소 함량 변화를 도시한 그림이다.

도 18은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*,

ATPG8 ox-9, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 광합성 효율 변화를 Fv/Fm로 도시한 그림이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하 본 발명의 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 애기장대로부터 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 유전자의 분리

식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG8* 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다.

<실시예 1-1> 애기장대의 재배 및 배양

애기장대는 토양을 담은 화분에서 재배하거나, 2% 수크로스(sucrose, pH 5.7)와 0.8% 아가(agar)가 포함된 MS(Murashige and Skoog salts, Sigma, USA) 배지를 넣은 페트리 디쉬에서 재배하였다. 화분에서 재배할 때는 22℃의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 성장 조절기(growth chamber)내에서 재배하였다.

<실시예 1-2> RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

애기장대 cDNA 라이브러리를 만들기 위해서 여러 분화 단계의 애기장대 전체 기관으로부터 RNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하여 RNA를 추출하였고, 추출된 전체 RNA로부터 Superscript III Reverse Transcriptase (INVITROGEN, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

<실시예 1-3> 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 유전자분리

애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related, GeneBank accession number NP 191646.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 *BglIII*의 서열이 포함된 정방향 프라이머(*BglIII*/AT3G60870 SOE-F, 5'-AGA TCT ATG GAT GAG GTA TCT CGT TCT CA -3')와, 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*XbaI*/AT3G60870 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA GAA AGA CGG TCG TTG CGT TC-3')를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 상기 <실시예 1-2>에서 제조된 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 28.4 kDa의 분자량을 갖는 265개의 아미노산을 암호화하는 798bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG8*(AT-hook protein of Genomine 8)로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 *ATPG8* 단백질의 등전점(isoelectric point)은 8.11로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "*ATPG8*" 혹은 "*ATPG8* 유전자"라 하고, 단백질은 "*ATPG8*" 혹은 "*ATPG8* 단백질"이라고 한다).

<실시예 2> ATPG8 유전자에 대한 센스 구성체 (construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 노화와 생산성 증대에 대한 특성 분석

<실시예 2-1> ATPG8 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

상기 유전자가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *ATPG8* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG8* 전사체의 발현을 변화시켰다.

서열번호 3로 표시되고 제한효소 *BglIII*의 서열이 포함된 정방향 프라이머 및 서열번호 4으로 표시되고 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 *ATPG8* cDNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *BglIII*와 *XbaI*으로 절단하고, 유도성 프로모터(inducible promoter)인 *SEN1* 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 *ATPG8* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 *SEN1* 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

한편, 도 1은 pCSEN 벡터에 *ATPG8* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터를 도시한 그림이다. 도 1에서 BAR는 바스타 제초제에 대한 저항성을 부여하는 *BAR* 유전자(phosphinothricin acetyltransferase gene)를 가리키고, RB는 오른쪽 경계(Right Border), LB는 왼쪽경계(Left Border), P35S는 CaMV 35S 프로모터, 35S-A는 CaMV 35S RNA polyA, PSEN은 *SEN1* 프로모터, Nos-A는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를 가리킨다.

상기 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에

일렉트로포레이션(electroporation)방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28℃에서 O.D.₆₀₀ 값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25℃에서 5,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 최종 O.D.₆₀₀ 값이 2.0이 될 때까지 Infiltration Medium (IM; 1X MS SALTS, 1X B5 vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77, Lehle Seed, USA) 배지에 현탁하였다. 4주된 애기장대를 진공 챔버(vacuum chamber)에 있는 아그로박테리움 현탁액에 침지시키고, 10분 동안 10⁴ Pa의 진공하에 두었다. 침지 후, 애기장대를 24시간 동안 폴리에틸렌 백(polyethylene bag)에 두었다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T₁)를 수확하였다. 대조구로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *ATPG8* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

<실시예 2-2> T₁과 T₂ 형질전환 애기장대의 특성 분석
 상기 <실시예 2-1>에서와 같이 형질전환한 애기장대에서 수확한 종자는 0.1% 바스타(Basta) 제초제(경농, 한국) 용액에서 30분 동안 침지시키고 배양함으로써 선별하였다. 이후 형질전환한 애기장대의 생육 동안 상기 화분에 바스타 제초제를 5회 처리한 후, 각 화분에서의 애기장대 성장 변화를 조사하였다.

pCSEN-*ATPG8* 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대 *AT8-10*은 대조구(*ATPG8* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)와 발아 후 60일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 *AT8-10* 변이체 라인은 노화 지연의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 또한 흥미롭게도 종자 수확량 증가와 개체 크기 증가와 같은 생산성 증대 특징을 가졌다(도 2).

이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 우선, T₂ 형질전환 애기장대를 3일 동안 저온 처리(4℃)한 T₂ 형질전환 종자를 화분에서 재배한 후 바스타 제초제 처리를 통하여 형질전환 애기장대를 선별하였다.

선별된 노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 *ATPG8* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10* 변이체의 잎으로부터 RNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하여

전체 RNA를 각각 추출하였다. 각각 1μg의 RNA를 주형으로 하고, Superscript III Reverse Transcriptase (INVITROGEN, USA)을 이용하여 65℃에서 5분 50℃에서 60분 및 70℃에서 15분의 조건으로 cDNA를 합성하였다. 이후, 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 하기 *ATPG8* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94℃에서 2분간 가열하여 주형 DNA를 변성시킨 후, 94℃에서 1분 55℃에서 1분 30초 및 72℃에서 1분을 한 사이클로 하여 총 30회 반복수행한 다음, 72℃에서 15분간 최종 반응시켜 수행하였다. 이후, 1% 아가로스 겔 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였으며, 그 결과는 도 3에 도시되었다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10* 변이체의 *ATPG8* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG8* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

【표 1】

ATPG8 유전자와 *ACT* 유전자 발현을 위한 프라이머 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	<i>ATPG8</i>	ATGCAAGATGCGACATCGTTT (서열번호 5)/ ATAAGCTTCACCTGGCAACGAA (서열번호 6)
2	<i>ACT</i>	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAACCAGCCTTC (서열번호 8)

한편 애기장대 야생형의 *ATPG8* 유전자의 식물체 기관별 발현 양상을 분석하기 위하여 애기장대 야생형의 다양한 발달 단계에서 기관별 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 이를 주형으로 하여 *ATPG8* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과는 도 4에서 도시된 바와 같이, *ATPG8* 유전자의 발현은 주로 줄기에서 이루어지는 것을 확인할 수 있었으나, 다른 *ATPGs* 유전자와는 다르게 잎에서의 발현은 현저히 낮음을 알 수 있었다. 또한 발달 초기의 유식물(seedling)과 뿌리, 그리고 꽃에서는 유전자의 발현이 현저히 낮음을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자는 식물의 줄기에서 주로 기능을 가져 식물의 노화 조절에 관여할 것으로 판단되는 반면, 뿌리와 발달 초기의 유식물 등 식물의 발달 초기에는 기능을 거의 가지지 않은 것으로 판단된다.

선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(도 5). pCSEN-ATPG8 구성체를 가지고 있는 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 노화 지연 표현형뿐만 아니라 노화 지연 동안 개체 크기와 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 노화 지연 현상과 생산성 증대는 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 도 3에서 나타나듯이 유전자의 과발현이 라인마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 흥미로운 사실은 노화 지연 형질이 강력한 *ATPG8 ox-9*는 생산성 증대에 있어서 큰 표현형적 차이를 못 가지는 반면, 노화 지연 형질이 강하지 않는 *ATPG8 ox-5*와 *ATPG8 ox-10*는 생산성 증대에 있어서 대조구에 비하여 종자 수확량 증가 및 개체 크기 증가와 같은 큰 표현형적 특징을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 생산성 증대와 노화 지연에 대한 표현형적 특징을 가진 식물을 임의로 제작할 수 있을 것으로 판단된다.

<실시예 3> ATPG8 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석

ATPG8 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T₂ 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

<실시예 3-1> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 잎의 표현형적 변화

자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 24일 이후 잎의 황화 현상이 진행되어 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 잎의 황화 현상이 36일부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(도 6). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG8* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다.

<실시예 3-2> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 엽록소 함량 변화

엽록소의 함량 측정을 위해 각 시료 잎을 80% (V/V) acetone을 사용하여 엽록소를 추출하였다. 엽록소 함량은 663.2 nm와 664.8 nm의 흡광 계수를 이용하여 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(Biochemical Society Transduction 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였다. 그 결과, 도 7에 도시된 바와 같이, 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 자엽 생성 후 32일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다.

<실시예 3-3> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 광합성 효율 변화

오 등의 방법(Plant Mol. Biol. 30:939, 1996)을 이용하여 광합성 효율을 측정하였다. 우선 각 DAE(day after emersion)의 잎을 15분간 암 처리한 후, 식물 효율 분석기(Plant Efficiency Analyzer)(Hansatech)를 이용하여 엽록소의 형광을 측정하였다. 광합성 효율은 엽록소의 형광도 특성을 이용한 PS II(photosystem II)의 광화학적 효율(photochemical efficiency)로 나타내었는데, 형광도 최대치(maximum value of fluorescence; F_m)에 대한 최대 변형 형광도(maximum variable fluorescence; F_v)의 비율(F_v/F_m)로 나타내었다. 상기 수치가 높을수록 광합성 효율이 우수함을 나타낸다.

그 결과, 도 8에 도시된 바와 같이, 야생종은 자엽 생성 후 28일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 자엽 생성 후 36일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않다가 40일째 라인에 따라 정도의 차이는 있지만 약 20% 범위 정도만 활성 소실이 일어났다. 상기 결과로부터, *ATPG8* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG8* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

<실시예 3-4> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 노화 관련 유전자의 발현 변화

야생종과 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10* 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG8* 유전자와 각

노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다.

Total RNA의 분리는 WelPrep™ Total RNA Isolation Reagent (JBI)를 이용하였으며, DNase I (Ambion)을 처리한 후, 정량을 통해 0.75ug을 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)을 이용해 first cDNA를 합성하였다.

ATPG8 유전자 및 노화에 대한 마커(marker) 유전자들에 대한 정량적인 분석은 Applied Bio-systems의 7300 Real Time PCR System을 이용한 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 과정을 통해 확인하였다. 노화 마커 유전자로는 *SAG12*, *SEN4* 및 *CAB2* 유전자를 사용하였으며, qRT-PCR 양성 대조구로는 *ACT* 유전자를 사용하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 2에서 제시하였다.

【표 2】

노화관련 유전자의 발현을 위한 프라이머 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	<i>CAB2</i>	CCGAGGACTTGCTTTACCCC (서열번호 9)/ AACTCAGCGAAGGCCTCTGG (서열번호 10)
2	<i>SEN4</i>	CGTCGATGACACCCATTAGAG(서열번호 11)/ CATCGGCTTGTCTTTGGAAC(서열번호 12)
3	<i>SAG12</i>	ACGATTTTGGCTGCGAAGG (서열번호 13)/ TCAGTTGTCAAGCCGCCAG (서열번호 14)
4	<i>ACT</i>	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAAACCAGCCTTC (서열번호 8)
5	<i>ATPG8</i>	ATGCAAGATGCGACATCGTTT (서열번호 5)/ ATAAGCTTCACTGGCAACGAA (서열번호 6)

야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였다. 그러나 *ATPG8* 과발현 변이체들에서는 정도의 차이는 있으나, 이들 유전자의 발현 감소 양상이 지연됨을 알 수 있었다. 한편, *SAG12* 및 *SEN4*와 같은 노화 관련 유전자들은 노화단계에서 그 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. *SEN4*와 *SAG12* 경우 야생종에서 자엽 생성 후 28일 이후 급격히 증가하여 32일째 최대의 발현치를 가지는데 비해, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10* 변이체 모두는 *SEN4*와 *SAG12*의 발현이 자엽 생성 후 36일째까지 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 한편 *ATPG8* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 전체적으로 *ATPG8* 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 발현 수준이 현저히 높으며 노화 동안 라인별로 정도의 차이는 있지만 24일에서 28일 사이에 작은

피크를 가졌다가 점진적으로 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(도 9). 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG8* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

<실시예 3-5> *ATPG8* 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG8* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 받아 후 21일째 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액(2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 상기 <실시예3-1 내지 3-4>와 동일한 방법으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 잎의 황화 현상이 12일 이후부터 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(도 10). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암 처리 4일 이후 급격한 감소를 가져 6일 이후 암 처리하지 않은 상태의 약 10% 이하의 수치를 나타냈으나, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우, 대부분 6일째에도 60% 이상의 엽록소 함량을 나타냈다(도 11). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 *ATPG8* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(도 12).

또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 상기 <실시예 3-4>와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 도 13에 도시된 바와 같이, 야생형이 암 처리 후 4일째 *SAG12*의 발현이 현저히 증가하고 6일째 최고치를 나타내는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리동안 거의 발현되지 않았다. *SEN4*의 발현에 있어서, 야생형의 경우 암 처리 초기 동안 발현이 현저히 증가하여 6일째 최고치를 나타내는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 동안 야생형에 비하여 현저히 낮은 발현양을

나타내었다. 한편 *ATPG8* 유전자의 경우, 야생형에서는 거의 발현이 없는데 비해, 과발현 변이체에서는 압처리 시 증가 현상을 보여 6일째 최고치를 가지고 이후 감소함을 알 수 있었다. 그러나 전체적인 발현량은 야생형에 비하여 현저히 높은 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어 보아 *ATPG8* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

<실시예 5> *ATPG8* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석

<실시예 5-1> *ATPG8* 과발현 변이체의 가뭄 스트레스에 대한 특성 분석

ATPG8 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 도 14와 15에 도시되었다. 야생형 애기장대는 가뭄에 의해 잎의 황화 현상이 급속히 진행됨을 알 수 있었으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 16일 동안의 가뭄 처리에 의하여 초기의 20% 정도까지 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그에 비하여 *ATPG8* 유전자의 과발현 변이체인 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*은 16일 동안의 가뭄 처리에도 잎의 노화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 거의 2배 이상인 40에서 60%의 무게를 유지함을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG8*이 가뭄스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

<실시예 5-2> *ATPG8* 과발현 변이체의 H₂O₂ 스트레스에 대한 특성 분석

ATPG8 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H₂O₂을 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 3일 간격으로 6일 동안 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG8* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소에 있어서도 지연됨을 확인할 수 있었다. 특히

광합성 효율의 경우 야생형은 6일 동안의 H₂O₂ 스트레스 처리에 의해 50% 정도까지 감소하였으나, *ATPG8* 과발현 변이체에서는 거의 100%를 유지하고 있어 광합성 효율의 감소가 거의 일어나지 않고 있음을 알 수 있었다(도 16, 17과 18). 이러한 사실은 *ATPG8*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

따라서 *ATPG8* 유전자는 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성을 제공하여 스트레스 저항성 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 2에 개시된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 갖고, 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 *ATPG8* 단백질.

【청구항 2】

제1항의 단백질을 암호화하는 *ATPG8* 유전자.

【청구항 3】

(a) 제2항의 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계,

(b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계, 및

(c) 노화가 지연된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 노화가 지연된 식물체의 제조 방법.

【청구항 4】

제3항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 노화가 지연된 식물체의 제조 방법.

【청구항 5】

(a) 제2항의 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계,

(b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계, 및

(c) 생산성이 증대된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 6】

제5항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는

유전자인 것을 특징으로 하는 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 7】

- (a) 제2항의 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계,
- (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계, 및
- (c) 생산성이 증대된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 스트레스 내성 식물체의 제조 방법.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 스트레스 내성 식물체의 제조 방법.

【청구항 9】

- (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계, 및
- (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 노화를 지연시키는 방법.

【청구항 10】

- (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계, 및
- (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 생산성을 증가시키는 방법.

【청구항 11】

- (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계, 및
- (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법.

【청구항 12】

제3항 기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체.

【청구항 13】

제5항 기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체.

【청구항 14】

제7항 기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성 특성을 갖는 형질전환 식물체.

【요약서】

【요약】

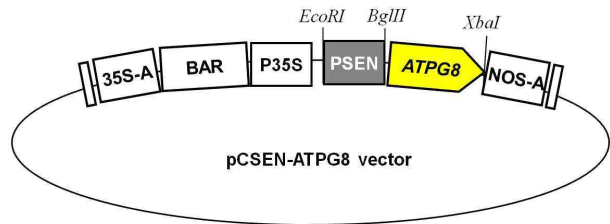
본 발명은 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도를 개시한다. 상기 형질전환되어 과발현된 식물체는 생산성이 증대되는 특성을 보일 뿐만 아니라 노화 지연 특성과 스트레스 내성 특성도 보인다.

【대표도】

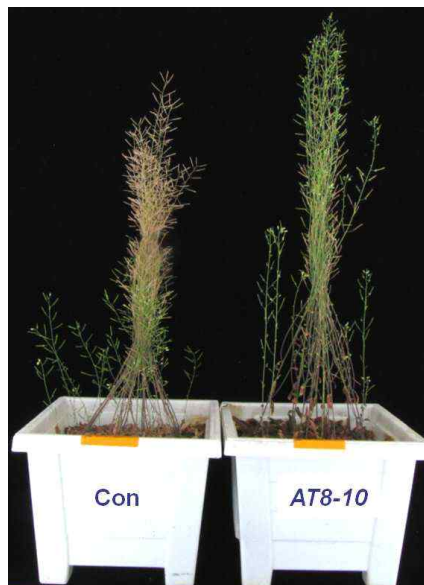
도 1

【도면】

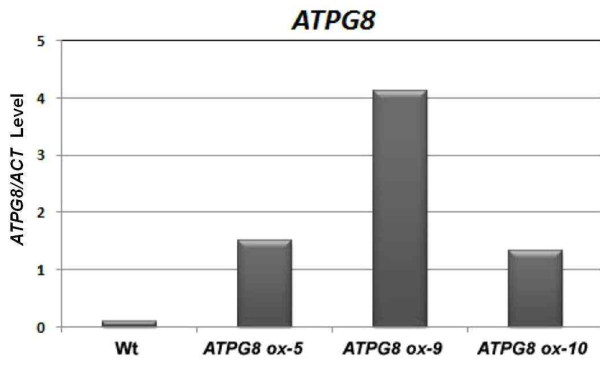
【도 1】



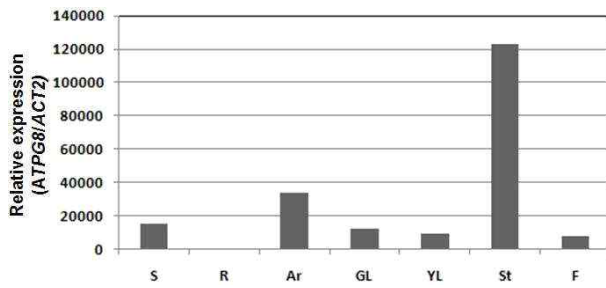
【도 2】



【도 3】



【도 4】



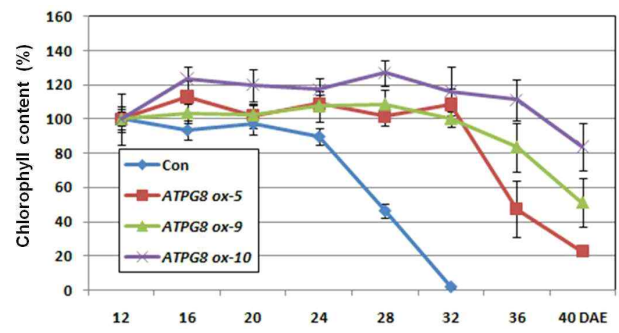
【도 5】



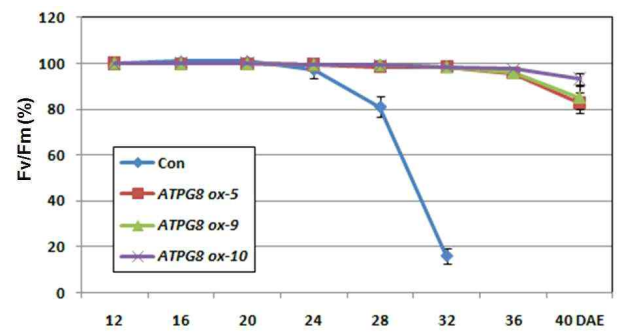
【도 6】



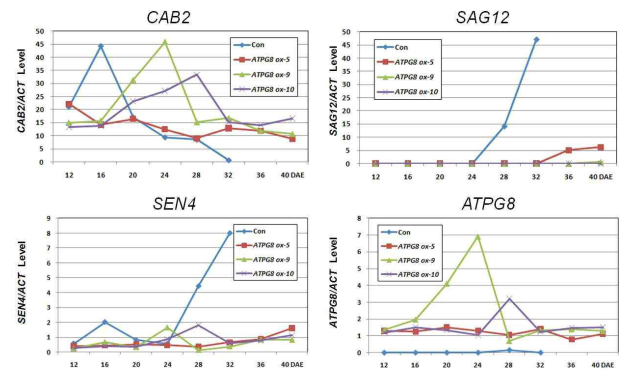
【도 7】



【도 8】



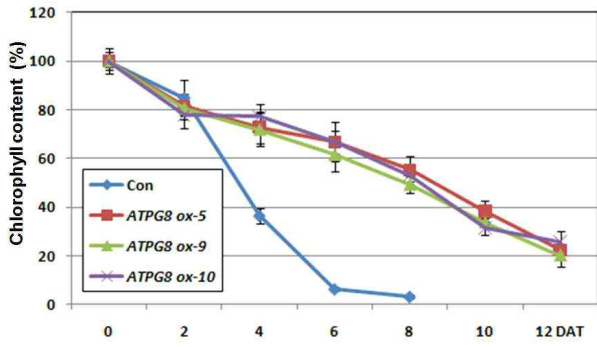
【도 9】



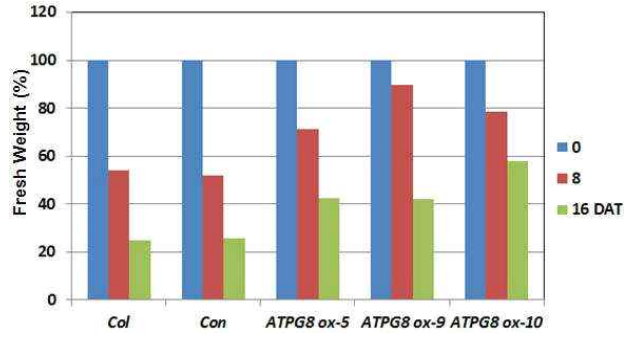
【도 10】



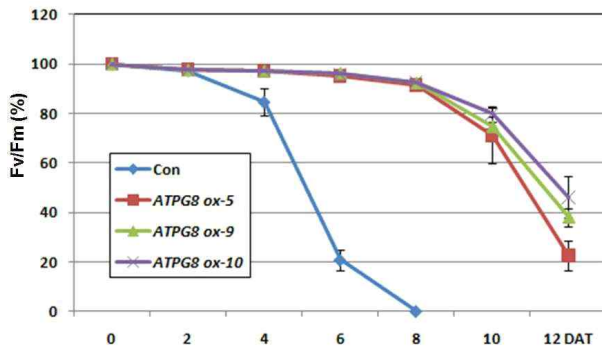
【도 11】



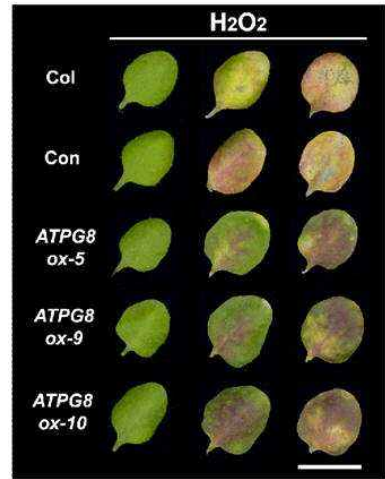
【도 15】



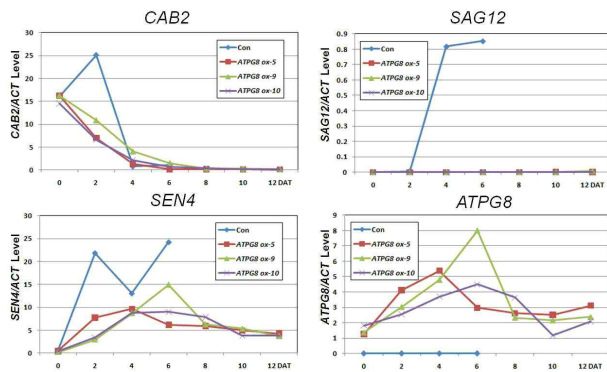
【도 12】



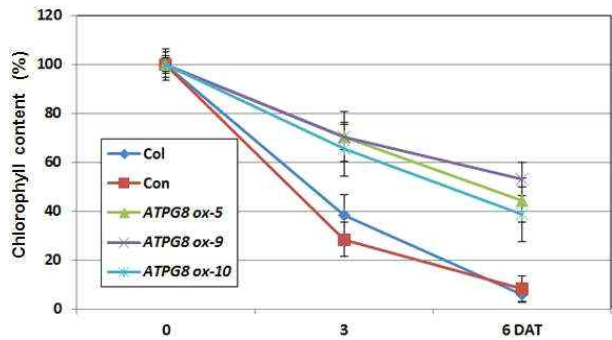
【도 16】



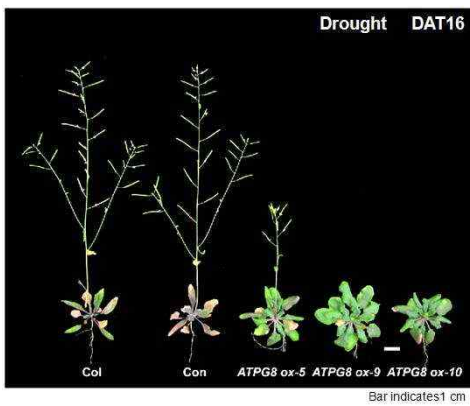
【도 13】



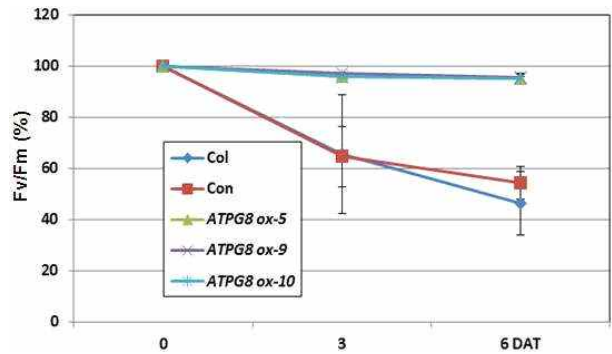
【도 17】



【도 14】



【도 18】





Contents lists available at ScienceDirect

Plant Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plantsci

Overexpression of *FTL1/DDF1*, an AP2 transcription factor, enhances tolerance to cold, drought, and heat stresses in *Arabidopsis thaliana*

Hong-Gyu Kang^a, Joonki Kim^a, Bohwa Kim^b, Hana Jeong^b, Sun Hee Choi^a, Eun Kyoung Kim^a,
Hyo-Yeon Lee^{a,b}, Pyung Ok Lim^{a,c,*}

^a Subtropical Horticulture Research Institute, Cheju National University, Jeju, 690-756, Republic of Korea

^b Department of Biotechnology, Jeju National University, Jeju, 690-756, Republic of Korea

^c Department of Science Education, Jeju National University, Jeju, 690-756, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2010

Accepted 6 January 2011

Available online 15 January 2011

Keywords:

Abiotic or environmental stress

Activation tagging

Arabidopsis thaliana

FTL1/DDF1

ABSTRACT

Freezing temperatures control where and when plants can grow, and negatively influence crop quality and productivity. To identify key regulatory genes involved in cold adaptation, we screened activation-tagged *Arabidopsis* lines for mutants with greater freezing tolerance. One mutant, *freezing tolerant line1* (*ftl1-1D*), manifested enhanced tolerance along with dwarfism and delayed flowering. This was caused by activation of *DWARF AND DELAYED FLOWERING 1* (*DDF1*), a gene previously described as a regulatory component in salinity signaling. The induced gene encoded an AP2 transcription factor of the CBF/DREB1 subfamily. In addition to conferring tolerance to low temperatures and salt stress, *ftl1-1D/ddf1* improved tolerance to drought and heat. Real-time PCR indicated that *FTL1/DDF1* was up-regulated by those four types of stresses in wild-type *Arabidopsis*. Its increased expression in the mutant induced various stress-responsive genes under normal growing conditions, resulting in improved tolerances. However, phenotypes shown in the *ftl1-1D/ddf1* were restored by treatment with exogenous gibberellin (GA_3), indicating the involvement of a GA pathway in *FTL1/DDF1*-mediated tolerance. Therefore, we conclude that *FTL1/DDF1* plays a role in regulating responses to several abiotic stresses, perhaps via cross-talk in the pathways.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During a typical life cycle, sessile plants undergo environmental stresses, such as low or high temperatures, increased salinity, or long-term water deficiencies. To survive adverse conditions, plants employ strategies that trigger a cascade of events that alter gene expression and lead to biochemical and physiological changes [1].

The molecular responses to cold, heat, drought, and salt have been evaluated by monitoring genes with enhanced expression in plants under environmental stress [2]. Large-scale transcriptome profiling has been especially valuable in allowing for the identification of several signaling pathways that lead from stimulus to end response. Those studies have revealed a genetic regulatory network that underlies plant adaptations to adverse conditions [3,4]. Although some signaling pathways are active in stress-specific responses, others show extensive cross-talk at var-

ious steps, and may overlap among pathways [5]. These global expression analyses have also uncovered hundreds of genes encoding transcription factors that are differentially expressed under environmental stresses, thus implying that various transcriptional regulatory mechanisms are involved [6]. Those stress-inducible factors include members of families for the C-repeat (CRT) binding factor/dehydration-responsive element binding protein (CBF/DREB1), the ethylene-responsive element binding factor (ERF), zinc fingers, WRKY, MYB, the basic helix–loop–helix (bHLH), basic-domain leucine zipper (bZIP), NAC, and the homeodomain transcription factor [6].

Overexpression of some of these transcription factor genes improves stress tolerance in *Arabidopsis* and rice, thereby demonstrating that transcriptional regulation is an important protective mechanism [2]. Nonetheless, the possible *in vivo* functions of many associated transcription factors are unclear, and the underlying molecular mechanisms of adaptive responses are largely unknown. Abiotic or environmental stresses adversely affect plant growth and seed production, and limit crop yield and quality [7,8]. Thus, increased understanding of those controlling mechanisms has great potential for agricultural improvements. In general, genetic screening of mutants with altered phenotypes is a powerful

* Corresponding author at: Department of Science Education, Jeju National University, Jeju, 690-756, Republic of Korea. Tel.: +82 64 754 3288; fax: +82 64 725 4902.

E-mail address: polim@jejunu.ac.kr (P.O. Lim).

approach toward identifying the key components of biological processes. In *Arabidopsis*, utilization of the large collection of T-DNA tagged lines might be a straightforward way to conduct functional analysis of potential regulatory genes, e.g., transcription factors, that are induced under adverse conditions. However, many of those 'loss-of-function mutant lines' do not reveal the related phenotype due to genetic or functional redundancy caused by the various pathways that lead to stress responses. Therefore, we conducted a gain of function genetic screen for improved stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* from T-DNA activation tagging pool.

In this paper, we describe one mutant, *freezing tolerant line 1* (*ftl1-1D*), which was initially isolated as a mutant displaying tolerance to cold stress. *FTL1* encodes an AP transcription factor in the CBF/DREB1 subfamily [2] and is identical to *DWARF AND DELAYED FLOWERING 1* (*DDF1*), a gene that has been previously identified as a regulator of gibberellic acid (GA) biosynthesis and plant responses to salinity stress [9,10]. Through the analysis of the *ftl1-1D/ddf1* mutant, we found that the *FTL1/DDF1* plays an important role in regulating responses to cold, drought, and heat stresses as well, through controlling the expression of various stress responsive genes, which in turn promote tolerance to these stresses.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials and growing conditions

The 'Columbia' ecotype (Col) as well as plants from an activation tagging mutant of *A. thaliana* were grown in an environmentally controlled room at 23 °C, under a 16-h photoperiod.

2.2. Screening of freezing-tolerant mutants

Arabidopsis plants were transformed by the floral dipping method [11] using *Agrobacterium tumefaciens* ABI, which carries the activation tagging plasmid pSKI015 with the *bar* gene as a plant selectable marker [12]. To screen for freezing tolerance, herbicide-selected T₁ plants were placed, without prior cold acclimation, in the dark in a –5 °C cold chamber. After 1 h, ice chips were added to each pot to nucleate freezing. Plants were removed after 24 h and returned to a growth chamber at 23 °C. Potential mutants were self-fertilized and progeny were further analyzed for co-segregation of the cold-tolerant phenotype with the T-DNA insertion.

2.3. Plasmid rescue

To clone the flanking region of T-DNA within *ftl1-1D/ddf1*, 1 µg of the genomic DNA isolated from 12-day-old *ftl1-1D/ddf1* plants was digested with *EcoRI*. The DNA was purified through phenol and chloroform extraction, concentrated by ethanol precipitation, and incubated overnight with T4-DNA ligase at 16 °C. Afterward, it was precipitated with ethanol and dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0), and one-tenth of it was transformed into *Escherichia coli* TOP10 competent cells (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). The transformed bacteria were selected on Luria broth (LB) plates containing ampicillin. We utilized the plasmid-rescue method of Weigel et al. [12] to search for the insertion location of the T-DNA carrying the tetramerized CaMV 35S enhancer element.

2.4. Real-time and semi-quantitative RT-PCR

Total RNAs were isolated from whole seedlings with Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNAs were synthesized from 1 µg of total RNA using a reverse-transcription system (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR was conducted with an

Table 1
PCR primers used in this study.

Target gene	Primer name	Sequence 5'–3'	Size (bp)
<i>DDF1</i>	JK107	ATGAATAATGATGATATTATTCTGGC	26
	JK108	TTAATATCTGTAACCTCCACAATGAC	25
<i>DDF1</i>	JK109	GATGATGTGGATTTGGGTTTGGT	24
	JK110	CATCATCGCTTGAGACTTCTTCG	25
<i>At1g12600</i>	HG100	TACTTGACCCGATGATTCTTACT	23
	HG101	TAAAGATGAGTAACAATCCCGTA	23
<i>At1g12620</i>	HG102	TGGTGTTCATCATATTACCGT	23
	HG103	TTACCTATACATATTGTGACAGA	23
<i>KIN1</i>	JK131	GAGACCAACAAGATGCCTTCCAAG	25
	JK132	CCGCATCCGATACACTCTTTCCC	23
<i>RAB18</i>	JK133	GAGGGAGGAGGAAGAAGGGAATAAC	25
	JK134	ACCGTAGCCACCAGCATCATATC	23
<i>HSEB1</i>	JK247	TTAGTCCGGCGAAGTATGTCGT	24
	JK248	CGCTCTCCGAAATATCGTTTG	24
<i>ELF1α</i>	JK223	TTGCTCCACAGGATTGACCACTG	24
	JK224	TCACTTCGCACTCTTTGACG	22
<i>COR15A</i>	JK119	CACAGCGGAGCCAAGCAGAG	20
	JK120	GTTGAGAAACGACGCAACTGAG	24
<i>COR15B</i>	JK121	GATGACCTCAACGAAGCCACAAG	24
	JK122	TTTCTCGCATCCGCCAAGG	20
<i>RD29A</i>	JK117	GTGCGACGGAGGAGGTGAAG	20
	JK118	GGAACAACAGTGGAGCCAAGTG	22
<i>HSF3</i>	JK271	AAGGTGCTCTTGCCCAAGTATTCA	25
	JK272	CTGCACATCGCAAGGTTTCTCC	23
<i>GAI</i>	JK171	CAAGACAAGTCATGTCGGAGGTT	24
	JK172	TCAACGTTTCATGACGCTCAACTC	24
<i>RGA</i>	JK173	AGATCATACCAATTCCAAGGTCCG	24
	JK174	GAAGCTCGCTCCATGTTACCTC	24
<i>RGL1</i>	JK175	TTTTACGGCGAATCAAGCGATACT	24
	JK176	GGTGGACCATTAGGACGTAAGCA	24
<i>RGL2</i>	JK177	CGGAGAATTCAGATTCCGTTCAAC	24
	JK178	CAAGATCCGATAAACTCTCAGCGG	24
<i>RGL3</i>	JK179	CGATCTGAGACCAATCACAGACGA	24
	JK180	ATAAGCACCACGGAACGAGTTGAC	24

Opticon-mini system (Bio-Rad) and SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Semi-quantitative RT-PCR was basically performed with the methods presented by Jung et al. [13]. The optimum cycle number for semi-quantitative RT-PCR conditions was established for each primer set and serial dilutions were used to enable linear amplification. The primers used here were listed in Table 1.

2.5. Assays for freezing, drought, and heat tolerances

For the whole-plant freezing assay, 4-week-old plants were grown in soil, with or without cold acclimation, for 4 d at 4 °C under cool white light. They were then frozen for 24 h at 0 to –12 °C. Survival was scored after 4 d of recovery under 23 °C growing conditions. To evaluate the effect of drought stress, plants were grown for 4 weeks with regular watering, after which irrigation was withheld for 14 d. To measure for water loss, the aerial parts of plants grown in soil for 4 weeks were cut and weighed. These tissues were placed on filter paper in a growth room, abaxial surface uppermost, for dehydration, and were weighed at regular intervals. Water loss was estimated as the percentage of additional weight lost relative to the initial fresh weight [14]. For thermotolerance assays, 12-day-old seedlings grown in plates were placed for 60 min in the dark in a chamber adjusted to 60 °C, then returned to normal growing conditions. After 4 d of recovery, their survival rates were scored. For

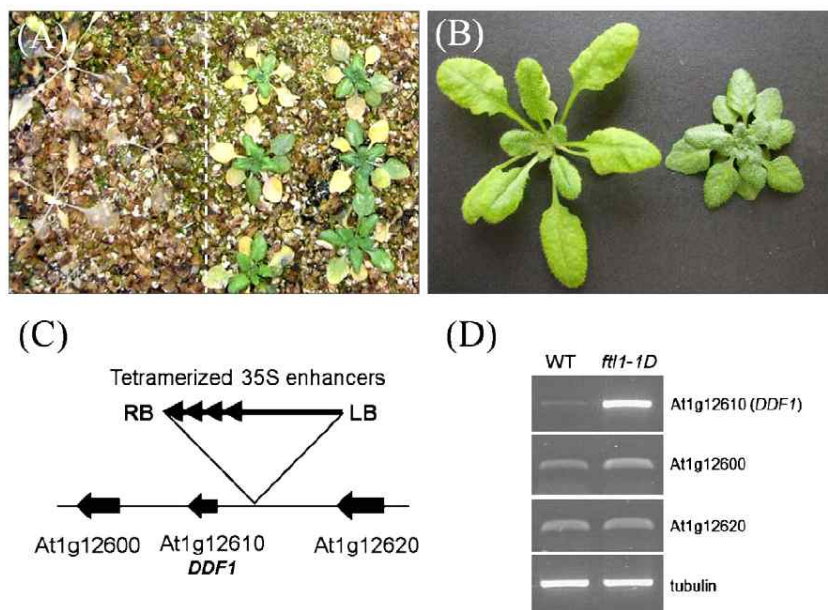


Fig. 1. Phenotype and molecular analysis of *ftl1-1D* mutant. (A) Effects of cold stress. WT (left) and *ftl1-1D* (right) were grown in soil for 4 weeks and incubated for 24 h in -5°C chamber. Photograph was taken on Day 4 after return to normal growing conditions. (B) Four-week-old WT (left) and *ftl1-1D* (right) under standard growth. (C) Putative genes around T-DNA insertion site in genome of *ftl1-1D*. T-DNA was inserted between *DDF1* and *At1g12620*. (D) Expression analysis of *DDF1*, *At1g12600*, and *At1g12620*, three genes located within about 10 kb from the 35S enhancer in *ftl1-1D* by RT-PCR.

quantifying electrolyte leakage, 10-day-old plants grown on 1/2 MS plates were incubated at 45°C . Afterward, 6 ml of distilled water was added to each tube and the samples were gently shaken for 1 h [15]. Conductivity of the resulting solution was measured with a CM-21P EC Meter (Analyticon, Springfield, NJ, USA). The value for 100% leakage was obtained by freezing each sample at -80°C for 1 h and re-extracting with the original solution.

2.6. Stress induction for gene expression analysis

Arabidopsis plants were grown on 1/2 MS media at 23°C for 2 weeks and were used in stress treatments. For cold treatment, plants grown on 1/2 MS media were incubated at 4°C under continuous light for 0, 2, 4, 8, or 24 h. For drought treatment, plants were harvested from 1/2 MS agar plates and then were dehydrated on Whatman 3MM paper at 23°C and 60% humidity under dim light. For heat treatment, 12-day-old plants grown on 1/2 MS media were incubated at 45°C and 90% relative humidity to minimize susceptibility to drought. Salt stress was induced by exposing plants to 250 mM NaCl, as reported by Magome et al. [9].

3. Results

3.1. Isolation of *ftl1-1D*, an enhanced freezing-tolerance line, from an *Arabidopsis* activation tagging pool

To identify key regulatory genes involved in freezing tolerance, we screened an *Arabidopsis* activation tagging pool that was generated with the pSKI015 vector [12]. From about 8000 T₁ plants, we selected a line exhibiting obvious tolerance against chilling stress (-5°C) in the absence of cold acclimation. This was designated as *freezing tolerance 1-1D* (*ftl1-1D*) (Fig. 1A). Segregation in the T₂ generation implied that this tolerant phenotype is due to a dominant mutation caused by gene activation, resulting in a 3.1:1 (246:79) ratio of the *ftl1-1D* phenotype to the wild type. Resistance to basta herbicide was also entirely consistent with this finding. In addition

to freezing tolerance, the *ftl1-1D* mutant exhibited phenotypes such as dark-green leaves, dwarfism, and late flowering (Fig. 1B).

3.2. The *ftl1-D* is caused by overexpression of *DWARF* and *DELAYED FLOWERING 1* (*DDF1*)

The insertion location of the T-DNA carrying the tetramerized CaMV 35S enhancer element was sought to investigate a gain-of-function gene affecting the increased freezing tolerance of *ftl1-1D*. Comparison of the sequence for genomic DNA flanking the T-DNA with genomic sequences from *Arabidopsis* revealed three predicted open reading frames – *At1g12610*, *At1g12600*, and *At1g12620* – within about 10 kb to the right and left of the 35S enhancer (Fig. 1C). The closest predicted ORF (*At1g12610*) encodes an AP transcription factor in the CBF/DREB1 subfamily. Its expression was highly up-regulated in *ftl1-1D* mutants (Fig. 1D). However, transcription of *At1g12600*, encoding a putative UDP-galactose transporter, was only slightly increased while that of *At1g12620*, encoding a pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein, was not influenced by the 35S enhancers (Fig. 1D). The *FTL1* gene is identical to *dwarf and delayed flowering* (*DDF1*), which has previously been identified from an activation tagging line, *ddf1-D*, that exhibits dwarfism, dark-green foliage, delayed flowering, and tolerance to high salinity [9]. To prove that the freezing tolerance observed in our *ftl1-1D/ddf1* was caused by activation of *FTL1/DDF1*, we used pCAMBIA to generate transgenic lines in which the full length of *FTL1* was expressed under the control of the 35S CaMV promoter. Independent transgenic lines had increased freezing tolerance, dwarfism, and later flowering. These results demonstrated that the *ftl1-D* mutation is caused by overexpression of *FTL1/DDF1*.

3.3. Freezing tolerance by *ftl1-1D/ddf1* is increased by cold acclimation but suppressed by GA

Freezing tolerance was examined in detail by monitoring the responses of 4-week-old *ftl1-1D* before or after cold acclimation

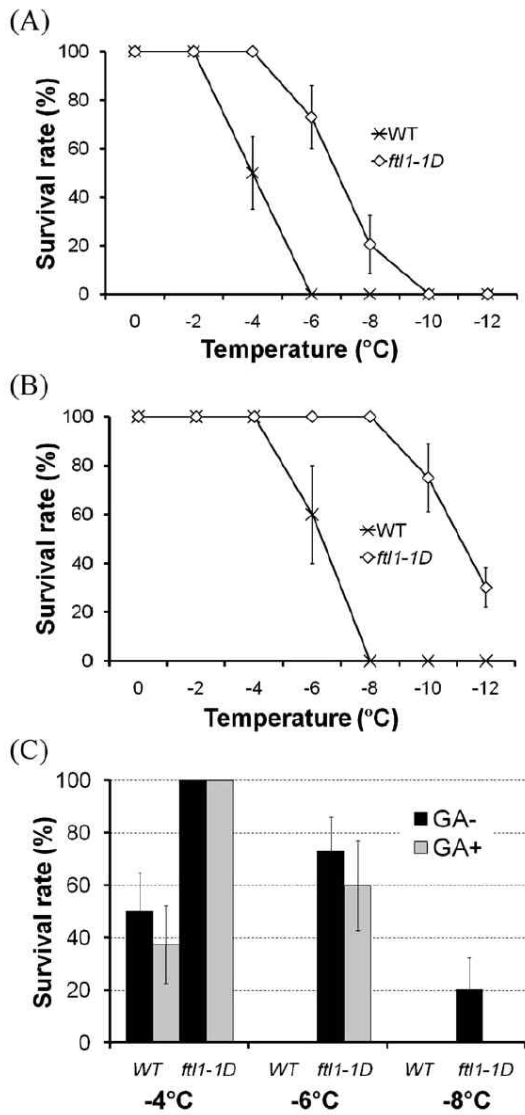


Fig. 2. Characterization of freezing-tolerant *ftl1-1D/ddf1* plants. (A, B) Survival without (A) or with (B) cold-acclimation at low temperatures. Four-week-old plants were exposed for 24 h to a gradient of 0 to -12°C , by 2°C intervals, then returned to normal growing conditions. Cold acclimation was induced under continuous light for 4 d at 4°C . (C) Response of *ftl1-1D* to treatment with 10^{-6} M GA₃ (GA+) under freezing stress. Survival was evaluated 1 week after return to standard growth ($n=24$). Error bars represent standard error of mean (SEM).

was applied (4°C , 4 d). 'Columbia' wild-type (WT) and *ftl1-1D* plants were exposed for 24 h to freezing temperatures (0 to -12°C) and survival was scored after 4 d of recovery under controlled growing conditions. Tolerance was much greater in the leaves from non-acclimated *ftl1-1D* than in WT tissues (Fig. 2A). When plants were exposed to -6°C , the non-acclimated WT did not survive compared with a survival rate of 73% for *ftl1-1D/ddf1*. When cold-acclimated plants were tested, freezing tolerance was greatly enhanced in both WT and *ftl1-1D/ddf1*. After cold acclimation, tolerance at -6°C was enhanced by up to 100% in *ftl1-1D* plants versus a WT survival rate of 60% (Fig. 2B).

Magome et al. [9] have reported that, although *ddf1-D* is a GA-deficient mutant, application of GA₃ rescues the *ddf1* phenotype of dwarfism, delayed flowering, and salt-stress tolerance, thus indi-

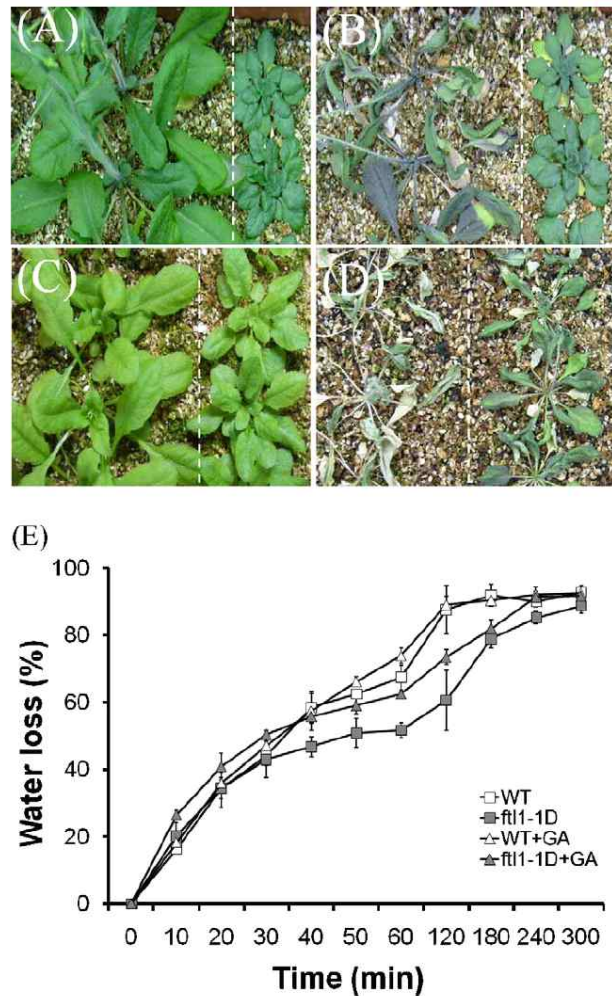


Fig. 3. Response of *ftl1-1D/ddf1* to drought. (A–D) Each panel shows WT (left) and *ftl1-1D/ddf1* (right) plants grown without (A, B) or with (C, D) GA treatment. Plants had first been grown for 4 weeks with watering (A, C), then maintained without watering for additional 12 d (B, D). (E) Water-loss assay of *ftl1-1D/ddf1* ($n=24$). Error bars represent SEM.

ating the involvement of GA-signaling in the plant response to DDF1-induced salt stress. To examine whether gibberellin also acts in DDF1-induced freezing tolerance, we investigated the responses of *ftl1-1D/ddf1*. The originally enhanced tolerance in the mutant was suppressed when plants were sprayed weekly with 10^{-4} M GA₃ (Fig. 2C). When exposed to -8°C , 20% of *ftl1-1D/ddf1* plants grown in soil without exogenous GA₃ survived compared with 0% of those treated with GA₃. However, treated mutant plants were much more tolerant to freezing than were WT plants that did not receive GA₃, indicating that this enhanced tolerance by *ftl1-1D/ddf1* is partially repressed by that hormone (Fig. 2C). Consistent with this pattern for freezing tolerance, both dwarfism and delayed flowering by *ftl1-1D/ddf1* were restored when plants were sprayed with GA₃, an observation similar to that reported by Magome et al. [9].

3.4. *ftl1-1D/ddf1* plants display tolerance to drought and heat stresses

We further evaluated whether *ftl1-1D/ddf1* may confer greater tolerance to drought or heat. WT and mutant plants were grown

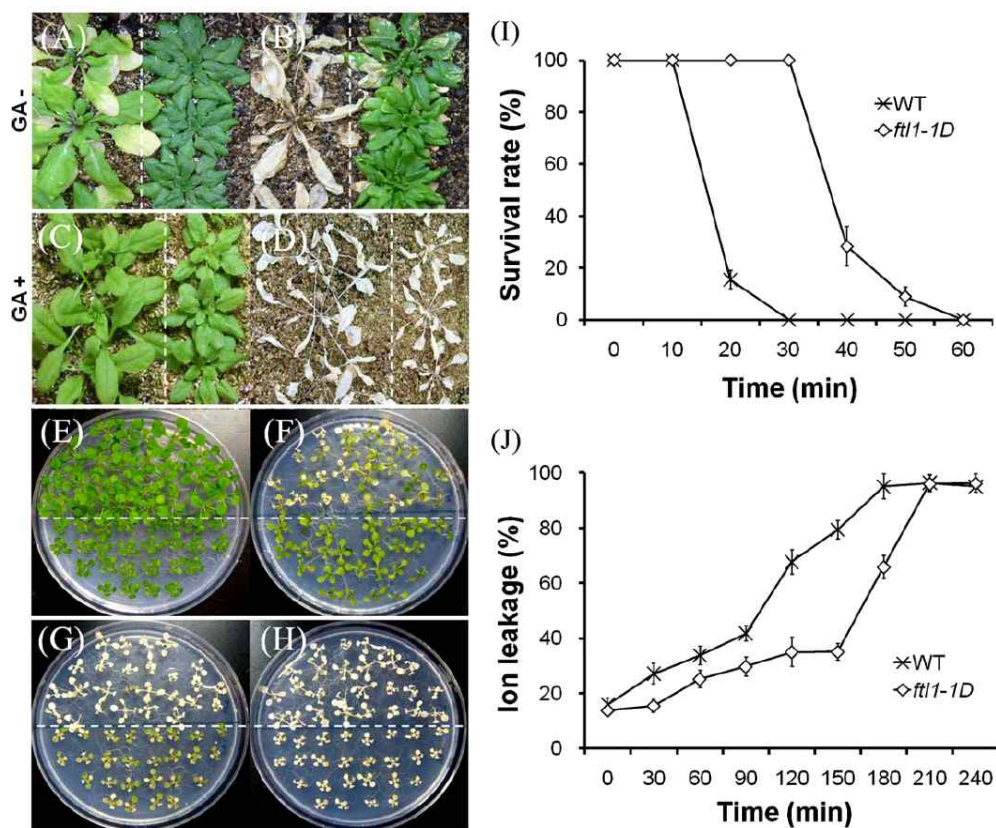


Fig. 4. Response of *ftl1-1D/ddf1* to heat. (A–D) Each panel shows WT (left) and *ftl1-1D/ddf1* (right) plants grown without (A, B) or with (C, D) GA₃ treatment. Plants had first been grown in soil for 4 weeks with watering (A, C), then maintained in 60 °C chamber for additional 7 d (B, D). (E–H) Response of WT (upper) and *ftl1-1D/ddf1* (lower) at seedling stage on MS media. Each plate was exposed to 45 °C for 0 (E), 20 (F), 40 (G), or 60 min (H), and photographed 7 d after return to normal growing conditions. (I) Survival of WT and *ftl1-1D/ddf1* seedlings ($n = 24$). Error bars represent SEM. (J) Electrolyte leakage assay of WT and *ftl1-1D/ddf1* ($n = 24$). Error bars represent SEM.

normally for four weeks, after which irrigation was stopped. Those of the WT withered completely after 12 d without water while the *ftl1-1D/ddf1* plants continued to thrive (Fig. 3B). GA₃ treatment accelerated withering of WT and, to a lesser extent, of *ftl1-1D/ddf1* plants (Fig. 3D). Drought tolerance was also evaluated by assaying for water loss. Plants of *ftl1-1D/ddf1* lost less water than did the WT under our experimental conditions but exogenous GA₃ accelerated water loss in both genotypes (Fig. 3E). At 60 min post-treatment, the *ftl1-1D/ddf1* plants showed a 50% loss compared with 65% for the WT. When GA₃ was applied, water losses for *ftl1-1D/ddf1* and WT plants were 60% and 70%, respectively. These results demonstrate that GA suppresses drought tolerance in *ftl1-1D/ddf1*.

We also investigated whether *ftl1-1D/ddf1* enhances tolerance to high temperatures. To avoid imposing drought stress during those heat treatments, experiments were performed under 90% humidity. WT and *ftl1-1D/ddf1* plants grown for 4 weeks in soil with or without exogenous GA₃ were incubated for 12 h at 60 °C. They were then returned to standard growing conditions. WT plants did not survive during the recovery period while those of *ftl1-1D/ddf1* were revived, although with severe damage (Fig. 4A and B). GA₃-treated *ftl1-1D/ddf1* plants did not recover (Fig. 4C and D), demonstrating that exogenous gibberellin suppressed their heat tolerance. We also evaluated the *in vitro* response of *ftl1-1D/ddf1* to such stress, using 10-day-old seedlings grown in an MS medium. Survival was higher for these mutants than for the WT (Fig. 4E–I). The rate for WT seedlings was only 16% after 20 min at 45 °C compared with 100% survival for the *ftl1-1D/ddf1*

(Fig. 4I). Results from our electrolyte assay also demonstrated that the *ftl1-1D/ddf1* mutant incurred relatively less damage than did the WT (Fig. 4J). That difference in ion leakage was most critical at approximately 150 min after heat treatment, with percentages of 79.4% and 35.7% for WT and *ftl1-1D/ddf1*, respectively (Fig. 4J).

3.5. *FTL1/DDF1* is up-regulated by cold, drought, and heat

FTL1/DDF1 is induced strongly by high salinity [9,16]. Here, we used real-time RT PCR to monitor the accumulation of *FTL1/DDF1* mRNA along a time course for cold, drought, or heat stresses. All three led to elevated expression of *FTL1/DDF1*, although transcript patterns differed (Fig. 5). Under cold stress, *FTL1/DDF1* mRNA increased 7-fold at 4 h after the treatment before decreasing gradually by the time the treatment ended after 24 h (Fig. 5A). During the drought-stress period, expression rapidly increased (150-fold) by Hour 2, where it remained constant to Hour 8 before rising 200-fold by Hour 24 (Fig. 5B). Heat stress caused expression to increase by 7-fold after 4 h, where it remained at a constant level through the end of the experimental period (Fig. 5C). Although cold stress was associated with a somewhat transient pattern of induction for *FTL1/DDF1* mRNA (Fig. 5A), expression was maintained at a constant level following both drought and heat treatments (Fig. 5B and C). *ELF1 α* [1] served as internal control. *KIN1*, *RAB18*, and *HSPB1* were used as stress markers in each experiment.

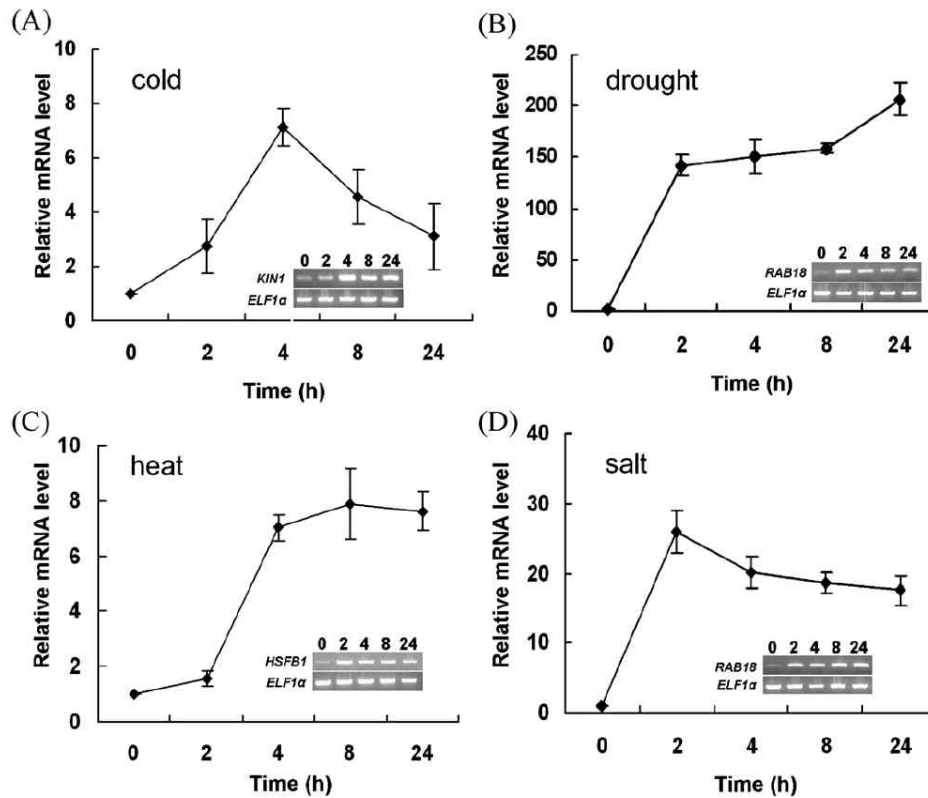


Fig. 5. Expression analyses of *FTL1/DDF1* under different abiotic stresses by real-time RT-PCR. Treatment with (A) cold, (B) drought, (C) heat, or (D) salt. The primer sequences for amplifying *ELF1α*, *KIN1*, *RAB18*, and *HSFB1* are listed in Table 1. Values show quantities relative to that of hour 0 sample, which was set to '1'.

3.6. Expression of genes that may be related to the functioning of CBF/DREB1s in *ftl1-1D/ddf1*

Among AP2 transcription factors [9], *FTL1/DDF1* belongs to the subfamily of CBF/DREB1, members of which are known to control the expression of stress-response genes and thus confer improved tolerance when over-expressed [15,17–19]. We have examined the expression of target genes for CBF/DREB1 transcription factors, such as *COLD-REGULATED 15A (COR15A)*, *RESPONSIVE TO DESSICATION 29A (RD29A)*, *RESPONSIVE TO ABA 18 (RAB18)*, *KIN1* and *COLD-REGULATED 15B (COR15B)* [10], and a heat shock transcription factor, *HSE3* [20,21], in *ftl1-1D/ddf1* plants. Here, all were up-regulated in those plants even without any abiotic stress (Fig. 6A). These results showed that overexpression of the *FTL1/DDF1* induced those stress-response genes and increased the tolerance of *Arabidopsis* plants to cold, drought, salt, and heat. The DELLA proteins, which act as repressors in GA signaling, have been postulated as candidates for a putative integrator of growth and stress [1,10]. Magome et al. [10] have proposed a model that shows *RGL3* as contributing to the accumulation of DELLA proteins. This hypothesis is based on the fact that *RGL3*, one of five DELLA genes (also *RGA*, *GAI*, *RGL1*, and *RGL2*) is up-regulated in plants that over-express *DDF1*. Using real-time quantitative PCR to investigate the expression of those five *DELLA* genes in WT and *ftl1-1D/ddf1* plants, we found that only *RGL3* was up-regulated whereas *GAI*, *RGL1*, and *RGL2* were down-regulated and *RGA* was unchanged or increased only slightly (Fig. 6B). Therefore, we suggest that those *DELLA* genes are regulated differently for stress adaptation.

4. Discussion

Chilling or freezing temperatures can severely impair plant growth and development, adversely affecting their quality and productivity. To develop cold-tolerant crops, it is important to understand the molecular regulatory mechanisms by which plants cope with such stress. In an effort to identify key regulatory genes, we utilized an *Arabidopsis* activation tagging pool to screen for plants with improved freezing tolerance. Here, the *ftl1-1D* mutant showed greatly enhanced tolerance as well as a phenotype of dwarfism and delayed flowering, which was co-segregated at a 3:1 ratio of a single T-DNA insertion in both herbicide resistance and phenotypic characteristics. Freezing tolerance was evident irrespective of cold-acclimation.

Through the determination of nucleotide sequences flanking T-DNA and expression analysis of genes around the T-DNA insertion site in the *ftl1-1D* genome, we found that the phenotype of *ftl1-1D* might result from overexpression of *DDF1* (Fig. 1A and B) encoding an AP2 transcription factor belonging to the CBF/DREB1 subfamily [9]. *DDF1* is known to decrease the level of biologically active GA by promoting the transcription of a GA-deactivating gene, *GA2ox7* [10]. Plants of *ddf1*, a gain-of-function allele of *DDF1*, and transgenic *Arabidopsis* overexpressing the *DDF1*, driven by the CaMV 35S promoter (35S::*DDF1*), exhibit dwarfism, delayed flowering, and enhanced salt tolerance. However, when exogenous GA₃ is applied, those plants recover their WT-like phenotype and lose their tolerance to high salinity [9]. We also observed that *ftl1-1D* plants converted to a WT-like phenotype and were not cold-tolerant when the same treatment was used. Our transgenic 35S::*DDF1*

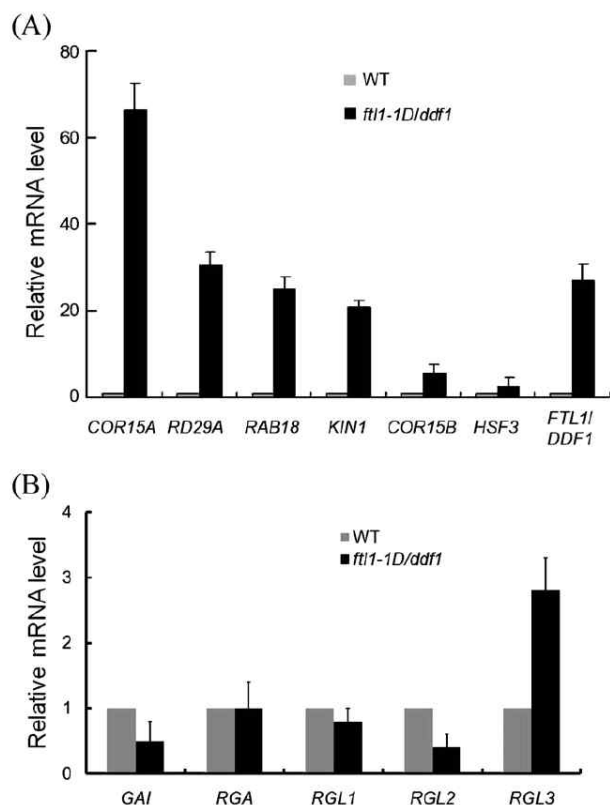


Fig. 6. Expression analyses of some genes associated with plant adaptations to environmental stresses. (A) Genes responding putatively to cold, drought, salt, or heat in WT and *ftl1-1D/ddf1* plants, including CRT/DRE cis-element-containing genes and *HSF3*, a heat shock transcription factor gene. (B) Five DELLA genes—*GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2*, and *RGL3*. Values indicate mRNA levels of *ftl1-1D/ddf1* relative to each WT level, as set to '1'. Primer sequences are listed in Table 1.

Arabidopsis plants behaved the same way (data not shown). Therefore, concluding that *ddf1* and *ftl1-1D* are gain-of-function alleles of *DDF1*, we designated *DDF1* and *ftl1-1D* as *FTL1/DDF1* and *ftl1-1D/ddf1*, respectively. Mutant plants over-expressing *FTL1/DDF1* also displayed increased tolerance to drought and heat. Their improved stress tolerances were restored by applying exogenous active GA, thereby indicating that all of these tolerant phenotypes were related to a reduction in active GA.

In WT plants, *FTL1/DDF1* was up-regulated by cold, drought, salt, or heat treatment, although timing of the response differed for each. This suggests that the gene plays an important role in plant adaptations to other abiotic or environmental stresses, as well as to high salinity [10]. Activation of *FTL1/DDF1* through tagging or transformation with *35S::FTL1/DDF1* increased the transcription of abiotic stress-induced genes, including *COR15A*, *RD29A*, *RAB18A*, *KIN1*, and *COR15B*, which harbor a dehydration-responsive element/C-repeat (DRE/CRT) with the core cis-acting element (A/GCCGACNT) in their promoter regions. They are known as direct-targeting genes of the CBF/DREB1 transcription factors. Our results are similar to those obtained from a microarray analysis of *35S::DDF1* plants by Magome et al. [10]. However, a heat stress-related function for the CBF/DREB1 family genes, including *FTL1/DDF1*, had not previously been reported.

Because heat-shock genes are induced by *DREB2*-type genes, but not by *DREB1* [19,22,23], our finding of tolerance to high temperatures by *ftl1-1D/ddf1* plants is an unexpected phenotype. Moreover, *FTL1/DDF1* was up-regulated by such treatment. And *HSF3* [20,21],

which is responsible for inducing heat shock protein genes, also was up-regulated in our *ftl1-1D/ddf1* plants (Fig. 6A). This supports the hypothesis that overexpression of *FTL1/DDF1* affects the expression of heat shock-related genes. DELLA proteins that modulate growth in response to GA have received attention as integrators of endogenous and environmental signals in regulating plant growth [26,27]. It has been speculated that the CBF/DREB1 subfamily genes, including *FTL1/DDF1* and *CBF1/DREB1b*, control abiotic-stress adaptations by a DELLA-dependent mechanism, as well as through a DELLA-independent pathway via their direct targeting genes, e.g., *COR15A*, *RD29A*, *RAB18A*, *KIN1*, and *COR15B* [1,10]. Magome et al. [10] have proposed a model showing that the accumulation of DELLA proteins is induced by *RGL3*. This assumption is based on the fact that *RGL3* is up-regulated in plants that over-express *DDF1*, and that those DELLA proteins are associated with growth retardation and stress adaptations [1,10,24–27]. Although some genetics and molecular biological studies have provided evidence for this type of DELLA-protein accumulation during cold adaptation in plants [1], whether all of them are involved in the process is not yet known. Our quantitative RT-PCR showed that freezing-tolerant *ftl1-1D/ddf1* plants over-expressing *FTL1/DDF1* had apparently higher levels of *RGL3* transcript but reduced levels of *GAI*, *RGL1*, and *RGL2*; *RGA* expression seemed to be unchanged. Achard et al. [1] have demonstrated that *RGA* regulates the plant adaptation to cold stress at the translational, not transcriptional, level according to the cold-inducible CBF1-dependent signaling pathway. We speculate that the differing transcriptional regulation of *RGL3*, *GAI*, *RGL1*, and *RGL2* may influence their biological functioning.

In conclusion, overexpression of *FTL1/DDF1* in *Arabidopsis* plants induces various stress-response genes and confers enhanced tolerance to cold, drought, heat, and salt. The phenotype mediated by constitutive expression of *FTL1/DDF1* is recovered by treatment with gibberellin, indicating that inactivation of GA plays an important role in the process of adaptation to multiple stresses.

Acknowledgements

We thank Priscilla Licht for critical proofreading of the manuscript. This work was supported by the Priority Research Centers Program (2010-0029630) and the Basic Research Program (2010-0010915) through the National Research Foundation (NRF) funded by the Ministry of Education, Science, and Technology, and in part by Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (110007-3), Republic of Korea.

References

- [1] P. Achard, F. Gong, S. Chémant, M. Alioua, P. Hedden, P. Genschik, The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism, *Plant Cell* 20 (2008) 2117–2129.
- [2] K. Nakashima, Y. Ito, K. Yamaguchi-Shinozaki, Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses, *Plant Physiol.* 149 (2009) 88–95.
- [3] S. Fowler, M.F. Thomashow, *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway, *Plant Cell* 14 (2002) 1675–1690.
- [4] K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Gene networks involved in drought stress response and tolerance, *J. Exp. Bot.* 58 (2007) 221–227.
- [5] V. Chinnusamy, K. Schumaker, J.K. Zhu, Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants, *J. Exp. Bot.* 55 (2004) 225–236.
- [6] K. Shameer, S. Ambika, S.M. Varghese, N. Karaba, M. Udayakumar, R. Sowdhamini, STIFDB-*Arabidopsis* stress responsive transcription factor database, *Int. J. Plant Genomics* 2009 (2009) 583429.
- [7] H.J. Bohnert, D.E. Nelson, R.G. Jensen, Adaptations to environmental stresses, *Plant Cell* 7 (1995) 1099–1111.
- [8] J.S. Boyer, Plant productivity and environment, *Science* 218 (1982) 443–448.
- [9] H. Magome, S. Yamaguchi, A. Hanada, Y. Kamiya, K. Oda, *dwarf and delayed-flowering 1*, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis

- because of overexpression of a putative AP2 transcription factor, *Plant J.* 37 (2004) 720–729.
- [10] H. Magome, S. Yamaguchi, A. Hanada, Y. Kamiya, K. Oda, The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, *GA2ox7*, under high-salinity stress in *Arabidopsis*, *Plant J.* 56 (2008) 613–626.
- [11] S. Clough, A.F. Bent, Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 16 (1998) 735–743.
- [12] D. Weigel, J.H. Ahn, M.A. Blazquez, J.O. Borevitz, S.K. Christensen, C. Fankhauser, C. Ferrandiz, I. Kardailsky, E.J. Neff, M.M. Malancharuvil, J.T. Nguyen, S. Sato, Z.Y. Wang, Y. Xia, R.A. Dixon, M.J. Harrison, C.J. Lamb, M.F. Yanofsky, J. Chory, Activation tagging in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 122 (2000) 1003–1013.
- [13] K.H. Jung, M.J. Han, D.Y. Lee, Y.S. Lee, L. Schreiber, R. Franke, A. Faust, A. Yephremov, H. Saedler, Y.W. Kim, I. Hwang, G. An, Wax-deficient anther1 is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development, *Plant Cell* 18 (2006) 3015–3032.
- [14] V. Lefebvre, H. North, A. Frey, B. Sotta, M. Seo, M. Okamoto, E. Nambara, A. Marion-Poll, Functional analysis of *Arabidopsis NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy, *Plant J.* 45 (2006) 309–319.
- [15] S.J. Gilmour, A.M. Sebolt, M.P. Salazar, J.D. Everard, M.F. Thomashow, Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation, *Plant Physiol.* 124 (2000) 1854–1865.
- [16] Y. Sakuma, Q. Liu, J.G. Dubouzet, H. Abe, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (2002) 998–1009.
- [17] V. Haake, D. Cook, J.L. Riechmann, O. Pineda, M.F. Thomashow, J.Z. Zhang, Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 130 (2002) 639–648.
- [18] M. Kasuga, Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 287–291.
- [19] Q. Liu, M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 10 (1998) 1391–1406.
- [20] I.I. Panchuk, R.A. Volkov, F. Schöffl, Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 129 (2002) 838–853.
- [21] R. Prändl, K. Hinderhofer, G. Eggers-Schumacher, F. Schöffl, HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants, *Mol. Gen. Genet.* 258 (1998) 269–278.
- [22] K. Nakashima, Z.K. Shinwari, Y. Sakuma, M. Seki, S. Miura, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression, *Plant Mol. Biol.* 42 (2000) 657–665.
- [23] Y. Sakuma, K. Maruyama, Y. Osakabe, F. Qin, M. Seki, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression, *Plant Cell* 18 (2006) 1292–1309.
- [24] P. Achard, J.P. Renou, R. Berthomé, N.P. Harberd, P. Genschik, Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species, *Curr. Biol.* 18 (2008) 656–660.
- [25] A. Robert-Seilaniantz, R. Bari, J.D.G. Jones, A biotic or abiotic stress? in: A. Pareek, S.K. Sopory, H.J. Bohnert, Govindjee (Eds.), *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*, Springer, Dordrecht, 2010, pp. 113–116.
- [26] P. Achard, L. Liao, C. Jiang, T. Desnos, J. Bartlett, Xi. Fu, N.P. Harberd, DELLAs contribute to plant photomorphogenesis *Plant Physiol.* 143 (2007) 1163–1172.
- [27] P. Achard, H. Cheng, L. De Grauwe, J. Decat, H. Schoutteten, T. Moritz, D. Peng, J. Van Der Straeten, N.P. Harberd, Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals, *Science* 311 (2006) 91–94.

The homeodomain-leucine zipper ATHB23, a phytochrome B-interacting protein, is important for phytochrome B-mediated red light signaling

Hyunmo Choi^{a,b}, Suyeong Jeong^{a,b}, Dong Su Kim^c, Hyung Jin Na^c, Jong Sang Ryu^b,
Seung Sik Lee^d, Hong Gil Nam^{a,e}, Pyung Ok Lim^{a,e,*} and Hye Ryun Woo^{a,e,*}

^aAcademy of New Biology for Plant Senescence and Life History, Institute for Basic Science, DGIST, Daegu, Republic of Korea

^bDepartment of Life Sciences, POSTECH, Pohang, Republic of Korea

^cGenomine Research Division, Genomine Inc., Pohang, Republic of Korea

^dAdvanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup, Republic of Korea

^eDepartment of New Biology, DGIST, Daegu, Republic of Korea

*Corresponding authors, e-mail: hrwoo@dgist.ac.kr; polim@dgist.ac.kr

Received 23 April 2013; revised 14 June 2013

Phytochromes are red (R)/far-red (FR) photoreceptors that are central to the regulation of plant growth and development. Although it is well known that photoactivated phytochromes are translocated into the nucleus where they interact with a variety of nuclear proteins and ultimately regulate genome-wide transcription, the mechanisms by which these photoreceptors function are not completely understood. In an effort to enhance our understanding of phytochrome-mediated light signaling networks, we attempted to identify novel proteins interacting with phytochrome B (phyB). Using affinity purification in *Arabidopsis* phyB overexpressor, coupled with mass spectrometry analysis, 16 proteins that interact with phyB *in vivo* were identified. Interactions between phyB and six putative phyB-interacting proteins were confirmed by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/ppl.12087

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Involvement of these proteins in phyB-mediated signaling pathways was also revealed by physiological analysis of the mutants defective in each phyB-interacting protein. We further characterized the *athb23* mutant impaired in the *Homeobox Protein 23 (ATHB23)* gene. The *athb23* mutant displayed altered hypocotyl growth under R light, as well as defects in phyB-dependent seed germination and phyB-mediated cotyledon expansion. Taken together, these results suggest that the ATHB23 transcription factor is a novel component of the phyB-mediated R light signaling pathway.

Introduction

Plants possess sophisticated light sensing systems that involve multiple photoreceptors, namely, UV-A/blue (B) light-absorbing cryptochromes and phototropins, UV-B light-absorbing UV RESISTANCE LOCUS 8, and red (R) and far-red (FR)-light-absorbing phytochromes (Quail 2002, Li et al. 2011). These photoreceptors regulate diverse photomorphogenic responses throughout the life cycle of plants, including seed germination, seedling establishment, the development of the photosynthetic machinery, the timing of flowering, bud dormancy, responses to neighbor competition, the allocation of resources, and the development of reproductive/storage structures, by perceiving and integrating the environmental light signals (Franklin and Quail 2010, Kami et al. 2010). Phytochromes, which mainly sense R and FR light, comprise a five-member family in *Arabidopsis thaliana* designated phytochrome A (phyA) to phyE. Each phytochrome has discrete, albeit sometimes overlapping or antagonistic photosensory and/or physiological functions in controlling various photophysiological responses (Fruya and Schäfer 1996, Bae and Choi 2008). Among the five phytochromes, phyA and phyB have the most prominent functions; phyA acts as FR light receptor that mediates the very-low-fluence response and the FR light high-irradiance response (HIR), while phyB is a photoreceptor that mediates the low-fluence response and the R light HIR (Smith 1995, Schäfer and Bowler 2002).

Phytochromes are soluble dimeric chromoproteins consisting of approximately 120 kDalton (kDa) polypeptide subunits that carry an N-terminal photosensory domain and a C-terminal domain; the latter functions in dimerization and contains a region with sequence similarity to prokaryotic two-component histidine kinases (Montgomery and Lagarias 2002, Hughes 2010). The N-terminal photosensory domain contains a covalently linked linear tetrapyrrole chromophore (phytochromobilin) and is responsible for the unique capacity of phytochromes to convert between R light-absorbing Pr and FR light-absorbing Pfr forms in a photo-induced reversible manner (Lagarias and Rapoport 1980, Rockwell and Lagarias 2010).

This article is protected by copyright. All rights reserved.

The action of phytochromes as light receptors primarily relies on the ability of the biologically active Pfr forms to translocate into the nucleus in response to light and orchestrate signaling events that selectively alter the expression of target genes (Nagatani 2004, Fankhauser and Chen 2008).

Recent molecular genetic studies have greatly improved our understanding of phytochrome signaling, particularly the molecular components potentially involved in the early steps of the phytochrome signaling pathway. Through unbiased screening for phytochrome-interacting proteins and targeted protein-protein interaction studies, many phytochrome-interacting proteins have been identified. These include a group of nuclear-localized basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors referred to as phytochrome-interacting factors (PIFs). PIFs interact directly and preferentially with the Pfr forms of phyA, phyB, or both, and PIFs negatively regulate photomorphogenesis both in the dark and in the light (Quail 2000, Castillon et al. 2007). Since PIF3 was identified through a yeast two-hybrid (Y2H) screen using phyB as bait, six additional PIFs and/or PIF3-Like proteins (PILs) have been identified (Ni et al. 1998, Khanna et al. 2004, Leivar and Quail 2011). The light-activated Pfr forms of phytochrome interact with, rapidly phosphorylate, polyubiquitinate, and degrade PIFs via the 26S proteasome-mediated pathway, thereby promoting photomorphogenesis (Al-Sady et al. 2006, Shen et al. 2005, Bu et al. 2011). Another group of proteins that interact with phytochromes is PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE (PKS) proteins. PKS proteins regulate phytochrome-mediated developmental processes such as de-etiolation and growth orientation of hypocotyls (Khanna et al. 2006, Kami et al. 2012). PKS1, the founding member of the PKS proteins, was identified in an Y2H screen using phyA as bait (Fankhauser et al. 1999). phyA interacts with PKS2 and PKS4, as well as PKS1, and can phosphorylate PKS1 *in vitro* (Lariguet et al. 2003, Schepens 2008). While PKS1 is phosphorylated by phyA, Phytochrome-Specific Type 5 Phosphatase (PAPP5), another phytochrome-interacting partner, can dephosphorylate phytochromes. PAPP5 was also identified by Y2H screening using phyA as bait. PAPP5 interacts with phyA and phyB, and specifically dephosphorylates the Pfr forms of phytochrome (Ryu et al. 2005). NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE 2 (NDPK2) is a protein kinase that is involved in light signaling. NDPK2, a positive regulator of phytochrome signaling, interacts preferentially with the Pfr form of phyA, and the kinase activity of NDPK2 increases in the presence of phyA (Choi et al. 1999). In addition, Arabidopsis Response Regulator 4 and SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2/IAA3) also interact with phytochromes and function in integrating light and hormone signaling during plant development (Sweere et al. 2001, Tian et al. 2003).

This article is protected by copyright. All rights reserved.

To date, most of the potential phytochrome-interacting proteins have been identified using Y2H studies. However, Y2H screens to isolate phytochrome-interacting proteins have limitations caused by the use of heterologous expression systems. We thus performed mass spectrometry (MS)-based proteomic analysis of affinity purified phyB complexes *in vivo* to identify proteins that interact with phyB in *Arabidopsis*. We identified 16 proteins that specifically co-purified with GFP-tagged phyB. The interaction between phyB and putative phyB-interacting proteins was further confirmed by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis for six phyB-interacting proteins, including PIF3-Like 1 (PIL1) and Homeobox Protein 23 (ATHB23). Four out of five *Arabidopsis* mutants of phyB-interacting proteins displayed altered hypocotyl growth responses in R light. We further focused on *ATHB23*, since the *athb23* mutant exhibited the greatest changes in hypocotyl growth under R light. ATHB23 was clearly localized in the nucleus, supporting the notion that ATHB23 functions as a transcription factor. The *athb23* mutant exhibited long hypocotyl phenotype under R light, but not under FR or B light, compared to the wild-type. Moreover, we found that ATHB23 positively regulates phyB-dependent seed germination and mediates cotyledon expansion. Overall, these results suggest that ATHB23, a transcription factor, is a novel component of the phyB-mediated R light signaling pathway.

Materials and methods

Plant materials

Arabidopsis thaliana wild-type (*Ler*) and transgenic plants overexpressing *35S::phyB::GFP* with a *phyB-5* mutant background (PBG-5) (Yamaguchi et al. 1999) were used for the isolation of phyB-interacting proteins. T-DNA insertional mutant seeds of *adg1* (SALK_040155), *athb23* (SAIL_155_H02), *dbp1* (SALK_144824), *at1g74490* (SALK_151735), and *at2g26190* (SALK_101894) were obtained from the Ohio Arabidopsis Stock Center. All of the *Arabidopsis* mutants used in this study were derived from the Col-0 ecotype.

Protein extraction from *Arabidopsis* seedlings

Seed from *Arabidopsis* wild-type (*Ler*) and *phyB::GFP*-overexpressing PBG-5 plants were sterilized, sown on 0.5× MS agar plates containing 1% sucrose, and grown at 22°C for 5 days in the dark. The plates were irradiated with R light (10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 2 hours. Approximately 500 mg of seedlings were homogenized in liquid N₂. The homogenates were resuspended in 2 mL extraction buffer (10 mM HEPES, pH 7.5, 10% glycerol, 100 mM NaCl,

This article is protected by copyright. All rights reserved.

0.2% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1× protease inhibitor), incubated on ice for 10 min, and centrifuged at 16 000 g for 20 min.

Affinity purification, 2-DE, and image acquisition

The supernatants were incubated with agarose beads conjugated with anti-GFP antibodies (Santa Cruz Biotech) in the dark for 2 hours at 4°C. The beads were washed with washing buffer (50 mM Tris-HCl, Ph 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100). After centrifugation, the supernatant fractions and immunoprecipitated fractions containing the proteins bound to anti-GFP antibodies were collected. The total proteins of each fraction were then directly dissolved in 10 volumes of 2-DE lysis solution (9.5 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 45 mM Tris base, 1% [w/v] DTT, 2% v/v carrier ampholytes, pH 3.5–10 [Amersham Bioscience]), and the insoluble material was removed by centrifugation (11 500 g). Equal amounts of protein (200 µg) from the unwashed bead fraction or the unbound supernatant protein fraction were then subjected to 2-DE separation. For the buffer-washed co-immunoprecipitant, 20 µg of protein extract was used. The extracted protein solutions were applied by cup loading for first dimension IEF with IPG strips (24 cm, pH 4–10, Genomine DryStrip™; Genomine Inc.) equilibrated overnight with rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 1% [w/v] DTT, 1% v/v carrier ampholytes, pH 3.5–10 [Amersham Bioscience]). Second dimension electrophoresis was performed using a 10–15% gradient gel with the Iso-Dalt system (Amersham Pharmacia Biotech). The separated spots were detected by MALDI-TOF compatible alkaline silver staining as described (Rabilloud et al. 1998). Image matching and analysis of the 2-DE gels was carried out using PDQUEST™ software (version 7.1, Bio-Rad) according to the manufacturer's protocols.

Protein identification

Protein spot cleaning and in-gel digestion were performed as previously described (Fernandez et al. 1998). Briefly, protein spots excised from 2-DE gels were destained with potassium ferricyanide, washed, dehydrated with 50% acetonitrile, and dried in a vacuum centrifuge. Gel slices were incubated with modified trypsin (Promega) overnight at 37°C. The proteolytic reaction was terminated by adding 0.5% trifluoroacetic acid. The tryptic peptides were desalted and concentrated using C₁₈ZipTips (Millipore) or an in-house-prepared C18-microcolumn, and the peptides were eluted in 1–5 µL of 50% acetonitrile. An aliquot of this solution was mixed with two volumes of a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% aqueous acetonitrile, and 0.3 µL of the mixture was spotted onto a target plate.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Peptide masses were measured by using an Ettan MALDI-TOF Pro spectrometer (Amersham Bioscience). MS data were collected from 300 shots at a maximum accelerating potential of 20 kV in positive reflectron mode. Calibrated masses were used for identification by peptide mass fingerprinting by matching proteins in the NCBI nr database using the search engine ProFound, developed by The Rockefeller University (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl/cgi/profound.exe/ProFound.exe?FORM=1>).

Protoplast transformation and BiFC assay

Protoplasts were generated from 3-week-old *Arabidopsis* Col-0 leaves and transformed using the PEG method as described by Kim et al. (2008). The BiFC assay was performed according to Walter et al. (2004). Full-length cDNA fragments for *phyB* and the genes encoding phyB-interacting proteins were amplified from *Arabidopsis* Col-0 cDNA by PCR with Taq polymerase. PCR products were cloned into pUC-SPYNE and pUC-SPYCE, which generated fusion proteins with the N- or C-terminal part of YFP, respectively. Interactions between phyB-YFP^C and (each phyB-interacting protein gene)-YFP^N were visualized 1 day after transfection by confocal laser scanning microscopy. Nuclei of protoplasts were visualized with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining.

Hypocotyl elongation assays

Seeds were surface sterilized and plated onto 0.1× MS agar without sucrose and incubated at 4°C for 3 days in the dark, followed by exposure to continuous white light ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 16 hours to induce uniform germination. The plates were transferred to monochromatic light conditions and incubated for the designated period of time at 22°C. R, FR, and B light were generated by light-emitting diode (LED) light sources at 470, 670, and 735 nm, respectively (Good Feeling, Korea). White light was supplied by fluorescent lamps. Fluence rates were measured with an Optical Power Meter (model 840, Newport). The hypocotyl lengths were measured using the scion image program (Scion Corporation).

Response to EODFR treatment

After surface sterilization and cold-treatment of the seeds as described previously, more than 50 seeds of each line were sown onto 0.8% agar plates containing 1/2 Gamborg B5 salts with 1% sucrose. The plates were incubated under white light ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 16 hours, followed by incubation under an 8 hours white light/16 hours dark cycle at 22°C for 5 days. The EOD-R and EOD-FR treatments were performed by irradiating the plants with an R light

This article is protected by copyright. All rights reserved.

pulse (5 min; $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) or a FR light pulse (5 min; $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at the end of the 8 hours white light cycle, respectively. For the reversibility of the EOD-FR treatment, the plates were treated with an R light pulse (5 min; $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) after EOD-FR treatment. The hypocotyl lengths were measured as described for the hypocotyl elongation assay.

Seed germination assays

For the phyA-dependent germination assay, seeds were irradiated with FR light ($3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 5 min and then incubated in the dark for 48 hours. After the dark incubation, the seeds were irradiated with FR light of various fluences (14.4 to 86.4 mmol m^{-2}) and incubated in the dark for 5 days. For the phyB-dependent germination assay, seeds were irradiated with FR light ($3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 5 min and subsequently irradiated with R light of various fluences (14.4 to 86.4 mmol m^{-2}). After irradiation, the seeds were incubated in the dark for 5 days, and the germination frequencies were measured.

Results

Identification of phyB complex proteins

To understand the highly complex and interconnected networks of the phytochrome signaling pathways better, we attempted to isolate phyB complex proteins in *Arabidopsis in vivo* through affinity chromatography and MS-based proteomic analysis. The strategy for purification and identification of phyB complex proteins is illustrated in Figure 1A. Five-day-old dark-grown seedlings of *Arabidopsis* wild-type (*Ler*) and transgenic plants overexpressing *Pro35S::phyB::GFP* with *phyB-5* mutant background (PBG-5) (Yamaguchi et al. 1999) were irradiated with R light ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 2 hours to isolate proteins that interact with phyB when the Pfr form of phyB is enriched.

Through affinity chromatography with anti-GFP antibodies, we obtained four protein fractions from the wild-type (*Ler*) and PBG-5 transgenic seedlings (immunoprecipitated and supernatant fractions from each; see Methods for details). These fractions were subsequently resolved using 2-D gel electrophoresis (2-DE); the immunoprecipitated fractions from the wild-type (*Ler*) and PBG-5 transgenic seedlings are shown in Figures 1B and 1C, respectively. A relatively low-stringency washing condition was applied to maximize the recovery of proteins that weakly, indirectly, and/or transiently bind phyB *in vivo*. We distinguished putative phyB-interacting proteins from the nonspecific protein background by comparing 2-D gel patterns of immunoprecipitated fractions of PBG-5 transgenic seedlings with those of wild-type (*Ler*) seedlings. Protein spots found in supernatant fraction of PBG-5

This article is protected by copyright. All rights reserved.

transgenic seedlings were also excluded.

Of the 71 spots analyzed for matrix-associated laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) peptide mass finger printing, 16 proteins were identified as putative phyB complex proteins (Table 1). It is noteworthy that the putative phyB complex proteins included PIF3-Like 1 (PIL1), which is highly similar to a well-known phytochrome-interacting protein, PIF3 (Toledo-Ortiz et al. 2003). We also identified another putative transcription factor, Homeobox Protein 23 (ATHB23). Regulatory proteins involved in protein modification, such as DNA-Binding Protein phosphatase 1 (DBP1) and a putative kinase (AT1G74490), were identified as putative phyB complex proteins. Notably, proteins thought to be involved in chloroplast function, such as ADP Glucose pyrophosphorylase 1 (ADG1), and Chloroplast Biogenesis 4 (CLB4) were also identified as the putative phyB complex proteins.

Interactions between phyB and putative phyB-interacting proteins were confirmed by BiFC analysis

To confirm the interaction between phyB and putative phyB complex proteins shown in Table 1, we employed BiFC analysis using *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. Plasmids encoding split YFP-fusion proteins with phyB and each putative phyB-interacting protein were transformed into *Arabidopsis* protoplasts. After one-day incubation in the dark, the transformed protoplasts were irradiated with R light ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 2 hours immediately prior to observation under a fluorescence microscope. Interactions between phyB and 12 out of 16 putative phyB-interacting proteins were further examined by BiFC analysis. Among these, six were shown to interact with phyB by BiFC analysis (Figure 2 and Table S1). phyB-YFP^C interacted with ATHB23-YFP^N (Figure 2B) and PIL1-YFP^N (Figure 2D) preferentially in the nucleus, while an interaction between phyB-YFP^C and AT1G74490-YFP^N (Figure 2E) or AT2G26190-YFP^N (Figure 2F) was shown mainly in the cytoplasm. phyB-YFP^C interacted with ADG1-YFP^N (Figure 2A) and DBP1-YFP^N (Figure 2C) in the nucleus and in the cytoplasm.

phyB-interacting proteins regulate the R light-mediated hypocotyl growth response of *Arabidopsis* seedlings

To gain insights into the function of phyB-interacting proteins in phytochrome signaling, *Arabidopsis* mutants carrying a T-DNA insertion in genes encoding each phyB-interacting protein (Figure 3A) were analyzed. We measured hypocotyl growth in the wild-type (Col-0) and homozygous mutant (designated as *adg1*, *athb23*, *dbp1*, *at1g74490*, and *at2g26190*)

This article is protected by copyright. All rights reserved.

seedlings in response to R, FR, and B light (Figures 3B and S2). The *pil1* mutant was not included because it was previously reported that *pil1* displays long hypocotyl phenotype under R and FR light, compared to the wild-type (Khanna et al. 2006). None of the mutants examined showed any pronounced effect of FR and B light responses. By contrast, four except the *at2g26190* mutant displayed significantly different R light responses from those of wild-type. The *athb23* and *dbp1* mutants exhibited reduced inhibition of hypocotyl growth than the wild-type (Col-0) under R light. However, the *adg1* and *at1g74490* mutants had shorter hypocotyls under R light than the wild-type. These results suggest that four phyB-interacting proteins function as regulators of R light-mediated hypocotyl growth response of *Arabidopsis* seedlings (ATHB23 and DBP1 as positive regulators; ADG1 and AT1G74490 as negative regulators).

ATHB23, a phyB-interacting protein, is a member of the class I HD-ZIP family of transcription factors

As the *athb23* mutant exhibited the greatest changes in hypocotyl growth under R light among the five mutants examined, we focused on ATHB23 for detailed analysis. ATHB23, a member of the class I homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP) family of transcription factors, is a 255-amino acid protein containing a nuclear localization signal sequence and two DNA-binding domains (a homeobox domain and a leucine zipper domain) (Figure 4A). To determine the subcellular localization of ATHB23, the ATHB23 protein fused to GFP at the C terminus was transiently expressed in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. The ATHB23-GFP protein was clearly localized to the nucleus (Figure 4B), further implying that ATHB23 functions as a transcription factor.

ATHB23 is a positive regulator of R light-mediated hypocotyl growth

The *athb23* mutant exhibited long hypocotyl phenotype under R light, but it did not show any significant differences from the wild-type under FR or B light (Figure 3B). Since the hypocotyl growth response depends on light intensity, we examined whether the *athb23* mutant exhibited altered hypocotyl growth over a wide range of light fluences. The *athb23* mutant displayed a significant reduction in the R light response in light fluences ranging from 0.2 to 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure 5A). By contrast, the *athb23* mutant did not show any pronounced alterations in the FR and B light responses at any of the fluence rates examined (Figure 5B and C). These results indicate that ATHB23 functions as a positive regulator of the R light-mediated hypocotyl growth response in *Arabidopsis* seedlings.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

We then examined whether ATHB23 affects the end-of-day far-red (EODFR) response, which is primarily mediated by phyB. In this experiment, seedlings grown under white light for 8 hours were exposed to a pulse of saturating R (EOD-R) or FR light (EOD-FR) before being returned to a 16 hours period of darkness (see Methods for details). Compared with the EOD-R treatment, the EOD-FR treatment caused a significant increase (53.9%) in the length of wild-type (Col-0) seedlings. In contrary, the EODFR response was less pronounced in *athb23* (24.4% increase) and in *phyB-9* (12.5% increase) than in the wild-type (Col-0) (Figure 5D). These results demonstrate that the *athb23* mutation leads to a decrease in the EODFR light-dependent stimulation of hypocotyl elongation. Overall, these results suggest that ATHB23 plays important roles in the phyB-mediated hypocotyl growth response.

ATHB23 positively regulates R light-mediated cotyledon expansion

We noticed that the cotyledon sizes differed between the wild-type (Col-0) and *athb23* mutant plants. To determine whether ATHB23 regulates phytochrome-mediated cotyledon expansion, we measured the areas of cotyledons from plants grown in the presence of R, FR, or B light. As shown in Figure 6A, *athb23* plants grown in R light ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) had smaller cotyledons than wild-type (Col-0) plants, whereas the *athb23* plants had nearly wild-type-sized cotyledons when exposed to FR light ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) or B light ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). We further examined the cotyledon growth over the range of R and FR light fluences. The cotyledon area of the *athb23* seedlings was significantly smaller when the plants were grown under R light at fluences ranging from 0.2 to $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure 6B). By contrast, we did not observe drastic changes in cotyledon growth in plants grown under different FR light fluences examined (Figure 6C). These results imply that ATHB23 regulates phyB-mediated cotyledon expansion.

ATHB23 positively regulates phyB-dependent seed germination

To investigate whether ATHB23 is involved in other phyB-mediated responses, we examined the light-dependent germination frequency of the *athb23* mutant under R and FR light. We first compared the germination potential of wild-type (Col-0), *phyB-9*, and *athb23* seeds irradiated by different R light fluences (0.1 mmol m^{-2} to 3.6 mmol m^{-2}) immediately after exposure to a pulse of FR light; the seeds were subsequently maintained in the dark. Wild-type (Col-0) seeds are known to germinate when phyB is activated by R light, but the *phyB-9* mutant seeds did not germinate under the same conditions (Figure 7A). The *athb23* mutant seeds required more R light fluence for seed germination than the wild-type (Col-0). For

This article is protected by copyright. All rights reserved.

example, while all of the wild-type (Col-0) seeds germinated in response to a pulse of R light (0.3 mmol m^{-2}), only 53.9% of the *athb23* mutant seeds germinated under the same conditions. We then analyzed the germination potential of wild-type (Col-0), *phyA-211*, and *athb23* seeds under phyA-dependent germination conditions [inactivation of phyB with a pulse of FR light, followed by 48 hours of seed imbibition and induction of germination by prolonged FR light irradiation of different fluences (14.4 mmol m^{-2} to 86.4 mmol m^{-2})]. Under these conditions, 63.0% of the wild-type (Col-0) seeds germinated in response to prolonged FR light irradiation (86.4 mmol m^{-2}), whereas the *phyA-211* mutant seeds did not germinate at all (Figure 7B). We did not observe any significant differences between the germination phenotypes of wild-type (Col-0) and *athb23* mutant seeds. Taken together, these results indicate that ATHB23 is a positive regulator of phyB-mediated seed germination.

Discussion

The *in vivo* affinity purification of phyB complex proteins

Several important phytochrome-interacting proteins have previously been identified, mainly via Y2H screens using phyA or phyB as bait (Ni et al. 1998, Fankhauser et al. 1999, Choi et al. 1999, Kim et al. 2002, Ryu et al. 2005). However, the use of such heterologous expression systems may cause difficulties to isolate proteins that only interact with native chromophore-containing phytochromes, proteins that indirectly and/or transiently interact with phytochromes, and proteins that interact with phytochromes under specific environmental or developmental conditions. In an effort to identify *in vivo* phytochrome complex proteins, Phee et al. (2006) isolated 16 phytochrome-interacting proteins from transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing potato phyA and phyB. However, the complex, interconnected signaling network of the phytochromes has yet to be fully elucidated.

In this study, we isolated *in vivo* phyB complex proteins by performing affinity purification, coupled with MS analysis, in GFP-tagged phyB-overexpressing *Arabidopsis* plants. Moreover, *Arabidopsis* seedlings irradiated by R light were subjected to maximize the enrichment of proteins that interact with the biologically active Pfr form of phyB. In addition to identifying 16 putative phyB complex proteins under R light irradiation, the data presented here contain several important new findings, including the following: (1) the majority of phyB-interacting proteins identified in this study have not been previously reported; (2) four phyB-interacting proteins function as positive or negative regulators of R light-mediated hypocotyl growth responses; and (3) ATHB23, a homeobox transcription factor, is a novel component in phyB-mediated light signaling, which probably links phyB to photoresponsive

This article is protected by copyright. All rights reserved.

nuclear target genes.

Novel *Arabidopsis* phyB-interacting proteins

Among the 16 newly isolated phyB complex proteins identified by affinity purification, we examined the interaction between phyB and 12 putative phyB-interacting proteins using BiFC analysis. Six of these proteins were found to interact with phyB in *Arabidopsis* protoplasts by BiFC analysis (Figure 2 and Table S1). Six proteins that failed to interact with phyB could be false positives in the affinity purification experiment. Alternatively, perhaps we could not detect the interactions because the overexpressed YFP-fused proteins used for BiFC analysis were qualitatively and/or quantitatively different from native proteins that are expressed under the control of a cognate promoter without an additional tag sequence. Another possibility is that the interaction may require additional protein(s) or specific physiological conditions.

PIL1 is one of the most notable candidates among the six novel phyB complex proteins identified in this study. PIL1 belongs to subfamily 15 of *Arabidopsis* bHLH proteins, along with other well-known phyA- and/or phyB-interacting proteins such as PIF1/PIL5, PIF3, PIF4, PIF5/PIL6, and PIF6/PIL2 (Castillon et al. 2007). The data clearly show that PIL1 interacted with phyB (Figure 2D). By contrast, it was previously reported that the full-length PIL1 protein did not interact with phyB in an *in vitro* co-immunoprecipitation assay, whereas the active phytochrome binding motif of PIL1 bound to the Pfr form of phyB (Khanna et al. 2004). Such conflicting results about the PIL1-phyB interaction may be due to differences in experimental conditions employed in the current experiment and in the previous study, including the different protein preparations utilized (proteins translated in *Arabidopsis* protoplasts versus *in vitro* translated proteins) and the different protein constructs that were employed (YFP-fused versus GAL4 activation domain-fused). In this study, we provided experimental evidence that PIL1, known to be a positive regulator of phytochrome signaling, interacts with phyB in *Arabidopsis*.

Another intriguing feature of the novel phyB-interacting proteins identified in this study is that two of these proteins are involved in post-translational protein modification, i.e., DBP1, a putative protein phosphatase and AT1G74490, a putative protein kinase. The involvement of protein kinases and phosphatases in phytochrome signaling pathways has been well studied. For example, NDPK2, a protein kinase, functions as a positive signaling component of the phytochrome-mediated light signaling pathway. Moreover, NDPK2 interacts with the Pfr form of phytochromes, and this interaction leads to an increase in the activity of NDPK2 (Choi et al. 1999), although the downstream components of NDPK2 have

This article is protected by copyright. All rights reserved.

not been identified. PAPP5, a positive regulator of the phytochrome-mediated light signaling process, is a serine/threonine protein phosphatase. PAPP5 binds to and dephosphorylates the Pfr forms of phytochromes. In addition, PAPP5 enhances the binding of phyA to NDPK2 (Ryu et al. 2005). PAPP2C, another phosphatase in the *Arabidopsis* protein phosphatase type 2C family, also interacts with phytochromes and functions in phytochrome-mediated light signaling (Phee et al. 2008). The identification of DBP1 and AT1G74490 as novel phyB-interacting proteins strongly supports the notion that protein phosphorylation and dephosphorylation are important to phytochrome signaling. Although the detailed molecular and biochemical mechanisms by which DBP1 and AT1G74490 function in phyB signaling need to be pursued, it is possible that DBP1 and AT1G74490 dephosphorylate and phosphorylate phyB, respectively. It is also possible that DBP1 and AT1G74490 are activated by phyB and subsequently modify their substrates.

ADG1 was the most unexpected phyB-interacting protein identified in this study, due to its known function and subcellular localization. ADG1 is a small subunit of ADP glucose pyrophosphorylase (ADGase), a key regulatory enzyme in the starch biosynthetic pathway of plants, which catalyzes the synthesis of ADP glucose and pyrophosphate from glucose-1-phosphate and ATP within chloroplasts and amyloplasts (Ballicora et al. 2004). However, ADG1 does not seem to localize exclusively in chloroplasts, as ADG1 interacted with phyB in the nucleus as well as cytoplasm in our BiFC analysis (Figure 2A). Perhaps ADG1 serves as a molecular link between phytochrome signaling and starch biosynthesis. Alternatively, ADG1 may have two differential functions, i.e., an enzyme in starch biosynthesis and a phyB-mediated light signaling component, inside and outside the chloroplast, respectively. Elucidating the exact mechanisms of ADG1 in phyB signaling will be a challenging task. Overall, we identified six *in vivo* phyB-interacting proteins that have not been previously reported, and we further demonstrated that four phyB-interacting proteins function as positive or negative regulators of R light-mediated hypocotyl growth responses.

ATHB23 is an important component of the phyB signaling process

In this study, we showed that the HD transcription factor protein ATHB23 interacts with phyB in the nucleus and is involved in the phyB-mediated light signaling pathway in *Arabidopsis*, as a positive regulator of phyB signaling (Figures 2 to 7). This conclusion is based on the observation that the *athb23* mutant displayed altered phyB-mediated light responses, including longer hypocotyl (Figures 3B and 5A) and smaller cotyledons (Figures 6A and 6B) than the wild-type, under R light, as well as a reduced response to EODFR (Figure 5D).

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Furthermore, the *athb23* mutant seeds required more R light fluence for germination than wild-type seeds (Figure 7A).

Although the exact mechanism by which ATHB23 positively modulates phyB-mediated R light responses is not clear, two possible scenarios are proposed. First, ATHB23, as a transcriptional activator, may directly upregulate the expression of R light-responsive genes through the binding of ATHB23 to their promoters. Second, ATHB23, as a transcriptional repressor, may indirectly upregulate the expression of R light-responsive genes as a result of the direct downregulation of other transcription repressors. Under both scenarios, ATHB23 and PIFs (PIFs) antagonistically regulate R light-responsive genes. Simultaneously, it is also possible that ATHB23 cooperates with positive regulators of phyB-mediated light signaling to control the expression of light-inducible genes. Our future goals are to reveal the direct targets of ATHB23 and to elucidate how the mechanism by which ATHB23 differentially regulates the expression of target genes is different from that of other transcription factors.

Function of HD-ZIP proteins in light signaling

HD is a conserved 60-amino acid motif present in transcription factors found in all eukaryotes (Ariel et al. 2007). HD-containing transcription factors participate in a wide variety of developmental processes (Henriksson et al. 2005). Plant HD-containing proteins are classified into six families based on distinct features of the HD and associated domains (Chan et al. 1998). Among four HDs associated with leucine zipper (HD-ZIP) subfamilies, ATHB23 belongs to the HD-ZIP I subfamily. Several HD-ZIP proteins are involved in light signaling pathways. When ATHB1, a member of the HD-ZIP I subfamily, is overexpressed in tobacco, dark-grown transgenic tobacco seedlings display de-etiolated phenotypes, such as cotyledon expansion and an inhibition of hypocotyl elongation (Aoyama et al. 1995). In addition, ATHB16 belongs to the HD-ZIP I subfamily and functions as a component of B light signaling in hypocotyl elongation. Transgenic *Arabidopsis* seedlings with reduced or elevated expression of *ATHB16* have shorter or longer hypocotyls than wild-type seedlings in response to B light irradiation, respectively (Wang et al. 2003). ATHB2, the most extensively studied HD-ZIP protein, is a member of the HD-ZIP II subfamily. ATHB2 is rapidly and strongly induced by a low R:FR ratio, while the level of this protein is rapidly reduced in response to a return to light with a high R:FR ratio (Carabelli et al. 1996). ATHB2 also functions in the regulation of shade avoidance responses (Steindler et al. 1999). The identification of ATHB23 as a novel component in the phyB-mediated signaling pathway opens up the possibility that there are additional HD-ZIP proteins that function in light signaling pathways. Thus, further

This article is protected by copyright. All rights reserved.

studies of HD-ZIP proteins should include an investigation of whether other HD-Zip proteins are involved in light signaling pathways.

Acknowledgements – We appreciate K. H. Suh, Y. S. Park and B. H. Kim for technical assistance. This work was supported by the Research Center Program of Institute for Basic Science (IBS; CA1208), the Basic Research Program (2012R1A13004599), and the Nuclear R&D Program funded by the MEST, Republic of Korea. The work by PO Lim was supported by Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (110007-3-3-HD120), Republic of Korea.

References

- Al-Sady B, Ni W, Kircher S, Schäfer E, Quail PH (2006) Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* 23: 439–446
- Aoyama T, Dong C-H, Wu Y, Carabelli M, Sessa G, Ruberti I, Morelli G Chua N-H (1995) Ectopic expression of the Arabidopsis transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in Tobacco. *Plant Cell* 7: 1773–1785
- Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci* 12: 419–426
- Bae G, Choi G (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol* 59: 281–311
- Ballicora MA, Iglesias AA, Preiss J (2004) ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynth Res* 79: 1–24
- Bu Q, Zhu L, Huq E (2011) Multiple kinases promote light-induced degradation of PIF1. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1119–1121
- Carabelli M, Morelli G, Whitelam G, Ruberti I (1996) Twilight-zone and canopy shade induction of the Athb-2 homeobox gene in green plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3530–3535
- Castillon A, Shen H, Huq E (2007) Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* 12: 514–521
- Chan RL, Gago GM, Palena CM, Gonzalez DH (1998) Homeoboxes in plant development. *BBA-Gene Struct Expr* 1442: 1–19

This article is protected by copyright. All rights reserved.

- Choi G, Yi H, Lee J, Kwon Y-K, Soh MS, Shin B, Luka Z, Hahn T-R, Song P-S (1999) Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* 401: 610–613
- Fankhauser C, Chen M (2008) Transposing phytochrome into the nucleus. *Trends Plant Sci* 13: 596–601
- Fankhauser C, Yeh K-C, Clark J, Zhang H, Elich TD, Chory J (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 284: 1539–1541
- Fernandez J, Gharahdaghi F, Mische SM (1998) Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) gels or polyvinyl difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ionization–time of flight–mass spectrometry (MALDI–TOF–MS). *Electrophoresis* 19: 1036–1045
- Franklin KA, Quail PH (2010) Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot* 61: 11–24
- Furuya M, Schäfer E (1996) Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *Trends Plant Sci* 1: 301–307
- Henriksson E, Olsson AS, Johannesson H, Johansson H, Hanson J, Engström P, Söderman E (2005) Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiol* 139: 509–518
- Hughes J (2010) Phytochrome three-dimensional structures and functions. *Biochem Soc Trans* 38: 710
- Kami C, Hersch M, Trevisan M, Genoud T, Hiltbrunner A, Bergmann S, Fankhauser C (2012) Nuclear phytochrome A signaling promotes phototropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 566–576
- Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C (2010) Chapter Two-Light-Regulated Plant Growth and Development. *Curr Top Dev Biol* 91: 29–66
- Khanna R, Huq E, Kikis EA, Al-Sady B, Lanzatella C, Quail PH (2004) A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell* 16: 3033–3044
- Khanna R, Shen Y, Toledo-Ortiz G, Kikis EA, Johannesson H, Hwang Y-S, Quail PH (2006) Functional profiling reveals that only a small number of phytochrome-regulated early-response genes in *Arabidopsis* are necessary for optimal deetiolation. *Plant Cell* 18: 2157–2171
- Kim D-H, Kang J-G, Yang S-S, Chung K-S, Song P-S, Park C-M (2002) A phytochrome-

This article is protected by copyright. All rights reserved.

- associated protein phosphatase 2A modulates light signals in flowering time control in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 3043–3056
- Kim HJ, Oh SA, Brownfield L, Hong SH, Ryu H, Hwang I, Twell D, Nam HG (2008) Control of plant germline proliferation by SCFFBL17 degradation of cell cycle inhibitors. *Nature* 455: 1134–1137
- Lagarias JC, Rapoport H (1980) Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the Pr form of the phytochrome chromophore. *J Am Chem Soc* 102: 4821–4828
- Lariguet P, Boccalandro HE, Alonso JM, Ecker JR, Chory J, Casal JJ, Fankhauser C (2003) A growth regulatory loop that provides homeostasis to phytochrome A signaling. *Plant Cell* 15: 2966–2978
- Leivar P, Quail PH (2011) PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci* 16: 19–28
- Li J, Li G, Wang H, Deng XW (2011) Phytochrome signaling mechanisms. *The Arabidopsis Book* 9: e0148
- Montgomery BL, Lagarias JC (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* 7: 357–366
- Nagatani A (2004) Light-regulated nuclear localization of phytochromes. *Curr Opin Plant Biol* 7: 708–711
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* 95: 657–667
- Phee B-K, Kim J-I, Shin DH, Yoo J, Park K-J, Han Y-J, Kwon Y-K, Cho M-H, Jeon J-S, Bhoo SH, Hahn T-R (2008) A novel protein phosphatase indirectly regulates phytochrome-interacting factor 3 via phytochrome. *Biochem J* 415: 247–255
- Phee B-K, Shin DH, Cho J-H, Kim S-H, Kim J-I, Lee Y-H, Jeon J-S, Bhoo SH, Hahn T-R (2006) Identification of phytochrome-interacting protein candidates in *Arabidopsis thaliana* by co-immunoprecipitation coupled with MALDI-TOF MS. *Proteomics* 6: 3671–3680
- Quail PH (2000) Phytochrome-interacting factors. *Sem Cell Dev Biol* 11: 457–466
- Quail PH (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* 14: 180–188
- Rabilloud T, Kieffer S, Procaccio V, Louwagie M, Courchesne PL, Patterson SD, Martinez P,

This article is protected by copyright. All rights reserved.

- Garin J, Lunardi J (1998) Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: Toward a human mitochondrial proteome. *Electrophoresis* 19: 1006–1014
- Rockwell NC, Lagarias JC (2010) A brief history of phytochromes. *ChemPhysChem* 11: 1172–1180
- Ryu JS, Kim J-I, Kunkel T, Kim BC, Cho DS, Hong SH, Kim S-H, Fernández AP, Kim Y, Alonso JM, Ecker JR, Nagy F, Lim PO, Song P-S, Schäfer E, Nam HG (2005) Phytochrome-specific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer. *Cell* 120: 395–406
- Schäfer E, Bowler C (2002) Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Rep* 3: 1042–1048
- Schepens I, Boccalandro HE, Kami C, Casal JJ, Fankhauser C (2008). PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE4 modulates phytochrome-mediated control of hypocotyl growth orientation. *Plant Physiol* 147: 661–671
- Shen H, Moon J, Huq E (2005) PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in *Arabidopsis*. *Plant J* 44: 1023–1035
- Smith H (1995) Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annu Rev Plant Biol* 46: 289–315
- Steindler C, Matteucci A, Sessa G, Weimar T, Ohgishi M, Aoyama T, Morelli G, Ruberti I (1999) Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development* 126: 4235–4245
- Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Baurle I, Kudla J, Nagy F, Schäfer E, Harter K (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* 294: 1108–1111
- Tian Q, Nagpal P, Reed JW (2003) Regulation of *Arabidopsis* SHY2/IAA3 protein turnover. *Plant J* 36: 643–651
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH (2003) The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15: 1749–1770
- Walter M, Chaban C, Schütze K, Batistic O, Weckermann K, Näge C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40: 428–438
- Wang Y, Henriksson E, Söderman E, Henriksson KN, Sundberg E, Engström P (2003) The

This article is protected by copyright. All rights reserved.

arabidopsis homeobox gene, ATHB16, regulates leaf development and the sensitivity to photoperiod in *Arabidopsis*. *Dev Biol* 264: 228–239

Yamaguchi R, Nakamura M, Mochizuki N, Kay SA, Nagatani A (1999) Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J Cell Biol* 145: 437–445

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. BiFC analysis of interactions between phyB and putative phyB complex proteins.

Figure S1. Detection of phyB-GFP in immunoprecipitated protein fraction of PBG-5 seedlings.

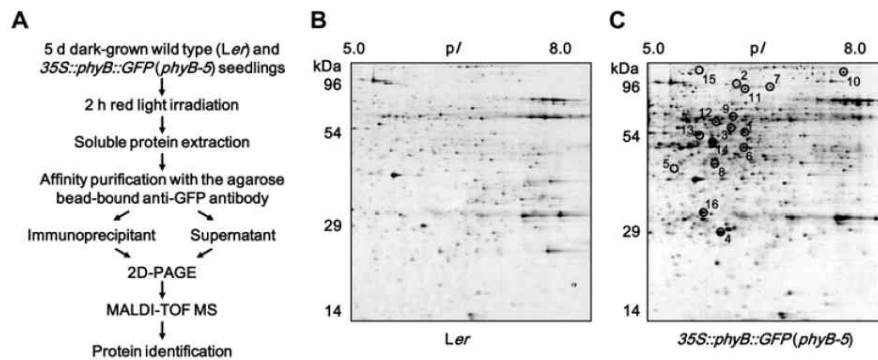
Figure S2. Hypocotyl growth responses of *Arabidopsis* mutants deficient in phyB-interacting proteins under R light condition.

Edited by A. Krieger-Liszkay

This article is protected by copyright. All rights reserved.

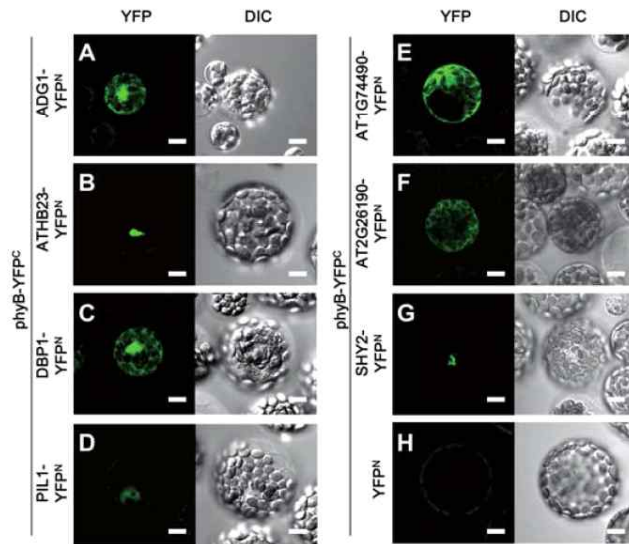
Figure legends

Figure 1. Isolation of phyB complex proteins. (A) Schematic diagram of the strategy employed in this study using MS-based analysis of affinity purified phyB complex proteins. (B and C) Two-dimensional gels of total protein extracts immunoprecipitated with anti-GFP antibodies in wild-type (*Ler*) (B) and phyB::GFP-overexpressing transgenic (PBG-5) (C) seedlings. phyB-GFP proteins were detected in immunoprecipitated fraction of PBG-5 transgenic seedlings, not in that of *Ler* seedlings, with anti-GFP antibody (Figure S1). Reproducible 2-D protein maps were obtained from two independent experiments. Circles and numbers in (C) correspond to numbers of spots listed in Table 1.



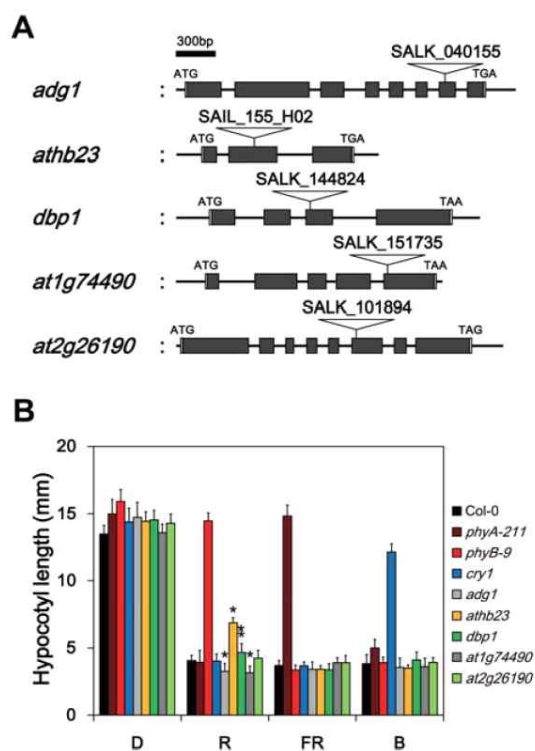
This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 2. BiFC analysis showing that YFP^N-tagged putative phyB complex proteins interact with phyB-YFP^C. phyB-YFP^C interacts with ADG1-YFP^N (A), ATHB23-YFP^N (B), DBP1-YFP^N (C), PIL1-YFP^N (D), AT1G74490-YFP^N (E), and AT2G26190-YFP^N (F) in the *Arabidopsis* protoplasts. Confocal microscopy (YFP, left) and the corresponding bright-field images (DIC, right) of protoplasts transfected with constructs encoding the indicated fusion proteins are shown. Interactions between SHY2-YFP^N and phyB-YFP^C (F) were used as a positive control for protein-protein interactions in the nuclei. No interaction between YFP^N and phyB-YFP^C (G) is shown as a negative control. Scale bars = 10 μ m.



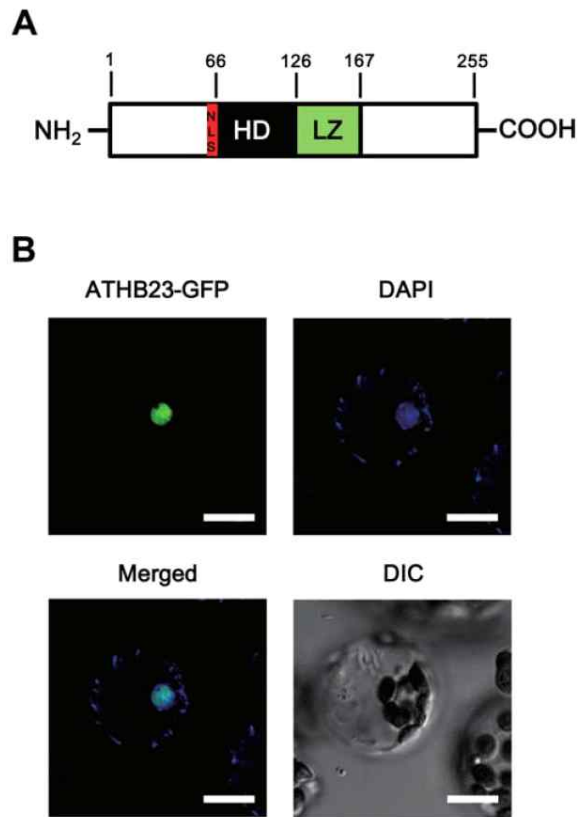
This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 3. Hypocotyl growth responses of *Arabidopsis* mutants deficient in phyB-interacting proteins. (A) Position of the T-DNA insertion within each T-DNA insertion line. Gray boxes represent exons. Thick black lines indicate the untranslated regions and introns. (B) Hypocotyl growth responses of 5-day-old wild-type (Col-0) and mutants seedlings under darkness (D), R ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), FR ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and B ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) light. The growth responses of the wild-type (Col-0), *phyA-211*, *phyB-9*, and *cry1* were included as controls. The experiment was repeated four times, and representative data are shown. Data presented are means ($n > 30$) \pm SD. Asterisks indicate significant differences between the wild-type (Col-0) and each mutant using Student's *t* test (*, $P < 0.001$; **, $P < 0.05$).



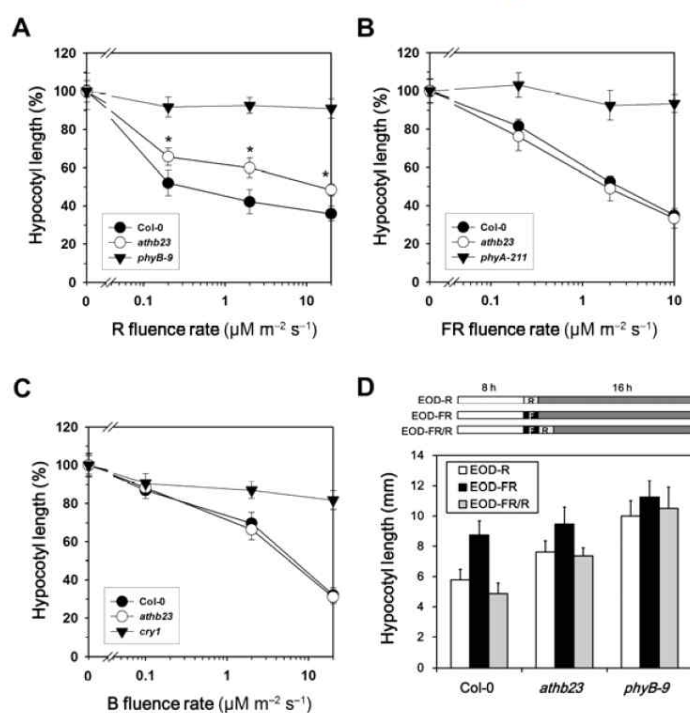
This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 4. Molecular characterization of ATHB23. (A) Schematic representation of the ATHB23 protein. NLS, nuclear localization signal; HD, homeobox domain; LZ, leucine zipper domain. (B) Confocal images showing the subcellular distribution of GFP-tagged ATHB23 fusion proteins in transiently transformed *Arabidopsis* protoplasts. The merged image of the fluorescence signal (upper left) and DAPI staining (upper right) is shown at the bottom, along with the DIC image. Scale bars represent 10 μm .



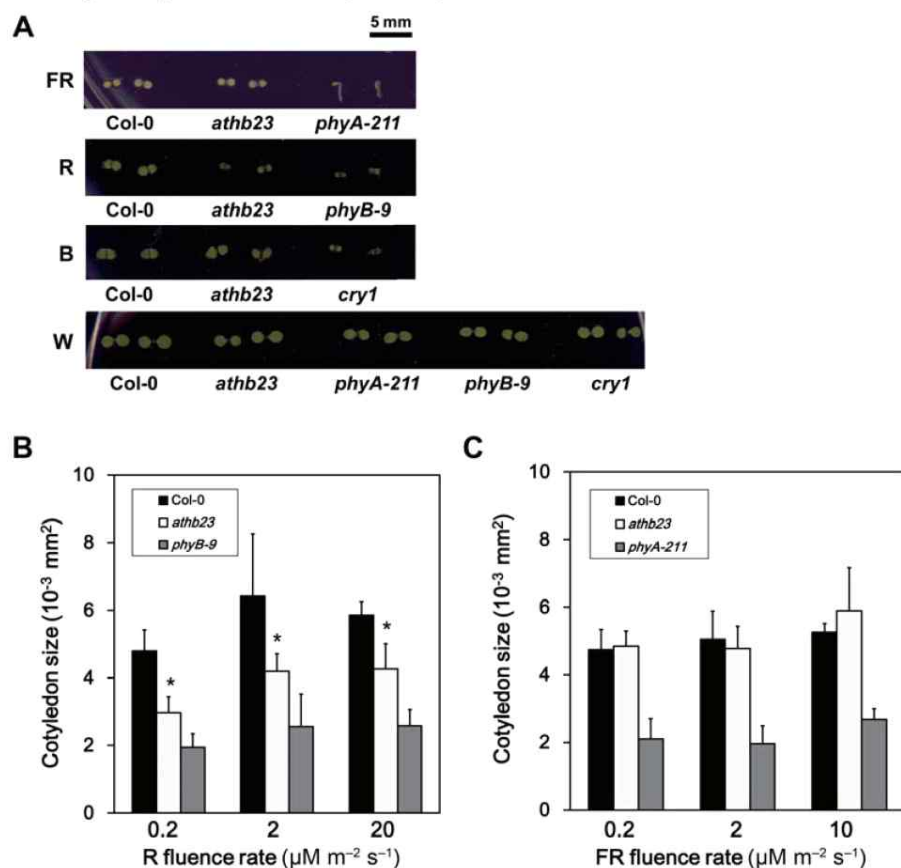
This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 5. The *athb23* mutant shows reduced hypocotyl growth responses to red light. (A–C) Hypocotyl growth response of 5-day-old wild-type (Col-0) and *athb23* seedlings under various intensities of R (A), FR (B), and B light (C). The experiment was repeated four times, and representative data are shown. Data are shown as means ($n > 30$) \pm SD. The ratio of hypocotyl length to that of dark-grown seedlings was expressed as relative percent ratio. Asterisks indicate significant differences between wild-type (Col-0) and *athb23* seedlings using Student's *t* test ($P < 0.001$). (D) Hypocotyl growth response of the *athb23* mutant to EODFR light treatment. Light irradiation conditions are indicated in the diagram above the graph. EOD-R, EOD-FR, and EOD-FR/R denote R, FR, and FR/R light pulse treatment, respectively. The hypocotyl length under each condition is denoted as a value relative to that of wild-type (Col-0) plants with no EOD light treatment. This experiment was repeated four times, and representative data are shown. Data presented are means ($n > 30$) \pm SD.



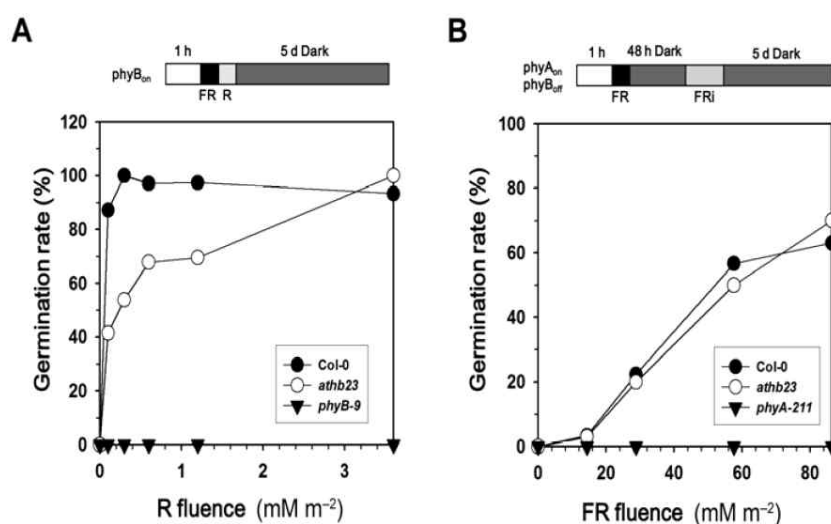
This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 6. The *athb23* mutant is defective in phyB-mediated cotyledon expansion. (A) Photographs of 5-day-old wild-type (Col-0) and *athb23* seedlings grown under FR (10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), R (20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), B (20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and white (W, 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) light. (B, C) Cotyledon areas of wild-type (Col-0) and *athb23* seedlings measured 5 days after germination and grown under various R (B) or FR (C) light fluence rates. The experiment was repeated four times, and representative data are shown. Data presented are means ($n > 15$) \pm SD. Asterisks indicate significant differences between wild-type (Col-0) and *athb23* mutant seedlings using Student's *t* test ($P < 0.05$).



This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 7. The *athb23* mutant is defective in phyB-dependent seed germination. (A) Germination percentages of wild-type (*Col-0*) and *athb23* mutant seed under phyB-dependent seed germination conditions. The diagram above the graph depicts the light irradiation conditions for the experiment. Germination percentage is shown at various R light fluences (0.1 to 3.6 mmol m^{-2}) that were given immediately after 5 min of FR light exposure ($3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). This experiment was repeated three times, and representative data are shown. Data presented are means ($n > 100$) \pm SD. phyB_{on} indicates the light condition in which phyB is activated by FR followed by R. (B) Germination percentages of wild-type (*Col-0*) and *athb23* mutant seeds under phyA-dependent seed germination conditions. Seeds were imbibed for 48 hours and then irradiated by various fluences of FR light (denoted as FRi, 14.4 to 86.4 mmol m^{-2}). This experiment was repeated three times, and representative data are shown. Data presented are means ($n > 100$) \pm SD. phyB_{off} and phyA_{on} indicates a light condition that inactivates phyB by FR and activates phyA by FR irradiation, respectively.



This article is protected by copyright. All rights reserved.

Table 1. Putative phyB complex proteins identified by MALDI-TOF/MS analysis in phyB-GFP-overexpressing transgenic *Arabidopsis* seedlings.

Spot no.	Accession no.	AGI code	Protein name	Theoretical kDa/pI	Experimental kDa/pI	No. of peptide	%
1	18401055	AT2G26190	Calmodulin-binding family protein	60.5/7.2	54.3/6.0	8	8
2	9759324	AT5G60600	CHLOROPLAST BIOGENESIS 4 (CLB4)	82.3/6.4	86.0/5.9	13	25
3	15238933	AT5G48300	ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1 (ADG1)	56.7/6.5	57.0/5.8	9	13
4	18396130	AT1G26960	HOMEBOX PROTEIN 23 (ATHB23)	29.7/4.8	27.3/5.6	8	11
5	30699019	AT1G74490	Protein kinase superfamily protein	44.6/9.0	41.7/5.2	9	16
6	15224766	AT2G25620	DNA-BINDING PROTEIN PHOSPHATASE 1 (DBP1)	42.7/5.3	47.3/6.0	8	11
7	30680478	AT2G45290	Transketolase	80.0/6.6	80.6/6.3	17	9
8	21593379	AT2G34590	Transketolase family protein	44.0/5.6	42.6/5.6	7	6
9	3242075	AT4G13940	S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEIN HYDROLASE 1	53.4/5.8	62.0/5.8	12	15
10	25513556	AT1G33790	Jacalin lectin family protein	81.8/6.6	101.6/7.4	22	24
11	15237407	AT5G46240	Potassium channel protein	78.3/7.8	80.1/5.9	5	7
12	15225949	AT2G14510	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	97.6/7.5	59.6/5.6	8	7
13	10178171	AT5G65090	BRISTLED 1 (BST1)	60.0/7.9	53.8/5.4	12	10
14	23397095	AT4G20360	RAB GTPase homolog E1B	51.6/6.1	51.1/5.5	19	15
15	18417676	AT5G15450	CASEIN LYTIC PROTEINASE B3	108.9/6.1	105.8/5.4	22	11
16	22535492	AT2G46970	PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3-LIKE 1 (PIL1)	46.6/9.4	32.1/5.4	14	19

This article is protected by copyright. All rights reserved.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.