

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000151-01

식물 수명연장 우량 국화 형질전환체 개발
(Development of transgenic chrysanthemum extending plant longevity)

상명대학교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물 수명연장 우량 국화 형질전환체 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 7월 29일

주관연구기관명 : 상명대학교

주관연구책임자 : 형 남 인

세부연구책임자 : 형 남 인

연 구 원 : 김 지 현

연 구 원 : 권 영 주

연 구 원 : 김 미 영

연 구 원 : 유 민 영

연 구 원 : 윤 여 진

연 구 원 : 정 지 아

연 구 원 : 곽 미 영

협동연구기관명 : 제노마인(주)

협동연구책임자 : 이 동 희

요 약 문

I. 제 목

식물 수명연장 우량 국화 형질전환체 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

연구개발의 최종 목표는 식물의 수명연장에 대한 기능이 검증된 유전자를 이용하여 국화의 형질전환에 적합한 벡터를 제작하고 이를 *Agrobacterium* 매개 형질전환 기법으로 국화 식물로 도입함으로써 국화 식물의 수명이 연장된 형질전환체를 개발하는데 있다. 이후 개발된 국화 형질전환체는 절화 수명연장 우량 신품종 개발에 적용할 것이다.

이를 위하여 본 연구팀은

- 1) 모델식물인 *Arabidopsis*에서 유용성이 검증된 유전자 4종을 기 확립된 형질전환 기술을 이용하여 국화에 도입하고
- 2) 또한 유용 유전자 3종을 새로이 발굴·분리하여 국화에 도입하고자 한다 (총 7종의 국화 형질전환체 개발).
- 3) 개발된 국화 형질전환체 4종 이상을 대상으로 식물 수명연장 등에 대한 기능분석을 실시하고 1종 이상의 국화 형질전환체를 개발하여 차후 절화 수명연장 우량 신품종 개발에 적용하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 기능성 유전체 연구를 통한 수명연장 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검증 (7종)
 - 기 확보된 유용 유전자의 기능 재검정 (4종)
 - 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 변이체 pool로부터 수명연장 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검증 (3종)
 - 변이체 표현형 분석 및 분자·생리·생화학적 기능 조사
 - 유용 유전자에 대한 loss-of-function, gain-of function 애기장대 변이체 표현형 및 기능 분석
- 2) 유용 유전자가 도입된 국화 형질전환체 개발 (7건)
 - 국내 주요 국화 품종의 형질전환 효율 증진
 - 유용 유전자 도입 국화 형질전환체 개발 (7건)
 - 유용 유전자의 국화로의 도입을 위한 vector construct 제작
 - 국화 형질전환 실시 및 개발
 - 형질전환 국화의 1차 기능 분석: 유전자 도입 및 발현 분석

3) 개발된 국화 형질전환체의 기능분석 (4건 이상)

- 기능 분석을 통한 우량 형질전환체 개발 (1건 이상)
 - 형질전환 국화의 1차 표현형 분석
 - 형질전환 국화의 2차 기능 분석 (생리·생화학적 분석, 최종 4건 이상)
 - 형질전환 국화의 온실 검정

4) 특허 및 논문 등 지적 소유권 확보 (6건)

- 특허출원/등록 3건
- 논문 3건 (SCI 학술지 2건, 기타 1건)

IV. 연구개발결과

식물의 수명연장에 대한 기능이 검정된 유전자를 개발하고, *Agrobacterium* 매개 형질전환 기법으로 국화로 도입함으로써 식물의 수명이 연장된 형질전환체를 개발하고자 실험을 수행하였다.

협동기관인 제노마인(주)에서 확보하고 있는 유용 유전자 중 수명 연장, 생산성 증대 혹은 왜화에 대한 표현형적 특징을 가지는 *ORE12*, *ORE15*, *ATHG1* 그리고 *AtGA2ox4*를 고부가 우량 국화 형질전환체 개발에 적용하였으며, 또한 기능성 유전체 연구 등을 통하여 발굴된 유용 유전자 4종을 고부가 우량 국화 형질전환체 개발에 적용하였다.

또한, 신규 유전자 확보를 위하여 Advanced RAM approach를 통한 노화관련 변이체로부터 *ATPG3*, *ATPG6*, *ATPG7* 그리고 *ATPG10* 유전자 4종을 발굴하였으며, 기능분석을 통하여 이들 유전자 모두 수명 연장과 생산성 증대에 대한 표현형적 특징을 제공함을 확인할 수 있었다. 이 유전자들은 모두 AT-hook domain을 가지고 있었다. 기 발굴한 *ORE12*, *ORE15*, *ATHG1*, *AtGA2ox4* 유전자와 신규 발굴한 4종의 유전자들의 기능 분석에서 생산성 증대 또는 노화 지연의 표현형적 특징을 확인하였다.

그리고 기 확보 유전자 4종과 유용 유전자 4종을 국화로 도입하기 위한 vector를 구축하였으며, *Agrobacterium* 매개 형질전환 방법으로 국화에 도입하여 8종의 형질전환 식물체를 생산하였다. 이후 형질전환체의 분자생물학적 분석, 표현형 분석 및 기능 분석을 통하여 5종의 우량 형질전환체를 선발하였다.

*ORE15*와 *ATPG4* 유전자 도입 국화 형질전환 선발 계통은 초장과 생체중 등의 생장이 대조구에 비해 전반적으로 증가한 것으로 나타났으나, 절화 수명 연장 효과는 인정되지 않았다. *ORE15*와 *ATPG4* 도입 국화 형질전환체는 생산량 증대 표현형을 나타내어 앞으로 고생산성 농업형질을 가진 이벤트로의 육성이 가능한 우수 형질전환 계통으로 판단된다. 또한 *ATPG7*과 *ATPG8* 유전자 도입 국화 형질전환 선발 계통은 애기장대 과발현체와 유사한 표현형을 나타내는 성장량 증대 및 수명연장 효과가 있는 것으로 나타나 고생산성 및 수명연장 농업형질 이벤트로의 육성이 가능한 우수 형질전환 계통이라고 생각된다. *AtGA2ox4* 도입 국화 형질전환 선발 계통은 애기장대와 유사한 왜화현상이 나타났지만 수명연장 효과는 인정되지 않았다. 최종적으로 본 연구팀은 식물 수명연장 우량 국화 형질전환체 개발을 위하여, 상기 5종의 우량 국화 형질전환체 중 *ORE15*, *ATPG4*, *ATPG7* 그리고 *ATPG8* 도입 형질전환체에서 고생산성 및 수

명연장 농업형질을 가지는 우수 형질전환 계통을 선발하였다.

결론적으로 *Arabidopsis*에서 식물의 수명연장 효과를 나타내는 기확보 유전자 4종의 기능을 분석하였고, 신규 유전자 4종을 발굴하고 기능을 검증하여 수명 연장과 생산성 증대 등의 효과를 확인하였다. 이어서 기확보 유전자 4종과 유용 유전자 4종을 *Agrobacterium* 매개 형질전환 기법으로 국화 식물로 도입하여 형질전환 식물체를 생산하였고 기능분석을 실시하였으며, 최종적으로 수명연장 및 고생장성 효과를 나타낸 4종의 우량 형질전환 계통을 확보하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과 목표 및 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종 명칭 등록	품종 생산 수 입 판 매 신 고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표									
	달성	1								
2차년도	목표	1						1		
	달성	3								
3차년도	목표	2					2			
	달성	2					2 (투고예정)	1 (투고예정)		
계	목표	3					2	1		
	달성	6								

2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
투고예정	국화 ‘백마’의 잎 절편으로부터 신초 기관형성을 통한 식물체 재생 체계 확립	김지현	형남인	김윤아, 유민영	농업생명 과학연구	-	국내	-
투고예정	Plant growth enhanced in <i>ORE15</i> transgenic chrysanthemum	김지현	형남인	유민영	Plant Cell Tissue & Organ Culture	-	국외	○
투고예정	Characterization of transgenic chrysanthemum harboring <i>AtGA2ox4</i> gene	김지현	형남인	유민영	In Vitro - Plant	-	국외	○

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	10-2011-0038929					
2012년 2월	식물의 ^{b)}	제노마인(주)	대한민국	10-2012-0016951					
2012년 4월	식물의 ^{c)}	제노마인(주)	대한민국	10-2012-0039093					
2012년 4월	ATPG7 ^{d)}	제노마인(주)	국제(PCT)	PCT/KR2012/002966					
2013년 6월	식물의 ^{e)}	제노마인(주)	대한민국	10-2013-0075018					
2013년 6월	식물의 ^{f)}	제노마인(주)	대한민국	10-2013-0075022					

^{a)}식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{b)}식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{c)}식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{d)}ATPG7 Protein Providing Yield Increase and Delaying Senescence and Stress Tolerance of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use

^{e)}식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG6 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{f)}식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG10 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

4. 연구성과 활용 계획

식물 형질전환 시장은 고도의 기술과 특허로 인한 지적소유권에 대한 독점으로 고부가의 산업적 가치를 지니고 있으며, 국내에서는 2010년을 전후로 형질전환 작물의 품종화 내지는 상업화가 가능하다고 추정되므로 유용 유전자를 통한 우량 형질전환체의 개발은 미래 농업 생명공학에 있어 고부가 창출과 국가 경쟁력을 제공할 것이다.

본 과제 of 목표는 수명연장 관련 유용 유전자 삽입이 가능한 국화 형질전환 기법을 적용하여 고품질, 그리고 고생장성 우량 신품종 개발에 있으며, 세부적 산업화 방안으로는 수명연장/생산성 증대의 표현형적 특징을 가지는 유용 유전자와 이를 통한 고품질, 그리고 고생장성 우량 국화 형질전환체를 개발하여 우량 신품종에 대한 지적소유권을 확보하는 것이다.

이러한 연구 산물의 산업화는 2 가지 산업화 방안으로 진행될 것이다. 첫 번째는 단기 전략으로 유전자 및 형질전환체에 대한 지적소유권의 기술이전이다. 기술이전 대상은 국내 종자 회사 등이 우선될 것이며, 이 후 국외로 BASF, Monsanto, Syngenta 등이 될 것이다. 주관기관인 제노마인(주)는 다국적 기업과 유용 유전자에 대한 기술이전을 실시하여 유전자 기술사업화에 대한 노하우를 가지고 있는 상태이다. 이러한 기술사업화에 대한 선례는 본 사업에서 확보하는 우량 형질의 유전자 혹은 형질전환체에 대한 기술이전의 가능성을 보다 높여줄 것으로 판단된다.

산업화 방안의 두 번째는 확보한 유용 유전자 및 형질전환체에 대한 공동 사업화를 통해서 우량 형질전환체를 자체 사업화 하는 것이다. 대상은 화훼 육종 전문 국내 기관, 연구소 혹은 기업이 될 것이며, 형태는 개발한 우량 형질전환체에 대하여 대상 기관과의 공동연구를 통한 우량 신품종 개발과 이를 통한 산업화이다. 이러한 산업화 방안은 보다 장기간의 연구 기간을 요하지만 최종적으로 산업화가 가능한 우량 품종 개발을 통한 산업화라는 점에서 보다 고부가 가치 창출이 가능하고, 국내 품종 적용이란 측면에서 개발된 신품종은 국내 재배는 물론 수출에 적극 활용함으로써 농가의 소득 증대에 기여할 것이다.

고품질, 그리고 고생장성 우량 국화 품종의 사업화에 있어서 사업 타당성 분석 결과 고부가 가치 창출이 가능하며, 국가의 농업생명공학의 경쟁력을 제공한다는 점에서 매우 매력적인 사업이 될 것이다. 사업 타당성 분석은 다음과 같다.

① 고품질 농업형질을 가진 국화 형질전환체에 대한 사업 타당성 분석

고품질 & 고생산성 농업형질을 가진 국화 형질전환체에 대한 사업화 타당성 (I)

국화 스탠다드 신종 개발 로열티 수입

전세계 국화 스탠다드 품종 시장 : 1,525백만본, 7,730백만\$
 일본 985백만본, 573백만\$, 0.6\$/본 (60엔/본) Source: MAFF (Japan), 2009
 한국 240백만본, 100백만\$, 0.4\$/본 (433원/본) Source: MAFRA (Korea), 2011
 기타(중국, 대만 등) 300백만본, 100백만\$ (추정) Source: Kim (2011)

국화의 국내 로열티
 본당 15-33원(평균 20원) = 0.02\$ Source: Economy Chosun (Korea), 2010

로열티 대상 본수 150백만본일 경우(전세계 시장의 약10%)
 년 로열티: 0.02\$ X 150백만본 X year = 3백만\$/year
 총 로열티: 3백만\$ X 20 = 60백만\$ (품종 로열티 20년 기준)

개발된 형질전환 신종 국화가 전세계 시장의 약 10% 확보
 20년간 매년 3백만\$, 20년간 총 60백만\$ 로열티 확보

GENOMINE 010-2800-0001

② 고품질/고생산성 농업형질을 가진 국화 형질전환체에 대한 사업 타당성 분석

고품질 & 고생산성 농업형질을 가진 국화 형질전환체에 대한 사업화 타당성 (II)

전세계 국화 스탠다드 품종 시장 : 1,525백만본, 7,730백만\$
 일본 985백만본, 573백만\$, 0.6\$/본 (60엔/본) Source: MAFF (Japan), 2009
 한국 240백만본, 100백만\$, 0.4\$/본 (433원/본) Source: MAFRA (Korea), 2011
 기타(중국, 대만 등) 300백만본, 100백만\$ (추정) Source: Kim (2011)

국화 스탠다드 기존 품종의 형질전환을 통한 고생산성 효과
 년중 3기작에서 4기작으로의 전환을 통한 생산량 증가

국화 4기작 가능 고생산성 스탠다드 품종의 가치
 단위면적당 생산량의 증가: 현재 생산량의 약 30% 증수 효과

현재 생산량이 150백만본일 경우(전세계 시장의 약10%)
 생산량 증가분 : 150백만본/year X 30% = 45백만본/year
 생산 가치 증가분 : 45백만본/year X 0.4\$ = 18백만\$/year
 국화 수익율: 18.5% (2008년 기준) Source: Kim (2011)

순이익: (150백만본+45백만본)/year/ X 0.4\$/본 X 18.5% = 14.43백만\$/year

개발된 형질전환 신종 국화가 전세계 시장의 약 10% 확보
 순이익 14.43백만\$/year 확보 가능

GENOMINE 010-2800-0001

SUMMARY

The research was conducted to develop chrysanthemum transgenic plants with extended longevity using *Agrobacterium*-mediated transformation

In this study, we introduced four genes (*ORE12*, *ORE15*, *ATHG1* and *AtGA2ox4*) into chrysanthemum to produce transgenic lines. The genes had been previously identified as key regulatory genes conferring longevity extension and productivity increase. We have isolated 4 novel genes (*ATPG3*, *ATPG6*, *ATPG7* and *ATPG10*) through the screening of Advanced RAM mutant pools and identified that phenotypic characteristics such as leaf longevity extension and productivity increase conferred by the gene. Interestingly, all of genes contain AT-hook DNA binding motif. Degree of longevity extension was found to be correlated with expression level of AT-hook family genes. 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.

We have introduced 8 useful genes isolated from *Arabidopsis* into chrysanthemum through *Agrobacterium*-mediated transformation and generated transgenic plants. Through the functional analyses of transgenic plants we selected 5 transgenic lines with good quality. Compared with the control plant, transgenic lines containing *ORE15* or *ATPG4* gene showed increases in plant height and fresh weight but not in longevity extension. *ATPG7* and *ATPG8* transgenic lines exhibited a desirable traits for the biomass increase and longevity extension in cut flower. However, transgenic lines harboring *AtGA2ox4* showed not any longevity extension but dwarfism as similarly shown in *Arabidopsis*. Through this research we selected elite lines with high productivity and longevity extension in *ORE15*, *ATPG4*, *ATPG7* and *ATPG8* transgenic plants.

In conclusion, we provided the information about the previously isolated 4 genes and the 4 newly isolated genes in *Arabidopsis*. Then we introduced the 8 genes into chrysanthemum and produced transgenic plants. Through functional analysis we selected 5 elite transgenic lines with agronomically important traits such as longevity extension and high productivity.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	11
Chapter 2. Current R&D status in Korea and abroad	17
Chapter 3. Contents and results of the project	26
Chapter 4. Achievement and contributions	112
Chapter 5. Products and employment planning	116
Chapter 6. The R&D informations collected	120
during the project	
Chapter 7. References	124
[Appendix 1] Patent (10-2012-0016951)	129
[Appendix 2] Patent (10-2013-0075018)	146
[Appendix 3] Patent (PCT/KR2012/002966)	164
[Appendix 4] Patent (10-2013-0075022)	182

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	11
제 1 절. 경제·산업적 중요성 및 필요성	11
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	17
제 1 절. 국내외 기술개발 현황	17
제 2 절. 국내외 특허 현황	18
제 3 절. 선행연구 결과	19
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	26
제 1 절. 연구개발수행 내용 및 방법	26
제 2 절. 수명연장 관련 유용 유전자 발굴	34
제 3 절. 국화 우량 품종의 식물체 재생 및 형질전환 시스템 확립	79
제 4 절. 식물 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체 육성 ...	83
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	112
제 1 절. 목표달성도	112
제 2 절. 관련분야에의 기여도	115
제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획	116
제 1 절. 연구개발 성과	116
제 2 절. 성과활용 계획	119
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보	120
제 7 장. 참고문헌	124
[부록 1] 특허출원 (10-2012-0016951)	129
[부록 2] 특허출원 (10-2013-0075018)	146
[부록 3] 특허출원 (PCT/KR2012/002966)	164
[부록 4] 특허출원 (10-2013-0075022)	182

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발대상 기술의 경제적 · 산업적 중요성 및 필요성

1. 배경

세계의 화훼산업은 WTO 협상과 관련한 세계 무역 자유화로 인하여 급속한 변화를 맞이하고 있다. 세계적으로 화훼 소비량은 증가할 것으로 추정되며, 동시에 화훼 생산국간의 경쟁도 치열해지고 있다. 화훼 산업가운데 절화와 분화의 재배는 전 세계에 걸쳐 이루어지고 있는데, 절화 재배면적과 생산 가치는 증가하는 추세를 보이고 있으며 17개 주요 화훼 생산국들의 재배 면적은 현재 약 60,000 ha로 추정되고 있다. 또한 절화의 세계 시장에서의 소비는 매년 6%의 비율로 증가하고 있다. 1985년 총 소비액은 약 125억 달러였으며 1990년의 소비액은 약 250억 달러까지 상승하였고, 이후 지속적인 성장이 이루어졌다. 1995년까지 총 세계 시장의 가치는 약 300억 달러였고, 앞으로 절화의 소비는 450억 달러 이상으로 증가할 것으로 예상된다. 국제 관계에서 절화의 소비는 유럽, 북미와 아시아 세 지역으로 집중된다. 가장 높은 비율의 성장이 기대되는 곳이 동유럽과 미국이다. 서유럽 시장은 포화 징조를 보이기 시작했고, 그 결과로 세계 시장에서 차지했던 절화 소비량이 감소하고 있다. 아시아에서는 증가하는 자국 내 수요와 일본의 고품질 시장이 주요 시장이 될 것이다.

화훼 작물가운데 국화는 세계 3대 절화 작물의 하나인 주요 작물의 위치를 확보하고 있는데, 전 세계 재배 현황은 그림 1과 같다. 주요 국가를 보면 네덜란드가 15억본 절화를 생산하여 최대 생산 국가이며, 콜롬비아가 9억본의 절화를 생산하여 그 뒤를 잇고 있다.



그림 1. 국화의 2006년 전세계 생산량 (Berkum, 2007)

(<http://blog.maripositas.org/horticulture/world-chrysanthemum-production>)

한편, 국내 화훼 산업에 있어서 절화의 생산동향을 보면 재배면적 기준으로 국화는 장미와 함께 대표적인 작목으로서 전체 절화 재배면적의 약 30%를 차지하고 있다(그림 2).

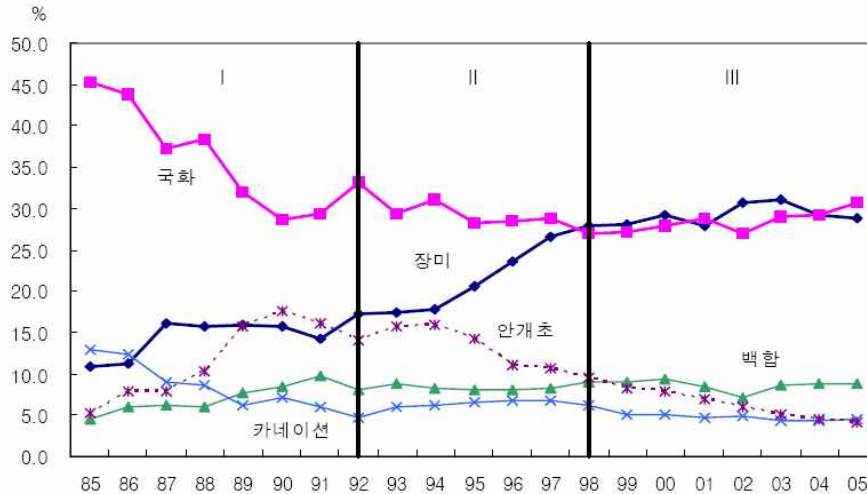


그림 2. 주요 절화류 작목별 재배면적 비중 변화 (농림부 화훼재배현황 참조)

우리나라에서 국화는 화훼류 단일 품목으로는 가장 많은 재배면적을 가지고 있다. 상업용으로 이용되는 국내 국화재배는 대부분 절화용으로서 2008년 재배면적이 723 ha로 95년 이후 다른 작물들에 비해 재배 면적이 소폭 증가하였다. 국화는 2007년 기준으로 911억 원의 생산액을 기록한 바 있다.

표 1. 우리나라 절화의 전체 및 국화 재배현황 (단위 : ha, 백,만본, 백만원)

구분	'07			'08			증감율(%)		
	면적	판매량	판매금액	면적	판매량	판매금액	면적	판매량	판매금액
절화 전체	2,370	1,292	374,494	2,268	1,240	354,801	△4.3	△4.0	△5.3
국화	736	433	91,157	723	360	82,811	△1.8	△16.9	△9.2

(자료) 농림부 화훼재배현황

국내의 화훼수출은 1990년대 시설현대화 지원으로 고품질 수출품 생산기반을 마련한 이후 꾸준한 증가 추세를 나타내고 있다. 그러나 수출 초창기에는 수입이 수출을 초과하여 만성적인 무역수지 적자 품목으로 인식되어 왔다가, IMF 이후 환율 상승에 의한 수출경쟁력 향상으로 수입은 감소한 반면 수출은 크게 증가되었다. 그 결과, 1999년에 처음으로 무역수지 흑자를 기록하였으며, 2008년도 우리나라 화훼류 수출실적은 7,600백만 불로서 10여년 사이에 약 700%나 증가하였다. 주요 수출 대상국은 일본, 중국, 네덜란드 등으로서, 현재 이들 3개국에 우리나라 전체 수출의 90% 이상을 차지하고 있다.

화훼류 수출은 1980년대 중반 절지, 절엽 중심에서 1988년 이후에는 묘목류, 1998년부터 절화류 수출이 주류를 이루고 있다. 우리나라의 수출은 주로 일본을 대상으로 하는데, 최대 시장인 일본 수출은 국내 재배기술 향상에 따른 수출품 품질 향상 및 현지 인지도 제고로 매년 수출이 급격히 증가하는 추세이다. 대일 화훼수출은 1997년 227만 불에서 2008년도 3,967만 불로 수출 급성장을 가져왔으며, 이것은 전체 화훼 수출의 50%를 상회한다.

최근 국내에서 개발된 국화 신품종인 백마 등의 대일 수출이 증가하는 추세를 보이고 있는 여

건으로 보아 앞으로 지속적인 수출확대가 예상된다. 우리나라는 수출의욕이 매우 높지만 앞으로 인도, 중국, 베트남 등 노임이 낮고, 좋은 기후조건의 나라들과 경쟁하기 위해서는 고도의 첨단재배기술 및 식물특허제도 도입, 신유통기술 확립, 육종기술력의 증가 등 적극적인 대책이 요청된다 하겠다.

한편 화훼류 일본 수출은 물량이 증가함에 따라 항공수송에서 해상수송으로 옮겨가는 추세를 보이고 있다. 수송방식의 변화로 인하여 길어진 운송기간 동안 절화의 고품질을 유지할 수 있는 기술이 요청되고 있는데, 새로운 수송 시스템의 개발과 함께 절화의 신선도를 장기간 유지할 수 있는 처리제의 개발 및 장기간의 절화 수명을 가진 신품종 개발 등에 관심이 집중되고 있다.

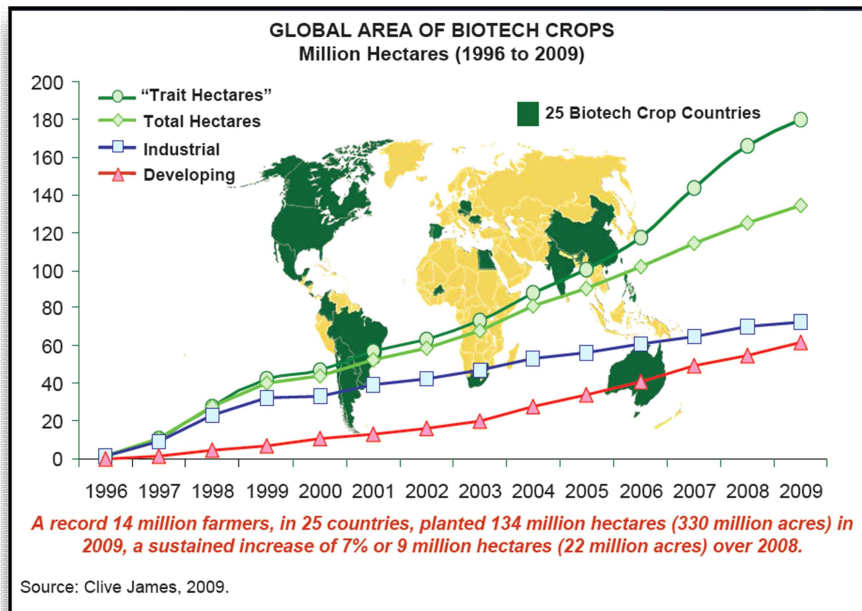


그림 3. 전 세계 biotech crop 재배 면적 (ISAAA, 2010)

1961년 유럽 국가들이 중심이 되어 창설된 국제식물신품종보호동맹(UPOV)에 우리나라도 2002년에 가입하면서 식물신품종보호가 의무화되어 전 세계적인 품종보호체제로 들어서게 되었으나, 국내 육성 주요 화훼류의 품종 수는 국내 유통 품종의 30%에도 미치지 못하고 있다.

국화 역시 국내 재배품종의 다수가 외국의 도입품종으로 로열티 지불액이 32.4억에 이른다(2008). 국내에서 111개 품종의 국화가 개발되었으나(1991~2007년) 로열티 지불액은 점진적으로 증가되고 있어, 실제 농가에서 요구하는 특성을 가진 국산 품종의 육성 및 보급이 시급한 상황이다. 그러나 국화의 전통적인 육종 방법으로는 점점 더 다양해지는 소비자의 요구도를 반영할 수 있는 목표형질을 얻는데 한계가 있다. 이를 극복하기 위하여 생명공학기법을 이용한 화훼류 유전자원 및 신품종 개발의 필요성이 증대되고 있다.

생명공학기법을 이용한 신품종 개발에 있어서, 국화는 영양번식성 작물로서 증식이 용이하고 여러 세대에 걸친 형질고정 과정이 필요 없으며 개화소요기간이 짧으므로 타 작물에 비해 조기에 품종 육성을 통한 실용화가 가능하다는 장점을 가지고 있다. 최근 국내에도 유전자 변형 작물의 개발 성과가 다수 보고되고 있으나, 먹을거리에 대한 국민의 거부감이 실용화에는 걸림

들로 작용하고 있는 상황이다. 그러나 유전자 변형 화훼류 작물은 관상용으로 사용되어 환경 및 소비자 단체의 저항을 최소화할 수 있는 장점을 가지고 있어 상용화를 위한 유전자 변형 작물로 개발하기에 최적의 작물이라고 할 수 있다.

이러한 유전자 변형 작물 산업화의 기술적 요소는 유전자 발굴, 유전자 기능분석, 작물 형질전환, 이벤트 육성 등의 기술이다. 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 기능분석 요소에 대한 핵심 기술로 적용되고 있다. 식물 기능성 유전체 연구(functional genomics)는 식물에 내재하는 유전자의 발현을 인위적으로 제한하여 신 기능성 형질전환 식물을 창제하고, 이 기술을 대량으로 적용하여 원하는 형질의 식물체를 선발하거나, 신품종 개발 산업 등에 적용되고 있는 기반 기술이며, 식물체에서 다량의 유용 유전자를 발굴하기 위하여 T-DNA tagging 기술, activation tagging 기술, promoter trap 기술, 그리고 RAM approach 등과 같은 기능성 유전체 연구를 많은 기관에서 수행하고 있는 중이다. 상기의 특징에 따라 기능성 유전체 연구는 신기능성 유전자의 대량 분리를 위한 새롭고 효율적인 방법을 제공하는 기술로서 식물생명공학 산업 전반에 공헌할 수 있는 기반 기술이다. 본 연구팀 중 협동 기관인 제노마인(주)은 activation tagging, promoter trap 및 advanced RAM approach 기법 등과 같은 다양한 기능성 유전체 연구를 수행하고 있으며, 이와 같은 기능성 유전체 연구를 통하여 다양한 형질을 지닌 우량 작물 개발에 기여할 수 있는 유용 유전자를 다량 확보하고 있다. 그 중 하나를 예를 들어 보면, 애기장대의 전사·해독 과정 혹은 대사과정 상위에서 관여하는 노화관련 유전자인 *ORE15*와 *ATHG1* 이 삽입된 변이체는 잎의 노화 지연, organ size 증가, 그리고 일부 스트레스에 대한 저항성 증가 등의 특징적 형질을 지니는 것으로 확인하였으며, 이와 같은 유용 유전자의 국화 적용은 우량 품종 개발에 있어서 노화 조절을 통한 수명 연장이라는 표현 형질 발현의 측면에서 기여도가 높을 것이라고 추측된다.

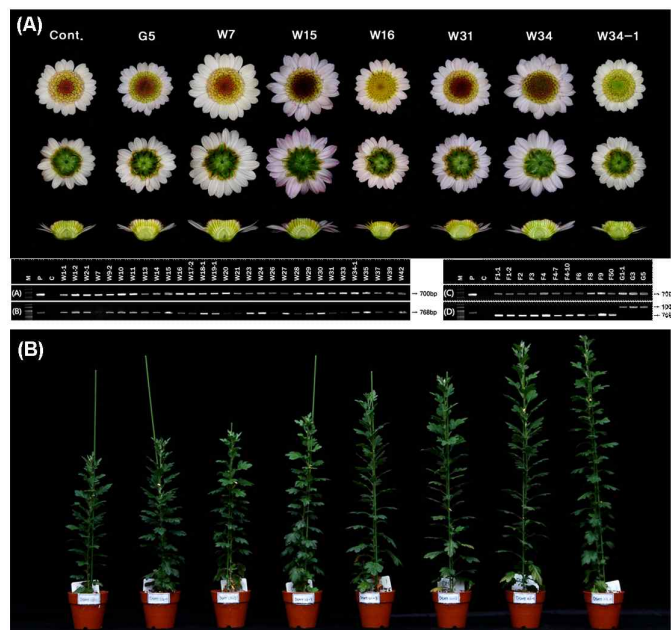


그림 4. 국화 개화특성 개량 형질전환체의 유전자 도입 확인 및 표현형 검정

유전자 변형 작물 산업화의 두 번째 요소는 작물 형질전환 및 이벤트 육성 기술이다. 주관기관인 상명대학교 형남인 교수 연구팀은 국화 품종에 대한 고효율 형질전환 시스템을 확립하였으며, 이를 통하여 화색 변이 및 개체 크기 신장에 대한 우량 국화 품종 개발을 성공하였다(그림 4). 이러한 국화 고효율 형질전환 시스템 확립 및 이벤트 육성 기술은 우량 국화 품종 개발에 공헌할 수 있는 핵심 기술이다. 따라서 식물 수명연장 국화 신품종 개발에 대한 주관기관과 협동기관의 기술력은 본 사업의 성공에 대한 초석이 될 것이다.

2. 기술 핵심

수명연장 우량 국화 품종을 개발하기 위해서는 노화 지연과 같은 표현형을 유발하는 유전자의 확보 및 발굴과 우량 국화 품종에 있어 핵심 기술인 고효율 국화 형질전환 시스템 확립이 관건이다. 흥미로운 사실은 식물의 노화 조절은 식물의 수명 연장, 특히 절화 식물의 수명 연장에 결정적 공헌을 할 수 있다는 것이다. 제노마인(주)는 지적소유권을 확보하고 있는 애기장대 노화지연 유전자인 *ORE7*을 국화에 도입하였을 때, 국화 형질전환체는 수명연장, 특히 절화 식물의 수명연장이라는 표현형적 특징을 가지는 것으로 알려졌다(personal communication, 제노마인(주)와 전북농업기술원 공동연구, 2009)(그림 5). 이는 애기장대 노화 조절 관련 유전자가 국화에 수명연장 표현형질을 제공함으로써 우량 국화 품종 개발에 많은 장점을 줄 수 있다는 것을 시사한다.

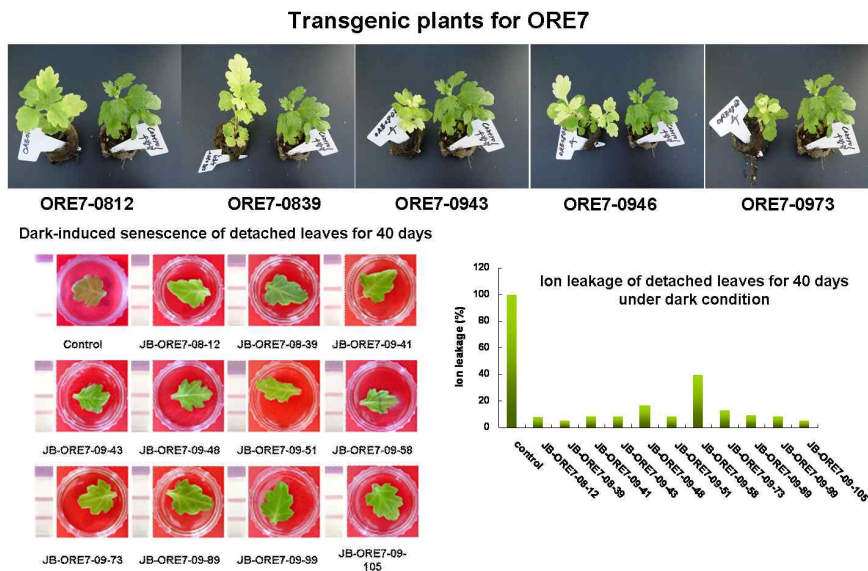


그림 5. *ORE7* 유전자가 도입된 국화 형질전환체의 수명연장에 대한 표현형적 특징

따라서 본 과제는 promoter trap, advanced RAM approach, activation tagging, 그리고 EMS mutagenesis 등과 같은 다양한 유전체 기능 연구를 통하여 확보된 애기장대의 변이체 pool로부터 노화 조절과 관련된 신기능성 유용 유전자를 발굴하고, 국화에서의 활용성을 연구하며, 기능 검정된 유용 유전자원을 국화 품종에 적용하여 수명연장에 있어서 최적 형질을 가지는 신기능성 국화 품종 개발을 목적으로 한다.

이러한 국화 품종 개발에 있어서 노화 조절 유전자의 발굴 및 기능 검정은 수명 연장 품종 개발에 있어서 범용적 응용이 가능한 핵심 기술이다. 본 연구팀은 수명연장 우량 품종 개발의 연구 추진 속도를 가속화하기 위하여 일차적으로 기 확보된 노화조절 유용 유전자인 **ORE12**, **ORE15**, **ATHG1** 그리고 **AtGA2ox4**를 국화 우량 품종 개발에 적용하고자 하며, 보다 다양한 그리고 보다 강력한 표현형질을 가진 품종을 개발하기 위하여 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 변이체 pool로부터 유용 유전자를 발굴하고, 그 기능을 검정하여 신품종 개발에 적용하고자 한다. 본 연구팀은 현재 공동으로 노화 조절 유전자를 국화에 적용하여 우량 형질전환체를 개발하기 위하여 형질전환용 벡터 제작 및 형질전환을 수행하고 있는 중이다. 이와 같은 선행 연구는 본 사업의 성공에 대한 확신을 제공하며, 또한 사업의 조기 성공을 이끌어낼 것이다.

국화 형질전환 기술: 국화의 품종 개발은 전통적인 교배 육종 방법을 통하여 활발히 진행되어 왔으며 이를 통하여 수천 개의 품종이 개발되었다. 그러나 국화는 교배 육종을 위한 유전자 pool이 제한되어 있으며 스탠다드 품종의 경우 교배가 쉽지 않고 종자생산량이 적고 품종 육성에 어려움이 많으므로 특정 형질의 품종 육성에서는 생명공학적인 기법을 이용한 신품종 개발의 가능성이 매우 크다고 생각된다. 현재까지 화훼 작물에서는 카네이션과 장미에서 파란 화색, 그러나 국화에서 형질전환을 통하여 다양한 유용 유전자를 도입한 형질전환체 개발에 대한 연구가 이루어지고 있음에도 불구하고 현재까지 형질전환 기술을 이용한 품종화에 대한 보고는 이루어진 바 없다. 이는 국화의 안정적인 형질전환 기법의 미확보와 함께 국화에서 도입 유전자의 발현을 효율적으로 제어할 수 있는 기술이 확립되어 있지 않기 때문이라고 보여진다. 그러나 본 연구팀은 아그로박테리움을 매개로 한 형질전환을 통하여 간접 기관형성을 거쳐 형질전환 식물체를 재생시키는 안정적이고 재현성 있는 고효율 형질전환 기술을 확보하고 있다. 이러한 아그로박테리움 매개 국화 형질전환 기법은 본 과제에 핵심기술이다.

기능성 유전체 연구를 통한 유용 표현형질 발현 시스템 발굴 기술: 식물의 노화는 세포나 조직을 죽음으로 이르게 하는 마지막 발달 단계로서, 작물의 생산성, 과일 및 화훼류의 저장성, 수송 과정, 수확기 조절 등, 특히 작물의 수명 연장에 관여하는 결정적 유전요인이다. 이러한 노화 조절 기술은 식물의 수명연장을 유발하며, 부수적으로 스트레스에 대한 내성 강화에도 응용이 가능하여 식물 수명연장 우량 품종 개발에 있어서 적용이 가능한 본 과제의 핵심 기술이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내외 기술개발 현황

국화 절화 수명연장 연구: 대부분 국화 품종의 절화 수명은 꽃보다 잎의 황화나 시들음에 의하여 장단을 지배하는 것으로 알려져 있어 다른 화훼류에 비하여 잎의 노화 지연에 대한 연구가 재배와 육종에 있어서 중요한 일이다. 그럼에도 불구하고 재배와 육종 연구에 있어서 절화 수명에 있어서 잎의 역할에 대한 고려가 부족했다고 판단된다.

최근 들어 절화수명 연장을 위하여 다양한 연구가 수행되고 있는데, 메탄올, 에탄올, benzyladenine (BA)과 paclobutrazol 등이 국화 절화의 수명을 연장시키고 생체중 감소를 줄여주고, 엽록소 함량을 증가시키는 것으로 알려졌다. 특히 BA는 꽃잎에서의 안토시안 형성을 다소 방지하여 천연의 색을 유지함으로써 절화 수명도 연장하는 효과를 보이기도 하였다. 국내에서도 에틸렌 생합성 억제제인 STS, sucrose, 그리고 열당처리 등으로 처리하여 절화 수명을 연장하는데 효과를 얻었다. 이러한 다양한 처리를 통한 수명연장 기술과 함께 식물 생명공학 기술을 통하여 노화가 지연되어 절화 수명이 연장된新品种 개발이 병행되는 것이 최고의 효율을 얻게 될 것이라 생각된다.

생명공학기술을 이용한 국화 절화수명 연장 연구: 국화의 형질전환은 여러 연구 그룹에 의해 성공되었는데, 대부분 *Agrobacterium tumefaciens*를 사용되었으며(Lemieux et al., 1990; Ledger et al., 1991; Boase et al., 1998; Petty et al., 2003), 일부 biolistics가 이용되기도 하였다 (Yepes et al., 1995). 국화의 형질전환 효율은 절편체 출처, 재생 과정, binary vector의 사용, 선발제의 선택 또는 유전자 도입 방법에 따라 차이를 보이며, 폐놀화합물로서 T-DNA의 유도인자인 acetosyringone은 목적유전자의 도입을 촉진시켰다(Boase et al. 1998; Bush and Pueppke 1991; Lowe et al. 1993).

국화에서 형질전환을 통한 유용 유전자 도입은 바이러스 저항성(Urban et al., 1994), 병저항성 (Takatsu et al., 1998; Toguri et al., 2003), 해충 저항성(Dolgov et al., 1997; Shinoyama et al., 1997)에 대한 1세대 유전자 변형 국화 개발에 많은 연구가 집중되었으며, 화색 변화 (Courtney-Gutterson et al. 1994), 생장형 변화(Petty et al. 2003), 벼의 OsMADS1 유전자 도입 (Jeong et al. 2002) 등과 같은 2세대 유전자 변형 작물 개발은 아직 제한적으로 연구가 되고 있는 실정이다.

국화는 재생 및 형질전환에 관하여 다양한 연구가 이루어졌음에도 불구하고 현재까지 개발된 국화의 형질전환 protocol이 낮은 형질전환 효율과 품종 특이성으로 인하여 일반적으로 사용되지 못하고 있다. 국화의 성공적인 형질전환을 위해서는 (1) *Agrobacterium*에 대한 반응성이 높으며, (2) 도입 유전자의 발현이 효율적으로 이루어지는 품종의 선택과 함께 (3) 선택된 품종에 적합한 재생 시스템의 확보가 필요하다.

현재까지 원예작물에서 생명공학 기술을 이용한 노화지연을 목적으로 개발된 사례를 보면, 과실류인 토마토, 멜론 및 화훼류인 카네이션에서 식물 노화를 야기하는 호르몬인 에틸렌 생합성을 조절하여 과실이나 꽃의 노화가 지연된新品种이 개발되었다.

이들은 에틸렌 생합성 대사과정에 관여하는 효소의 작용을 저해하여 최종적으로 에틸렌 생합성을 감소시키는 기작을 사용하고 있다. 구체적으로 s-adenosylmethionine (SAM) hydrolase 유전자를 이용하여 SAM의 축적을 감소시켜 에틸렌 생합성을 감소시키는 방법, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase를 도입하여 내생 ACC synthase를 조절함으로써 에틸렌 축적을 감소시키는 방법 등이 있다.

식물 유전자 중 스트레스 저항성 관련 유용 유전자의 발굴에 대한 연구는 식물 생명과학의 발달에 따라 기하급수적으로 증가하고 있는 추세이나 노화 지연 관련 유용 유전자의 발굴에 대한 논문은 상대적으로 증가세가 약하다가 최근 노화 지연과 생산성 증대가 관련이 있다는 연구들이 발표된 이후에 급속히 증가하고 있다. 하지만 현재까지 국화에서 노화조절 관련 유용 유전자를 도입한 형질전환체는 거의 없는 실정이다. 따라서 협동기관이 수행한 애기장대 노화 지연 유전자인 ORE7에 대한 국화 형질전환체의 개발은 국화 신품종 개발에 있어서 초석이 될 것이며 학문적 경쟁력을 확보할 수 있으리라 판단되고 이러한 학문적 경쟁력은 국가 농업생명 공학에 대한 경쟁력을 제공할 것이다

제 2 절. 국내외 특허 동향

생명공학 연구의 중요한 부분을 차지하고 있는 생명의 노화는 생물 발달 단계의 마지막으로 노화의 원인과 작용기작 규명을 통해 노화를 지연하고자 하는 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 식물에서도 마찬가지로 노화에 관련된 유전자의 조절기작을 밝히기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 고등 식물에서의 노화는 세포 사멸(Programmed Cell Death) 과정에 포함되어 있고, 세포사멸은 식물 내의 ethylene, abscisic acid 또는 cytokinin 등의 호르몬 작용과 당의 농도변화에 의해 조절된다고 알려져 있다. 이러한 식물 노화에 대한 연구는 생명공학적인 중요성 뿐만 아니라 상업화 되어있는 작물의 생산성과 수확 후 저장효율에 관여하여 경제학적 가치에도 영향을 미치기 때문에 이를 조절하기 위한 생리학적 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 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. 그런 반면 노화조절에 대한 특허 출원은 스트레스 저항성에 비하여 출원건수가 현저히 적다가 최근 작물의 생산성과 맞물려 급속히 증가하는 추세이다.

이러한 유전자 수준의 분자생물학적 연구에는 노화관련 유전자 탐색 및 분리와 기능분석, 해당 식물의 형질전환 기술 확립이 선행되어야 한다. 국화의 형질전환 기술은 1990년대에 활발히 보고되어 이미 기술 확립이 완료된 상태이며, 최근에는 이를 이용한 신품종 개발에 대한 보고가 이루어지기 시작하고 있다.

국내에서도 국화의 종자에서 발아된 조직 절편체를 이용하여 완전한 식물체로 재분화(regeneration) 하는 방법과 꽃의 색을 결정하는 유전자를 아그로박테리움을 통해 국화에 도입함

으로써 꽃이 개화 후 시간경과에 따라 화색이 변화되는 국화 식물체를 생산하는 방법에 대한 특허가 등록되어 있다(국내특허 10-2006-0080067). 또한, 국화에서 분리된 신규 *LDOX* 유전자 및 이를 이용한 화색 돌연변이체 선별 방법에 관한 특허는 국화에서 분리한 *LDOX* 유전자에 관한 것으로 이는 다른 다양한 식물유래 *LDOX* 유전자와 서열의 차이가 있는 신규 유전자이다. 국화의 야생형(wild type; WT)과 감마선을 조사하여 유발된 화색 돌연변이로부터 분리된 *LDOX*들 사이 유전자의 차이가 있으므로 국화의 화색 돌연변이체 선별용 마커로써 유용하게 이용될 수 있는 특허가 등록되어 있다(국내특허 10-2010-0008487).

한편, 국화의 형질전환은 여러 연구 그룹에 의해 성공되었는데, 대부분 *Agrobacterium tumefaciens*를 사용되었으며 일부 biolistics가 이용되기도 하였다. 국화의 형질전환 효율은 절편체 출처, 재생 과정, binary vector의 사용, 선발제의 선택 또는 유전자 도입 방법에 따라 차이를 보이며, 페놀화합물로서 T-DNA의 유도인자인 acetosyringone은 목적 유전자의 도입을 촉진시켰다. 국화에서 형질전환을 통한 유용 유전자 도입을 통하여 개량을 시도한 것은 바이러스 저항성, 병저항성, 해충 저항성, 환경 스트레스 저항성, 화색 변화, 성장형 변화 등이 있었다. 형질전환 효율을 높이기 위한 프로모터 개발에 대한 논문 보고가 뒤따르고 있어 분자생물학적 접근에 의한 신품종 개발 관련 특허 출원이 증가할 것으로 보인다.

따라서 노화조절 유용 유전자 발굴을 통한 국화 신품종 개발은 고부가 창출에 있어서 보다 많은 가치를 가지는 것으로 나타나, 본 사업에서는 노화 조절 유전자의 발굴에 집중하고 이를 통하여 우량 국화 신품종을 개발하고자 한다. 발굴 및 개발된 유전자, 형질전환체는 국내외적으로 특허출원을 통하여 지적소유권을 확보할 것이다. 이러한 지적 소유권의 확보는 국화 신품종 개발에 있어 원천기술에 대한 국가 경쟁력 강화에 일조하며, 이를 통해 개발되는 우량 국화 신품종은 고부가 수익 창출로 인한 국가 농업 발전에 기여할 수 있을 것이다.

제 3 절. 과제의 기술과 관련된 본 연구팀의 선행연구 결과

1. 국화 형질전환체 시스템 확립 및 형질전환체 개발 (주관기관)

[국화 형질전환 기술]

본 과제의 주관 기관인 상명대학교 형남인 교수 연구팀은 다양한 국화 품종의 고효율 식물체 재분화 기술을 개발한 바 있다. 기내 배양된 배양체에서 얻어진 잎을 절단한 절편체로부터 기관형성 방식으로 고효율의 신초를 유도하고 발근 과정을 거쳐 성공적으로 식물체를 재생시킬 수 있었다. 재생 식물체는 온실에서의 재배를 거쳐 표현형 검정을 실시하였을 때 유전적으로 안정한 상태를 유지하였다(그림 6).

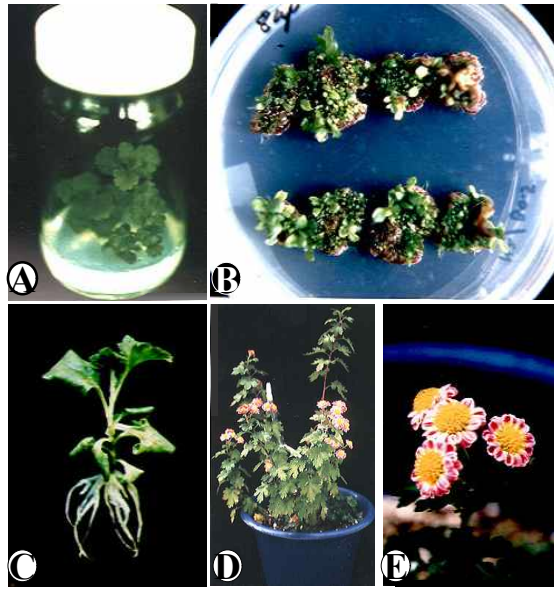


그림 6. 국화 잎 절편으로부터 식물체 재생

또한, 본 연구팀은 이를 바탕으로 *Agrobacterium* 매개 형질전환 기술을 개발하였는데, 현재 국화 스탠다드 품종과 스프레이 품종의 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 통하여 2~10%의 형질전환 효율을 얻을 수 있는 기술을 확보하고 있다. 특히 본 연구팀은 형질전환체 선발 시 선발제 (예: kanamycin 등)의 기존의 논문이나 대다수의 연구팀에서 사용되는 농도 보다 높게 유지한 상태에서 캘러스를 유도하고 이로부터 형질전환체를 재생시키는 간접 기관형성 시스템을 구축하여 국화 형질전환에서 많이 나타나는 escape의 발생을 최소화 할 수 있는 효율적인 국화 형질전환 기술을 확보하고 있다. 즉, 형질전환된 절편체로부터 캘러스를 유도하고 이들 캘러스로부터 신초 기관형성을 유도한다.

국화 형질전환체가 간접 기관형성 방식을 통해 얻어지면 기내 배양을 통해 신장과 발근을 거쳐 활착을 시켜 온실에서 재배하며 특성을 분석하였다. 그리고 도입유전자의 도입 여부를 PCR 분석을 통해 확인하였고 보고유전자인 *GUS* 유전자의 발현을 조직화학적 분석을 통해 확인하였다(그림 7).

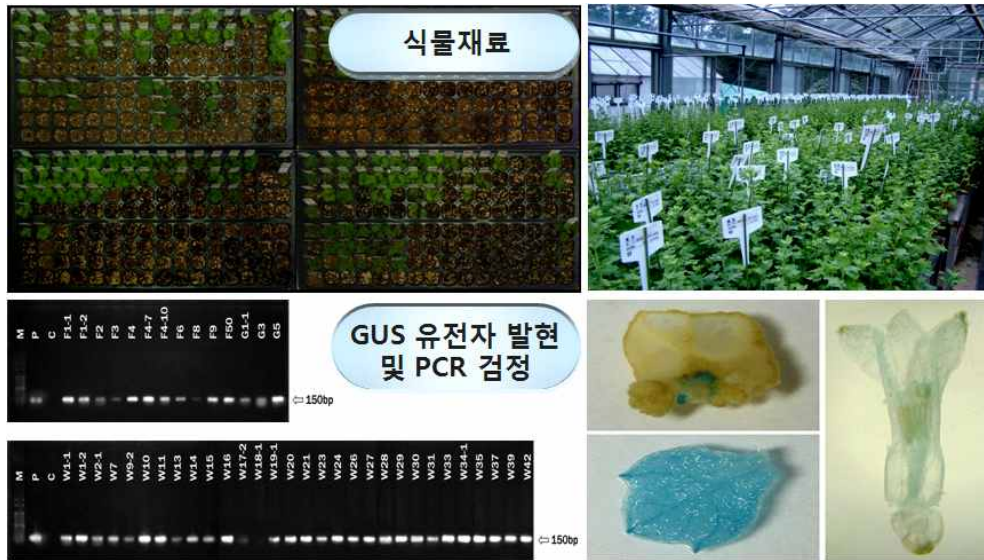


그림 7. 국화 형질전환체의 유전자 도입 확인 및 GUS 발현 분석

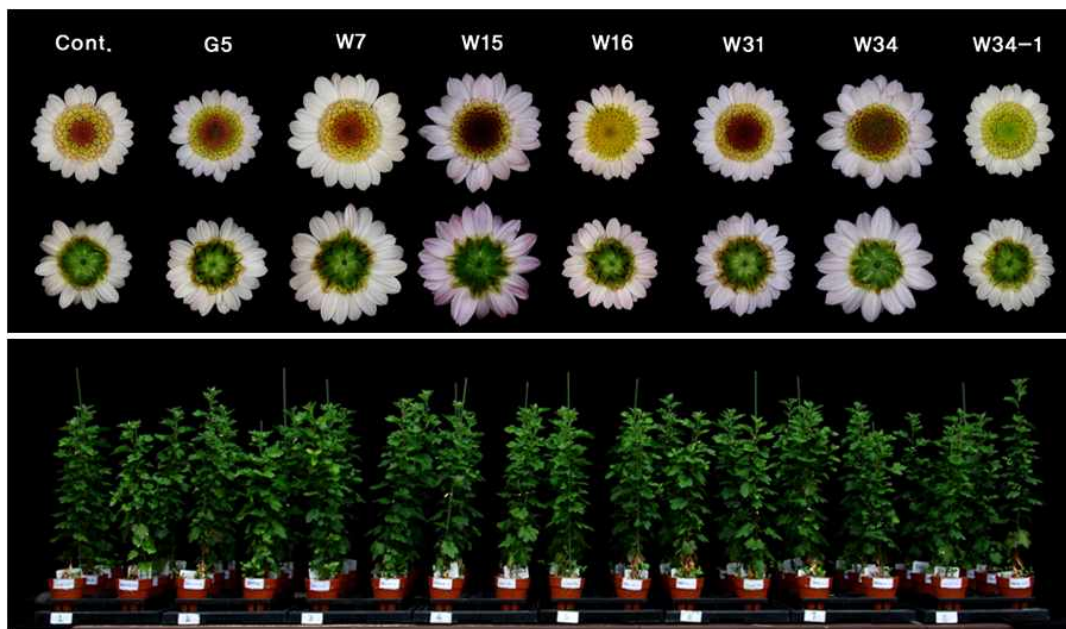


그림 8. 국화 개화특성 개량 형질전환체의 유전자 도입 확인 및 표현형 검정 (그림 4 참조)

[국화 유용 유전자 도입 형질전환체 개발]

본 연구팀은 국화의 개화특성 개량 형질전환체 개발에 대한 연구를 수행하고 있으며, 이를 통하여 국화 스탠다드 품종 및 스프레이 품종에서 각각 *MdMADS2*, *FT*, *CO*, *TSF*, *AGL6* 등의 유전자가 도입된 형질전환체를 개발하였다. 그리고 이들 형질전환체의 온실 재배를 통하여 개화를 유도하고 특성을 분석하여, 화색 및 개화시기 단축 등의 특성을 보이는 형질전환체를 선발하였다(그림 8).

2. 수명연장 우량 국화 개발 적용 유전자 확보 (협동기관)

[기능성 유전체 연구]

협동기관인 제노마인(주)은 activation tagging, promoter trapping, advanced RAM approach, 그리고 chemical mutagenesis approach 등의 다양한 식물의 기능성 유전체 연구를 통하여 농업에 직접 이용 가능한 식물 유용 기능성 유전자의 대량발굴을 수행하고 있으며, 여기에 gene expression profiling 기법인 plant proteomics를 접목하여 유전자의 기능을 효율적으로 밝히고 있는 중이다. 이러한 다양한 기능성 유전체 연구는 다양한 형질에 대한 유용 기능성 유전자의 발굴을 신속·정확하게 수행할 수 있도록 제공한다. 확보된 유용 유전자는 벼, 잔디, 콩, 유채 등과 같은 고부가 작물에 적용하여 우량 품종 개발을 수행하고 있는 중이다. 협동기관에서 수행하고 있는 이러한 기능성 유전체 연구에 대한 기법은 그림 9에서 간략하게 소개되고 있다.

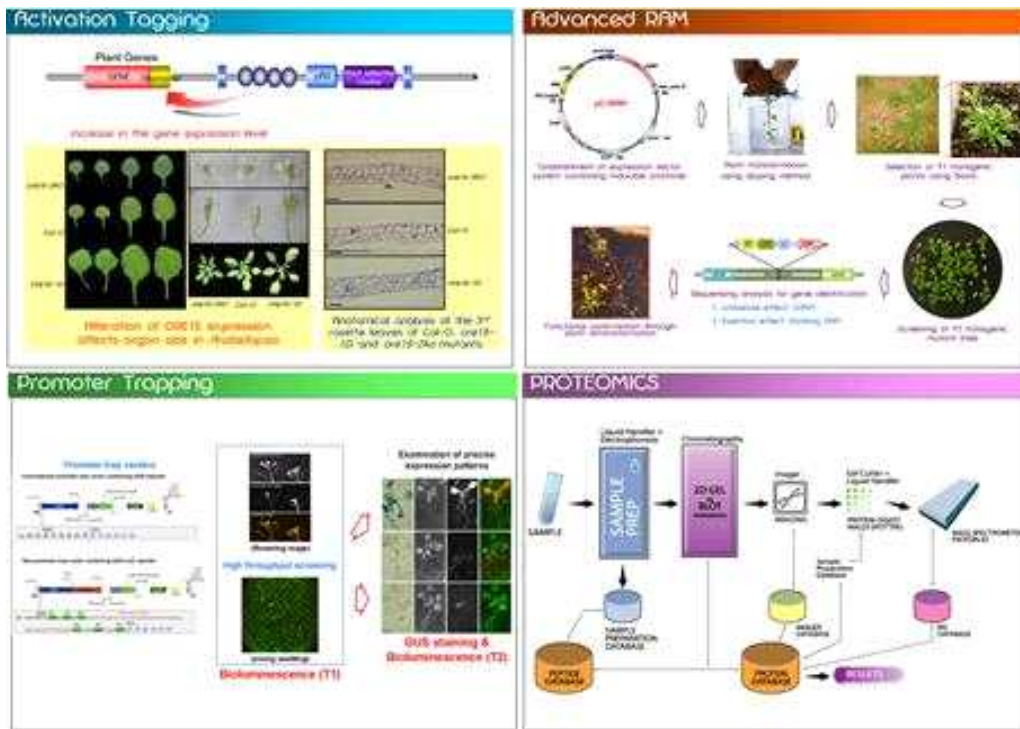


그림 9. 제노마인(주)에서 확보하고 있는 기능성 유전체 연구 기법

[수명연장 관련 유용 유전자 발굴에 대한 연구 동향]

이러한 기능성 유전체 연구를 통하여 협동기관에서는 노화 조절을 통한 수명연장 국화 품종 개발에 적용 가능한 유전자를 확보하고 있으며, 보다 나은 표현형질을 제공하는 유전자를 계속적으로 발굴하고 있다. 이러한 노화조절 유전자는 식물체의 수명연장과 더불어 일부 스트레스에 대한 저항성 혹은 개체 신장 등을 제공함으로써, 우량 국화 품종 개발에 보다 많은 장점을 제공할 것이다. 아래에 본 과제에 적용할 확보 유전자에 대한 소개를 간략하게 하였다.

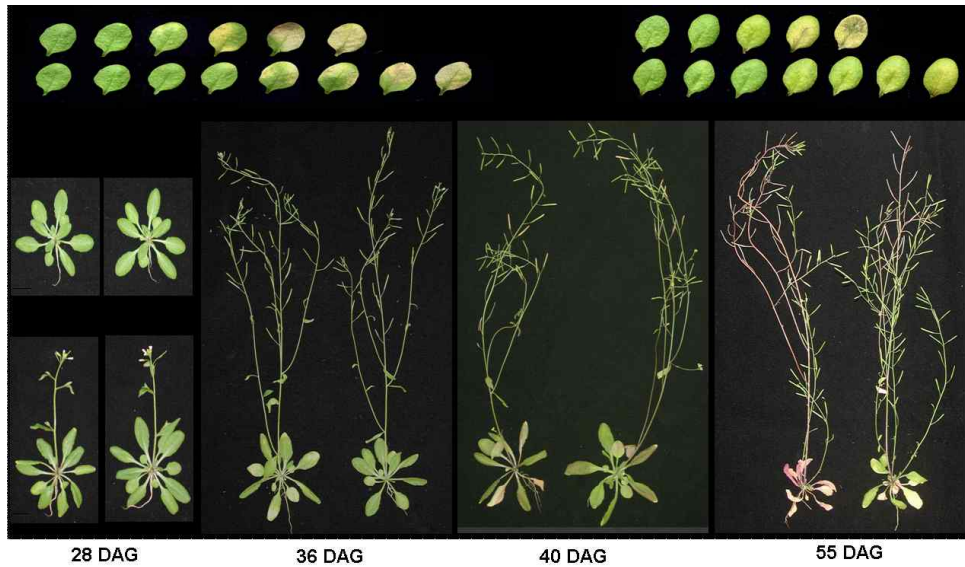


그림 10. *ORE12* 유전자의 발현으로 인한 애기장대의 수명연장 표현형적 특징

***ORE12* 유전자:** 협동기관에서 지적소유권을 확보하고 있는 유전자로 EMS mutagenesis를 통하여 노화 지연의 표현형적 특징을 가지며 cytokinin receptor로서의 기능을 가지고 있다(그림 10). *ORE12* 유전자는 식물의 수명연장, 특히 절화 식물의 수명연장에 있어서 탁월한 효과를 가지는데, 아마 본 유전자가 가지고 있는 cytokinin과의 연관성 때문인 것으로 추측된다. 따라서 *ORE12* 유전자의 국화 적용은 절화 식물의 수명연장이라는 측면에서 고부가 가치 창출이 가능하리라 판단된다.

***ORE15* 유전자:** activation tagging 변이체 pool에서 노화지연 표현형을 가지는 변이체로부터 발굴된 유전자로, 흥미롭게도 노화지연을 통한 식물의 수명연장이라는 표현형적 특징뿐만 아니라 biomass의 증가, 특히 개체 크기의 증가라는 표현형적 특징도 제공하였다(그림 11). 본 유전자는 zink finger domain을 가지는 전사인자이다. 따라서 *ORE15* 유전자의 국화 적용은 식물의 수명연장이라는 측면뿐만 아니라 개체 크기 신장이라는 측면에서 고부가 가치 국화 품종 개발이 가능하리라 판단된다.

***ATHG1* 유전자:** advanced RAM approach를 통하여 확보된 유전자이며, At-hook domain을 가지는 전사인자로 밝혀졌다. 본 유전자는 식물의 수명연장에 있어서 탁월한 기능을 가지며, 또한 바이오매스 증가, 특히 개체 크기 신장 그리고 일부 스트레스에 대한 저항성을 제공하였다(그림 12). 따라서 *ATHG1* 유전자의 국화 적용은 식물의 수명연장이라는 측면뿐만 아니라 개체 크기 신장 그리고 스트레스 저항성이라는 측면에서 우량 국화 품종 개발이 가능하여 고부가 가치 창출이 가능하리라 판단된다.

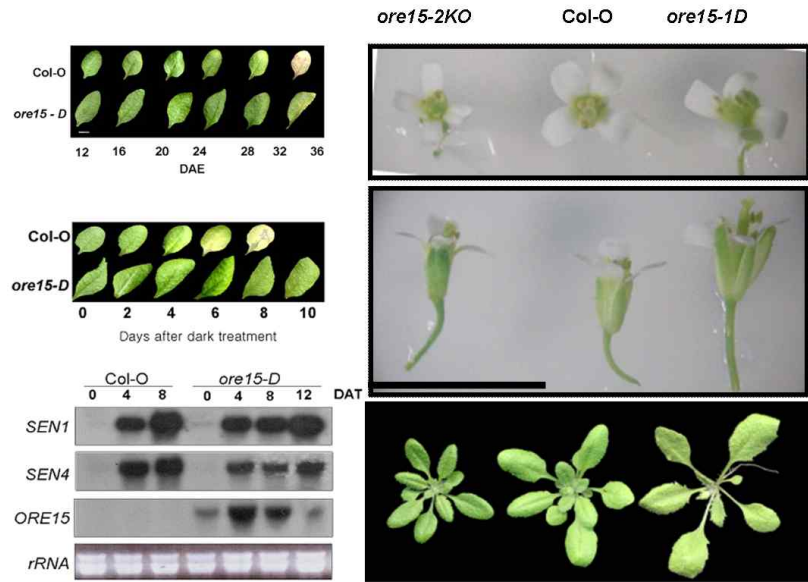


그림 11. *ORE15* 유전자의 과발현으로 인한 애기장대의 수명연장 및 개체 크기 신장 표현형적 특징

AtGA2ox4 유전자: advanced RAM approach를 통하여 확보된 유전자로 GA2-oxidase의 기능을 가지는 것으로 밝혀졌다. 본 유전자의 표현형적 특징은 식물의 semi-dwarfism을 들 수 있으며, 부가적으로 노화지연이라는 표현형적 특징을 가지는 것으로 나타났다(그림 13). 따라서 *AtGA2ox4* 유전자의 국화 적용은 식물의 수명연장이라는 가치뿐만 아니라 미니 국화의 생산이라는 부가적 가치 창출이 가능해져 고부가 품종 개발로서의 가치를 가질 수 있을 것으로 판단된다.

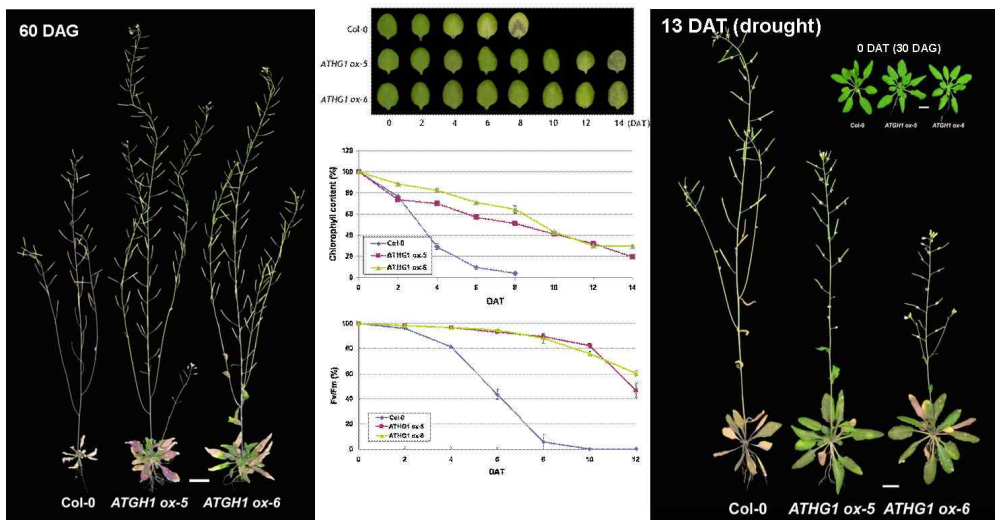


그림 12. *ATHG1* 유전자의 과발현으로 인한 애기장대의 수명연장 및 가뭄 스트레스 저항 표현형적 특징

이러한 기능성 유전체 연구를 통한 노화 조절을 통한 수명연장 유전자의 발굴 기술은 본 사업의 성공에 대한 초석이 될 것이다.

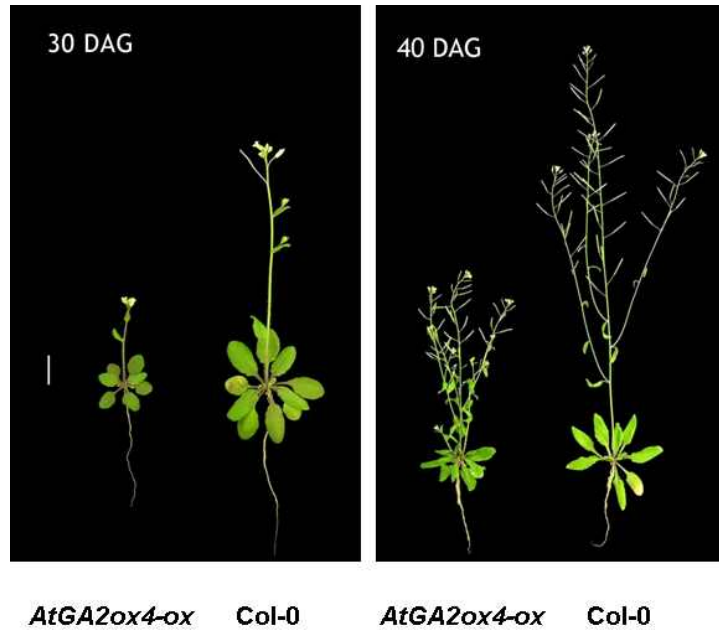


그림 13. *AtGA2ox4* 유전자의 과발현으로 인한 애기장대의 수명연장 및 왜성 표현형적 특징

3. 유용 유전자 도입을 통한 국화 품종 개발 (주관 및 협동기관 공동연구)

주관기관인 상명대학교와 협동기관인 제노마인(주)는 공동으로 수명연장 우량 국화 품종을 개발하기 위하여 협동기관이 확보하고 있는 노화 지연 기확보 유전자인 *ORE15*, *AtGA2ox4*, *ATHG1*, *ORE12*와 유용 유전자인 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8*를 형질전환용 벡터에 도입하여 주관기관이 보유하고 있는 고효율 국화 형질전환 시스템을 활용하여 형질전환체 개발 연구를 수행할 예정이다. 개발된 국화 형질전환체를 대상으로 온실에서 재배하여 개화를 유도한 후 생장 및 개화특성 검정과 기능검정을 실시하여 우량 국화 형질전환체를 선발할 예정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발수행 내용 및 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
식물 수명연장 유전자 발굴 및 기능 검증	• Functional Genomics	• 식물의 수명연장관련 변이체 확보 (주1)
	• Direct Approach	• 유용 유전자 발굴 및 기능 검증 (주2)
국화 형질전환 및 형질전환체 생산	• 국내 육성된 국화 우량 품종의 선발	• 국내 육성 국화 스탠다드 우량 품종 ‘백마’의 재생시스템 확립 (주3)
	• 국화 형질전환용 벡터	• 국화 형질전환용 벡터 construct 제작 (주4)
	• 기확보 유전자 4종 국화 형질전환	• 수명연장 유전자 (<i>ORE15</i> , <i>AtGA2ox4</i> , <i>ATHG1</i> , <i>ORE12</i>) 도입 형질전환체 선별 및 생산 (주5)
	• 유용 유전자 4종 국화 형질전환	• 유용 유전자 <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> 도입 국화 형질전환 (주6)
형질전환 국화의 기능 분석	• 형질전환 국화의 유전자 도입 및 발현 분석	• 기확보 유전자 및 유용 유전자 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석 (PCR, qPCR, Southern blot, RT-PCR) (주7)
	• 형질전환 국화의 1차 표현형 분석	• 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체의 온실 재배를 통한 생장 및 개화특성 검증 (주8)
	• 형질전환 국화의 2차 기능 분석	• 기확보 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체의 생리검정 (주9)

주1) 식물의 수명연장 관련 변이체 확보

모델 식물은 애기장대로 하며, activation tagging, promoter trap, advanced RAM approach 등과 같은 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 다량의 변이체로부터 녹화 연장, 다양한 환경 스트레스, 그리고 왜화 조절에 대한 기능 조사를 통하여 유용 표현 형질을 지닌 변이체를 확보하였다. 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 수명 조절 기작 규명에 대한 많은 기회를 제공할 것이다.

주2) 유용 유전자 발굴 및 기능 검정

확보된 변이체로부터 각 기법에 적절한 방법을 통하여 유전자 정보를 확보하고 이중 녹화 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성, 그리고 왜화 조절 등과 관련된 신기능성 유용 유전자의 가치를 가지는 유전자를 선별하였다. 일반적으로 activation tagging 변이체 pool에서 확보된 변이체의 유전자 분리는 주로 TAIL-PCR을 수행하여 얻었으며, promoter trapping 변이체 pool에서 확보된 변이체의 유전자 분리는 plasmid rescue를 통하여, 그리고 advanced RAM 변이체 pool에서 얻어진 변이체의 유전자 분리는 inverse PCR을 통하여 얻었다. 선별된 유전자의 기능을 재검정하기 위하여 reverse genetics를 적용하였다. 이러한 연구를 통하여 얻어진 유전자의 gain-of-function과 loss-of-function 변이체의 표현형을 재확인하고, 그들의 표현 형질에 대한 생리·생화학적 현상을 구명하였다. 특히 reverse genetics를 통하여 얻어진 변이체의 생리·생화학적 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 녹화 연장과 관련된 사항으로 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하며 또한 분자생물학적 분석은 노화 시 발현이 증가되는 유전자를 indicator로 하여 유전자 발현을 분석하여 조사하였다. 이와 더불어 내부 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 암 처리뿐만 아니라 methyl jasmonate, ABA, ethylene, oxidative stress (H_2O_2 등) 등에 대한 반응도 조사하였다. 또한 식물의 생산성 증대에 대한 기능 검정은 종자 수확량, 식물 크기, silique 수 등의 생산성 증대 지표를 사용하여 수행하였다.

식물의 수명연장 관련 신기능성 유용 유전자 발굴: 상기의 과정을 통하여 식물의 노화지연을 통한 수명연장을 제공하는 신품종 혹은 신기능성 작물 개발을 위한 유용 유전자를 최종 발굴하였다. 이러한 유전자의 지적 소유권을 확보하기 위하여 협동기관인 제노마인(주)이 기업체인 관계로 일차적으로 특허 출원을 원칙으로 하며, 이후 논문 게재를 행할 것이다.

주3) 국내 육성된 국화 우량 품종의 선발 및 기관형성을 통한 식물체 재생 시스템 확립

우리나라 국화의 재배현황을 살펴보면 스프레이 국화(소국)의 경우 현재 약 400여 품종이 재배되고 있으나, 국내에서 상업적으로 재배되는 국화의 약 83%가 절화용 스탠다드 품종(대국)이며, 신마, 백선, 백마 등 5~6개 품종이 전체 대국 생산량의 약 90% 이상을 차지하고 있다. 그러나 스탠다드 품종은 높은 상품적 가치에도 불구하고 교배가 쉽지 않고 종자생산량이 적으며 같은 혈통간의 불임률이 매우 높은 자가불화합성 작물로 전통적인 육종 방법에 의한 신품종 육성에 어려움이 많다. 국내 육성 신품종은 국립원예특작과학원에서 개발한 황색 대국 2품종과 백색 대국 ‘백마’가 전부이다. 특히, 백마의 경우 일본에서 가치를 인정받아 수출이 증가하고 있어 국산 국화 수출의 견인차 역할을 하고 있는 품종으로 형질전환을 통한 신품종 육성시 상업적 파급효과가 더 클 것으로 보인다.

따라서, 본 연구팀은 이미 재생시스템을 확립한 ‘신마’와 함께 ‘백마’의 기관형성을 통한 식물체 재생 시스템을 확립하여 형질전환 방법을 통한 신품종 육성의 기초자료로 활용하고자 하였다.

국화 스탠다드 신품종 ‘백마’의 신초배양을 통해 얻어진 식물체를 재료로 수행하였다. 신초배양배지는 MS 염류와 비타민, sucrose 30g/L 와 agar 8g/L를 포함한 배지를 사용하였고, 매 4주마다 동일 배지로 계대배양을 실시하였다. 배양 4~6주 된 식물체의 상부 4~5마디의 완전히 전개된 잎을 절취한 후 주맥을 포함하여 4면 절단한 절편체를 만들어 향측면이 배지에 닿게 치상하였다. ‘백마’의 신초재생에 적합한 성장조절제 농도를 알아보기 위하여 MS 염류와 비타민에 sucrose 30g/L와 agar 8g/L, 갈변을 방지하기 위한 AgNO₃를 첨가한 배지를 기본으로 BA 0.5, 1.0, 2.0mg/L에 NAA 0.5, 2.0mg/L와 IBA 0.5, 2.0mg/L를 각각 조합처리 하였다. 모든 처리는 배양 용기당 절편체 6개씩 치상한 것을 1반복으로 하여 처리당 3반복 하였다. 배양 조건은 25±2℃에서 4주 동안 암배양을 한 후 16/8h 광주기인 명배양으로 옮겨 주었다.

주4) 국화 형질전환용 벡터 construct 제작

기본적으로 쌍자엽 식물인 국화에 적용 가능하고 형질전환체 선별에 있어서 보다 용이한 제초제를 선발마커로 사용 가능한 pCAMBIA3301을 사용하였다. 이러한 기존 벡터는 constitutive promoter인 CaMV 35S promoter를 적용하고 있다. 본 연구팀은 발아 혹은 발달 초기 특정 유전자 과발현에 의한 표현형적 변이가 나타나면, promoter의 활성이 보다 약하고 발달단계동안 조절이 가능한 스트레스 inducible promoter인 SEN1 promoter를 적용한 pCSEN 벡터도 사용하였다. 한편 유전자 발현을 보다 강력하게 하기 위하여 ORE12-국화 형질전환체 개발에 있어서는 CaMV 35S promoter 대신 2X 35S promoter 기능을 가지는 pNB96 벡터를 사용하였다.

주5) 기확보 수명연장 유전자 4종 도입 국화 형질전환체 선별 및 생산

국화 스탠다드 품종 ‘신마’를 공시 재료로 사용하여 형질전환 실험을 수행하였다. *Agrobacterium tumefaciens* strain은 LBA4404를 사용하였으며, pCAMBIA3301 vector에 ORE15 유전자를 도입시킨 것, pCSEN vector에 ATHG1, AtGA2ox4 유전자를 각각 도입시킨 것과 pNB96 vector에 ORE12 유전자를 도입시킨 것을 제1협동연구팀에서 분양 받아 국화 스탠다드 품종 ‘신마’의 형질전환을 실시하였다.

형질전환 실험은 기내 신초배양을 통해 얻어진 식물체로부터 절편체를 절취하여 사용하였다. 신초배양배지는 MS 염류와 비타민, sucrose 30g/L와 agar 8g/L를 포함한 배지를 사용하였고, 4주마다 계대배양을 실시하였다. 배양 4~6주 후 식물체의 상부 5~6마디의 완전히 전개된 잎을 절취하여 가로, 세로 5mm 크기로 4면을 절단한 절편체를 만들어 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 실시하였다.

*A. tumefaciens*는 glycerol stock에 저장되어 있는 cell을 취하여 rifampicin(Rf) 100mg/L, kanamycin(Km) 100mg/L 첨가한 고체 YEP 배지에 streaking 하여 28℃, 암 조건으로 2일 동안 배양하였다. 멸균된 나무막대로 왕성하게 성장하고 있는 하나의 colony를 긁어 100ml 삼각 플라스크 용기에 담겨있는 액체 YM배지 50mL에 풀어준 후, 28℃ 암조건의 shaking incubator에서 24시간동안 250rpm으로 진탕배양을 하였다. YM배지에서 배양한 각 *Agrobacterium* 현탁액을 12,000rpm으로 10분 동안 원심분리한 후, 액체 MS배지에 재현탁하여 0.60~0.80(OD_{600nm})로 조정하고 OD값 조정 후 세균현탁액을 2시간 동안 shaker에서 암배양 하였다.

액체 MS 배지에서 2시간 배양한 세균현탁액에 절단한 절편체를 침지하여 실온에서 20분간 접촉하였다. 신초재생배지(SM)는 BA 2.0mg/L, NAA 0.5mg/L가 첨가된 배지를 사용하였다. 재생배지(SM)에 acetosyringone 100µM을 첨가한 공조배양배지(CM)에서 3일간 배양 한 후, 제초제가 포함된 선발배지에서 배양하였다. 배양조건은 25±2℃에서 4주 동안 암배양 한 후 16/8 광주기인 명배양으로 옮겨 주었다. 선발배지(TSM)는 신초재생배지에 PPT 1.5mg/L, Cx 500mg/L가 첨가된 배지를 사용하였으며, 25±2℃에서 4주 동안 암조건에서 배양 한 후 16/8 광주기인 명조건으로 옮겨 배양하였다. 4주 간격으로 3-4회에 걸쳐 TSM 배지로 계대배양 한 후, 선발배지에서 배양하는 동안 형성된 신초의 길이가 0.5cm 이상 되었을 때, 신초를 절편체에서 분리하여 MS 배지에 PPT 2.0mg/L가 첨가된 신장배지(TEM)로 옮겨주어 신장과 발근을 유도하였다.

국화 스탠다드 계통 ‘신마’의 수명연장유전자 형질전환체 가운데 기내에서 성공적으로 발근된 소식물체를 꺼내어 뿌리를 제거하고 줄기에 묻어있는 배지를 흐르는 물에 수세하여 루톤을 줄기 맨 밑에 묻혀 배양토가 들어있는 육모판(2*2cm)에 이식한 다음, 장일조건(16/8)에서 활착을 유도하였다. 2주 후 뿌리가 형성된 식물체를 배양토가 들어있는 화분(12*12cm)으로 이식하여 장일조건(16/8)에서 6주간 재배한 후, 형질전환 식물체의 초장이 40cm 이상이 되었을 때 단일처리(12/12)를 시작하여 개화를 유도하였다.

이와 같은 국화 ‘신마’ 형질전환은 선발과정 및 선발배지를 제외한 식물재료 및 *Agrobacterium* 준비, 형질전환 과정, 배양환경과 유도된 신초의 증식방법은 본 과제의 모든 국화 ‘신마’ 형질전환 과정에 동일하게 적용하였다(그림 14).



그림 14. *Agrobacterium* 매개 국화 형질전환 과정

주6) 유용 수명연장 유전자 4종 도입 국화 형질전환

국화 스탠다드 품종 ‘신마’를 공시 재료로 사용하여 형질전환 실험을 수행하였다. *Agrobacterium tumefaciens* strain은 LBA4404를 사용하였으며, pCSEN vector에 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*와 *ATPG8* 유전자를 도입시킨 것을 제1협동연구팀에서 전달 받아 국화의 형질전환에 사용하였다.

선발배지(TSM)는 신초재생배지에 PPT 1.5mg/L, Cx 500mg/L가 첨가된 배지를 사용하였으며,

25±2℃에서 4주 동안 암조건에서 배양 한 후 16/8 광주기인 명조건으로 옮겨 배양하였다. 4주간격으로 3-4회에 걸쳐 TSM 배지로 계대배양 한 후, 선발배지에서 배양하는 동안 형성된 신초의 길이가 0.5cm 이상 되었을 때, 신초를 절편체에서 분리하여 MS배지에 PPT 2.0mg/L가 첨가된 신장배지(TEM)로 옮겨주어 신장과 발근을 유도하였다.

주7) 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석

① 기확보 유전자 도입 국화 형질전환체 PCR 검정

기확보 수명연장 유전자가 도입된 국화 형질전환체의 유전자 도입을 확인하기 위하여 polymerase chain reaction(PCR) 검정을 수행하였다.

국화 형질전환체 신초의 잎을 액체질소에 넣어 분쇄한 후, Macherey-Nagel사의 Nucleospin Plant II Kit을 이용하여 DNA를 추출하였다. Primer는 *bar* 유전자의 314bp ends (5'-CGC AGG AAC CGC AGG AGT GG-3', 5'-GGG GGC ATA TCC GAG CGC CT-3'), *ORE15* 유전자의 732bp ends (5'-ATG GTT AGA GAA GGT GAA GAA GA-3', 5'-TTA TGA AAA AGG AGC CCT ATG AG-3'), *ATHG1* 유전자의 879bp ends (5'-ATG GCT GGT CTT GAT CTA GGC A-3', 5'-TCA GAA AGG ACC TCT TCC ACC G-3'), *AtGA2ox4* 유전자의 933bp ends (5'-CCG TAG ATC AAG ACA TAC CAA TAA TAG-3', 5'-CCT TAC ATG TAC GAA ACA TGT CTA AA-3')를 이용하였으며, Elpis Biotech사의 HiPi PCR PreMix Kit을 이용하여 PCR을 실시하였다. DNA 증폭은 95℃에서 5분 동안 초기 denaturation 한 후 95℃ 30초 denaturation, 55℃~59℃ 30초 annealing, 72℃ 30초 extension을 35cycle 반복한 후, 최종적으로 72℃에서 2분간 extension 하였다. 증폭된 DNA를 1% agarose gel을 이용하여 30분 동안 전기영동하고 UV로 확인하였다.

② 기확보 유전자 도입 국화 형질전환체 qPCR 및 Southern blot 검정

기확보 수명연장 유전자가 도입된 국화 형질전환체의 삽입 T-DNA copy 수를 조사하기 위해 genomic PCR에서 확인된 국화 형질전환체를 qPCR 및 Southern blot 검정을 수행하였다.

국화 형질전환체의 DNA를 추출한 후, Qiagen사의 Rotor-Gene™ Probe PCR Kit과 Rotor Gene Q을 이용하여 qPCR을 실시하였다. Primer와 probe는 *bar* 유전자의 85bp ends (primer : 5'd-CTG CAC CAT CGT CAA CCA CTA C-3', 5'd-GGT CGT CCG TCC ACT CCT G-3', probe 5' d FAM-TCG AGA CAA GCA CGG TCA ACT TCC-BHQ-1 3')를 이용하였다, DNA 증폭은 95℃에서 3분 동안 초기 denaturation 한 후 95℃ 3초 denaturation, 60℃ 10초 annealing을 40cycle 반복하였다. 국화 형질전환체의 qPCR을 이용한 copy수 분석은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법 (Livak and Schmittgen 2001)으로 분석하였고 같은 조건의 실험을 3반복 수행하였다.

Genomic PCR을 통해 유전자 도입이 확인된 형질전환체의 어린 잎을 사용하여 DNA를 추출한 후 Southern blot을 실시하였다. 국화의 copy 수 분석을 위해 도입유전자 cassette sequence map의 *bar* gene과 Target gene 부분에서 probe를 정하여 primer를 제작하였다. 각 형질전환체 DNA를 10 μg 추출하여 *EcoRI* 처리 후 overnight digestion 하였다. Digestion 처리한 국화 형질전환체 DNA를 1% agarose gel에 전기영동한 후, 분리된 capillary 현상을 이용하여 membrane으로 transfer 하였다. 95℃에서 denature 시킨 probe를 DNA와 hybridization 시킨 후, probe에 conjugate

와 substrate를 붙여 X-ray에 exposure 시켜 현상하였다.

③ 기확보 유전자 도입 국화 형질전환체 RT-PCR 검정

기확보 수명연장 유전자가 도입된 국화 형질전환체의 유전자 발현을 분석하기 위하여 reverse-transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 수행하였다.

국화 형질전환체 신초의 잎을 액체질소에 넣어 분쇄한 후, Qiagen사의 RNeasy plant mini kit 을 이용하여 RNA를 추출한 후 Invitrogen 사의 Super Script First-Stand kit을 이용하여 cDNA 합성을 하였다. 식물체 내에서 항상 일정하게 발현되는 국화의 18S rRNA 유전자 primer 149bp ends (5'-ACC AAG CTC CTG TTT GAT CC-3', 5'-CAT GAA ACG AGC CTT CTT GA-3')를 이용하여 각 RNA의 상대적인 정량을 하였다. *ORE15* 유전자의 247bp ends (5'-CCC TTC TCA TCG CTC TCA TC-3', 5'-CAC CTT GCA AGA GAG GGA AC-3'), *ATHG1* 유전자의 211bp ends (5'-AGG ACA AGG TCA GGT GGT TG-3', 5'-GAA CGG AAG TCC TCC TCC TC-3'), *AtGA2ox4* 유전자의 215bp ends (5'-AAG CAG TTG GCT CGT GAG AT-3', 5'-ATC TGA GGG TCG GTG TGT TC-3')를 이용하였으며, HiPi PCR PreMix Kit(Elpis Biotech사)을 이용하여 PCR을 실시하였다. DNA 증폭은 95℃에서 5분 동안 초기 denaturation 한 후 95℃ 30초 denaturation, 55℃~59℃ 30초 annealing, 72℃ 30초 extension을 35cycle 반복한 후, 최종적으로 72℃에서 2분간 extension 하였다. 증폭된 DNA를 1% agarose gel을 이용하여 30분 동안 전기영동하고 UV로 확인하였다.

④ 유용 유전자 4종 도입 국화 형질전환체 PCR 검정

유용 수명연장 유전자 4종이 도입된 국화 형질전환체의 유전자 도입을 확인하기 위하여 PCR 검정을 수행하였다.

국화 형질전환체 신초의 잎을 액체질소에 넣어 분쇄한 후, Macherey-Nagel사의 Nucleospin Plant II Kit을 이용하여 DNA를 추출하였다. Primer는 *bar* 유전자의 314bp ends (5'-CGC AGG AAC CGC AGG AGT GG-3', 5'-GGG GGC ATA TCC GAG CGC CT-3'), *ATPG3* 유전자의 801bp ends (5'-CTT GGT GGA CGA ACC AGA GT-3', 5'-GTT CGT GCC CTA GCT GAC C-3'), *ATPG4* 유전자의 920bp ends (5'-TGG TGG ACA GGA CAA GTG AA-3', 5'-GCT TGA GCC CAA CCA TAA GC-3'), *ATPG7* 유전자의 963bp ends (5'-TGG ATC CAG TAC AAT CTC ATG G-3', 5'-GTC GTC CCG TTG ACC AAT AA-3')와 *ATPG8* 유전자의 770bp ends (5'-TCG TTC TCA TAC ACC GCA AT-3', 5'-GTT GCG TTC CCC AAA AGC-3')를 이용하였으며, Elpis Biotech사의 HiPi PCR PreMix Kit을 이용하여 PCR을 실시하였다. DNA 증폭은 95℃에서 5분 동안 초기 denaturation 한 후 95℃ 30초 denaturation, 55℃~59℃ 30초 annealing, 72℃ 30초 extension을 35cycle 반복한 후, 최종적으로 72℃에서 2분간 extension 하였다. 증폭된 DNA를 1% agarose gel을 이용하여 30분 동안 전기영동하고 UV로 확인하였다.

⑤ 유용 유전자 도입 국화 형질전환체 RT-PCR 검정

유용 수명연장 유전자 4종이 도입된 국화 형질전환체의 유전자 발현을 분석하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

국화 형질전환체 신초의 잎을 액체질소에 넣어 분쇄한 후, Qiagen사의 RNeasy plant mini kit 을 이용하여 RNA를 추출한 후 Invitrogen 사의 Super Script First-Strand kit을 이용하여 cDNA 합성을 하였다. 식물체 내에서 항상 일정하게 발현되는 국화의 18S rRNA 유전자 primer 149bp ends (5'-ACC AAG CTC CTG TTT GAT CC-3', 5'-CAT GAA ACG AGC CTT CTT GA-3')를 이용하여 각 RNA의 상대적인 정량을 하였다. *ATPG3* 유전자의 219bp ends (5'-GGA CAG GCT CAG TCG CTA AC-3', 5'-TGA CCG ACC CTA TGG CTA AG-3'), *ATPG4* 유전자의 208bp ends (5'-AAC AAC AAC AAC GAC GAC GA-3', 5'-CGA TGA CGT CAG TCC CAC TA-3'), *ATPG7* 유전자의 213bp ends (5'-TGT TTA CCT CGC TGG AGG AC-3', 5'-TGC AGT TGT TGT CCC ATC AT-3')와 *ATPG8* 유전자의 218bp ends (5'-ATG GAA AGC CTA GCC GTC TT-3', 5'-CCT TGA CCA CCG GCT AAG TA-3')를 이용하였으며, HiPi PCR PreMix Kit(Elpis Biotech사)을 이용하여 PCR을 실시하였다. DNA 증폭은 95℃에서 5분 동안 초기 denaturation 한 후 95℃ 30초 denaturation, 59℃~60℃ 30초 annealing, 72℃ 30초 extension을 35cycle 반복한 후, 최종적으로 72℃에서 2분간 extension 하였다. 증폭된 DNA를 1% agarose gel을 이용하여 30분 동안 전기영동하고 UV로 확인하였다.

주8) 형질전환 국화의 1차 표현형 검정 - 기확보 수명연장 유전자 도입 형질전환체의 온실 재배를 통한 생장 및 개화특성 검정

국화 스탠다드 계통 '신마'의 수명연장유전자 형질전환체 가운데 기내에서 성공적으로 발근된 소식물체를 꺼내어 뿌리를 제거하고 줄기에 묻어있는 배지를 흐르는 물에 수세하여 루톤을 줄기 맨 밑에 묻혀 배양토가 들어있는 육모판(2*2cm)에 이식한 다음, 장일조건(16/8)에서 활착을 유도하였다. 2주 후 뿌리가 형성된 식물체를 배양토가 들어있는 화분(12*12cm)으로 이식하여 장일조건(16/8)에서 6주간 재배한 후, 형질전환 식물체의 초장이 30cm 이상이 되었을 때 단일처리(12/12)를 시작하여 개화를 유도하였다.

개화된 형질전환 계통별 개화 특성을 알아보기 위하여 개화기를 기준으로 하여 개화소요일수, 초장, 그리고 꽃의 특성을 조사하였다. 꽃의 특성으로는 설상화의 수, 통상화 수, 꽃 전체 지름, 생체중 등을 조사하였다.

주9) 형질전환 국화의 2차 표현형 검정 - 기확보 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체의 기능 검정

① 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체의 생리 특성 검정

온실에서 재배된 기확보 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체를 개화시기에 줄기 30cm 부분을 비스듬하게(45° 각도) 절단한 후 증류수가 채워진 시험관에 삽화하고 엽록소 함량 변화와 절화 수명을 관찰하기 위해 꽃 냉장고에 저장하였다. 저장된 절화는 온도 12℃, 습도 70%, 광도 $22\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 하에서 12시간 광 처리 조건의 꽃 냉장고에 저장하였다.

② 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체 절화의 잎 노화 검정

국화 형질전환체 절화 잎의 엽록소 함량은 엽록소 간이 측정기(SPAD-502, Minolta)를 사용하여

일주일 간격으로 4주 간 측정하였다. 측정위치는 성장점으로부터 13, 14, 15번째 잎의 주맥을 중심으로 엽맥이 포함되지 않도록 좌, 우 그리고 엽병에서 멀리 떨어진 부분을 측정하였다. 측정 기간은 일주일 간격으로 측정하였으며 총 5주 간 측정하였다.

제 2 절. 수명연장 관련 유용 유전자 발굴

1. 기확보 수명연장 관련 유전자의 기능 재검정

본 사업에 적용한 기확보 유전자의 기능 재검정은 다음의 4가지 유전자에 대하여 수행하였다.

가. *ORE12*(Oresara12, At1g27320)와 *ORE15*(Oresara15, At2g31040)

식물의 노화 지연에 대한 표현형적 특징을 가지는 *ORE12*와 *ORE15*의 기능을 재검정하기 위하여 본 연구팀은 2X 35S promoter를 가진 pNB96 벡터를 적용한 *ORE12* 과발현 애기장대와 35S promoter를 가진 pCAMBIA3301 벡터를 적용한 *ORE15* 과발현 애기장대를 제작하고 그들의 노화 지연에 대한 표현형을 조사하였다.

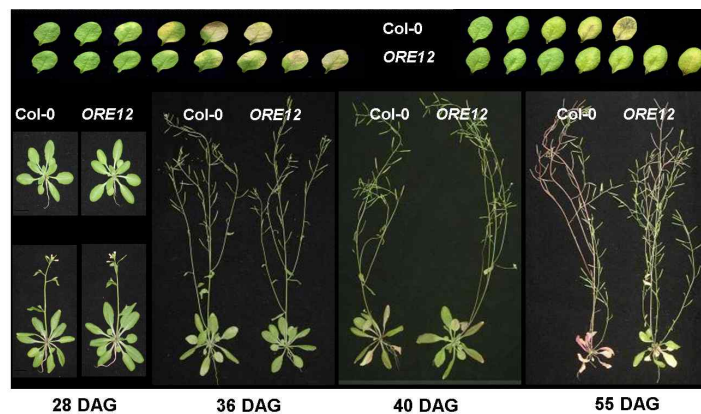


그림 15. *ORE12* 유전자의 과발현으로 인한 애기장대의 수명연장 표현형적 특징

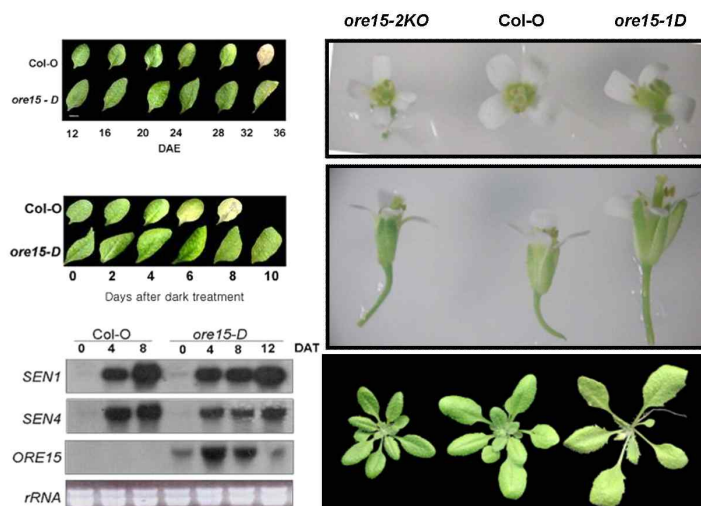


그림 16. *ORE15* 유전자의 과발현으로 인한 애기장대의 수명연장 및 개체 크기 성장에 대한 표현형적 특징

ORE12 과발현 애기장대는 앞선 결과와 마찬가지로 age-dependent senescence와 dark-induced

senescence에 대해 노화 지연의 표현형적 특징을 가졌으며, 특히 전화 식물에 대한 강력한 수명 연장의 표현형적 특징을 가졌다(그림 15). 한편 *ORE15* 과발현 애기장대는 노화 지연과 더불어 성장 촉진, 식물 기관의 크기 증가 등과 같은 표현형적 특징을 가졌으며(그림 16), 이러한 연구 결과는 앞선 유전자의 특징과 같은 결과를 나타내었다. 따라서 본 과제에서는 식물의 수명 연장에 대한 표현형적 특징을 가지는 *ORE12*와 *ORE15* 유전자를 국화 형질전환체 개발에 적용하였다.

나. *AtGA2ox4*

(1) 애기장대로부터 지베렐린 대사 작용 관련기능을 갖는 *AtGA2ox4* 발굴: 본 연구팀은 slender seedling 표현형을 가지는 GIR113765 라인으로부터 *AtGA2ox4* 유전자를 동정하였으며, 본 유전자의 기능을 보다 자세히 분석하기 위하여 sense 그리고 antisense construct를 제작하여 direct approach를 통하여 표현형 분석을 수행하였다. pSEN-*AtGA2ox4* 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조군(*AtGA2ox4* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 비교하여 볼 때, 놀랍게도 식물의 전 기관에 걸쳐 왜화 현상이 유도되었으며, 형질전환 개체에서 이러한 왜화 현상의 정도의 차이는 유전자의 과발현이 개체마다 다르게 나타남에 기인하는 것으로 판단된다. 한편 pSEN-anti*AtGA2ox4* 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조군과 비교하여 볼 때, 부분적으로 slender seedling 표현형을 가지기는 하나 크게 표현형 변화가 유발되지 않았다. 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 발아 후 30일째(그림 17), 그리고 40일째(그림 18) 수행하였다.

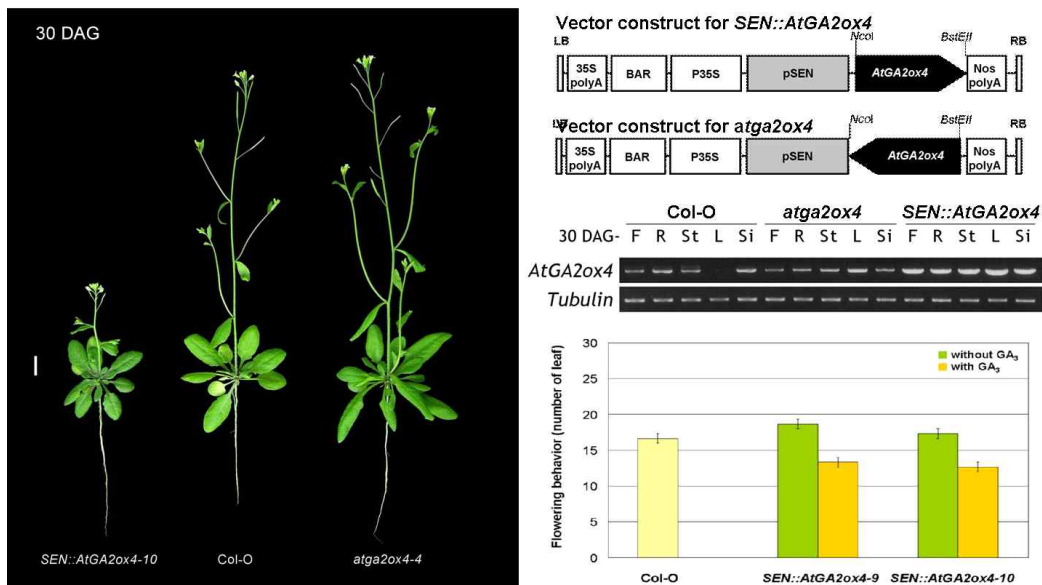


그림 17. Phenotypic characterization of T₂ transgenic plants transformed with the 'sense' (SEN::AtGA2ox4) and 'antisense' (*atga2ox4*) construct for *AtGA2ox4* gene during 30 days after germination, gene expression in the various organs and flowering time of the plants (n=15). DAG, days after germination; Scale bar, 1 cm; F, flowers; R, roots; St, stems; L, leaves; Si, siliques.

pSEN-AtGA2ox4 구성체를 가지고 있는 *SEN::AtGA2ox4-10* 변이체 라인은 Col-O(애기장대 야생형)과 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 잎과 줄기 등 대부분의 기관에서 왜화 현상이 유도되었으며, 이러한 왜화 현상은 개체마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 유전자의 과발현이 개체 마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 그러나 뿌리 발달에 있어선 야생형과 비교해 보았을 때, 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 또한 식물의 개화 시기에 있어서도 야생형과 큰 차이가 없음을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 변이체의 왜화 현상은 C₁₉-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 *AtGA2ox4*의 과발현으로 인해 활성 지베렐린의 불활성 지베렐린으로의 전환으로 인하여 활성 지베렐린의 함량 부족에 기인하는 것으로 추측된다. 한편 pSEN-antiAtGA2ox4 구성체를 가지고 있는 *atga2ox4-4* 변이체 라인은 애기장대 야생형과 비교하여 볼 때, 전체적으로 약간 길고 가느다란 표현형을 가지고 있으며, 줄기가 조금 더 신장된 것으로 나타났다. 그러나 전체적으로 볼 때 *atga2ox4-4* 변이체 라인의 표현형은 애기장대 야생형 표현형과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 *AtGA2ox4* 유전자의 발현 억제가 야기한 활성 지베렐린의 함량 증가가 GA 20-oxidase와 GA 3-oxidase의 feedback 메커니즘에 의하여 조절됨으로써 변이체의 표현형 변이가 크게 유발되지 않는 것으로 추측된다. *AtGA2ox4* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 왜화 현상은 타 작물의 생산성 증대에 적용할 수 있는 중요한 요인으로 작용할 수 있을 것이다.

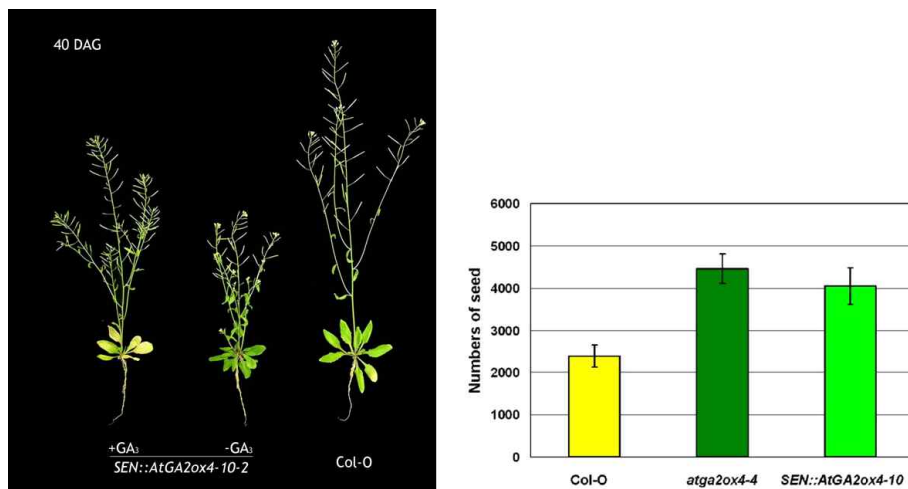


그림 18. Phenotypic characterization of T2 transgenic plants transformed with the 'sense' (*SEN::AtGA2ox4*) and 'antisense' (*atga2ox4*) construct for *AtGA2ox4* gene during 40 days after germination, and numbers of seed in the plants (n=15). DAG, days after germination.

(2) *AtGA2ox4* 과발현 변이체의 수명 연장 및 생산성 증대에 대한 특성 분석: 특히 흥미로운 점은 왜화 현상이 유발되는 변이체 라인들이 노화 지연의 특성 및 생산성 증대의 표현형을 가진다는 것이다. 그림 19에서 보는 바와 같이, pSEN-AtGA2ox4 구성체를 가지고 있는 *SEN::AtGA2ox4-10* 변이체 라인은 Col-O(애기장대 야생형)과 비교하여 볼 때 노화의 지연이 뚜렷하게 나타났으며 종자 생산성에 있어서 오히려 증가하는 현상을 보였다. 이러한 *AtGA2ox4* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 왜화 현상은 타 작물의 노화 연장 및 생산성 증대에 적용할

수 있는 중요한 요인으로 작용할 수 있다. 그림 20에서 종자의 수는 1 개체 당 생산된 종자의 수를 의미한다.

(3) *AtGA2ox4* 과발현 변이체의 GA 대사 관련 유전자 발현 분석: 왜화 표현형을 가지는 *SEN::AtGA2ox4* 변이체의 GA 2-oxidase 관련 유전자와 개화 관련 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 발아 후 30일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *SEN::AtGA2ox4* 변이체의 꽃, 뿌리, 줄기, 잎, 그리고 silique으로부터 전체 RNA를 각각 추출하여 그들의 발현 양상을 조사해 본 결과, 그림 19와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 먼저 *AtGA2ox4* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 애기장대 야생형에서는 꽃, 뿌리, 줄기, 그리고 silique에서 유전자 발현이 나타난 반면, 잎에서는 유전자의 발현의 거의 나타나지 않았다. 그리고 유전자의 발현 정도를 관찰해 보면 줄기에서의 발현이 꽃, 뿌리, 그리고 silique에서의 그것 보다 약하다는 것을 알 수 있다. 이러한 사실을 통하여 본 유전자의 작용이 정상적인 식물에서는 source 기관인 잎에서는 거의 이루어지지 않고 이동 기관인 줄기를 포함하여 꽃, 뿌리, 그리고 silique 등과 같은 sink 기관에서 주로 이루어지고 있을 것으로 추측된다. 한편 *SEN::AtGA2ox4* 변이체의 경우, 야생형에 비하여 모든 기관에서 유전자의 발현이 증가하였으며, 특히 잎에서는 야생형에서는 거의 발현이 되지 않는데 비하여 변이체에서는 엄청난 유전자 발현 정도를 나타내었다. 이러한 사실로 미루어 보아 식물체에서 pSEN-AtGA2ox4 구성체를 통한 *AtGA2ox4*의 과발현 기작은 source 기관인 잎에서 일어나며, 이러한 잎에서의 유전자 과발현 기작을 통하여 주로 잎에서 다양한 대사 작용이 유도되어 식물의 왜화 현상을 유발하는 것으로 추측된다.

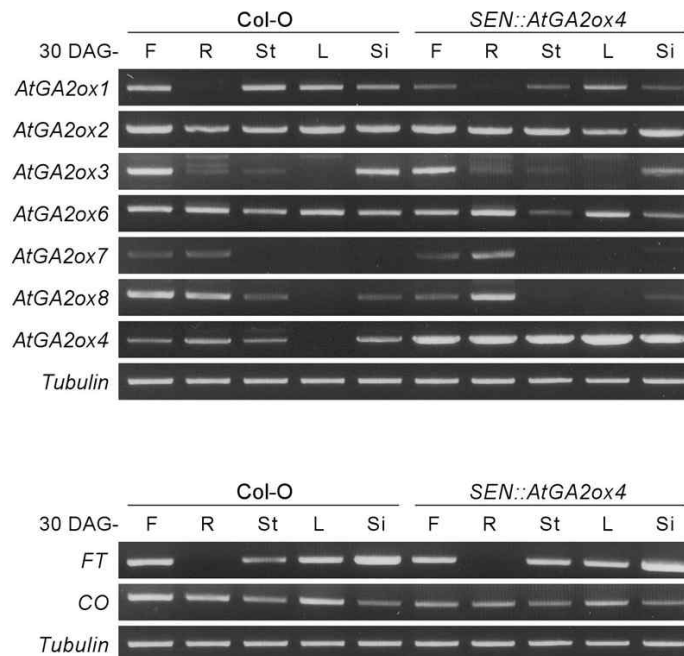


그림 19. Transcript accumulations for GA 2-oxidase-related genes and flowering time-related genes in the various organs of *Arabidopsis* Col-0 and *SEN::AtGA2ox4* plants. F, flowers; R, roots; S, stems; L, leaves; Si, siliques.

*AtGA2ox4*의 과발현에 의한 애기장대 GA 2-oxidase 관련 유전자의 발현 양상을 비교해 보면 다음과 같다(그림 20). C₁₉-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 유전자 집단에서 전 기관에서 발현되는 *AtGA2ox2*와 *AtGA2ox6*의 발현은 야생형과 변이체 사이에서 큰 차이를 나타내지 않았으나, *AtGA2ox2*의 경우 잎에서의 발현은 변이체에서 조금 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 뿌리에서 발현이 거의 없는 *AtGA2ox1*의 경우 야생형과 변이체를 비교하였을 때, 변이체에서 잎과 줄기에서 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 잎에서 발현이 거의 없는 *AtGA2ox3*의 경우 줄기에서 발현이 감소하는 것을 알 수 있었다. 한편 C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 유전자 집단에서 *AtGA2ox7*의 경우 꽃과 뿌리에서 특이적으로 발현되며, *AtGA2ox8*의 경우 꽃과 뿌리에서 발현의 정도가 높은 반면 줄기와 silique에서는 상대적으로 발현의 정도가 낮았다. 이러한 유전자의 발현은 *AtGA2ox4*와 마찬가지로 잎에서는 거의 나타나지 않았다. 이러한 유전자에 대한 발현 정도를 야생형과 변이체를 비교하였을 때, *AtGA2ox7*의 경우 변이체에서 뿌리에서의 발현 증가를 유발되었으며, *AtGA2ox8*의 경우 *AtGA2ox7*와 마찬가지로 변이체에서 뿌리에서의 발현 증가 현상이 나타났으며, 특이한 점은 줄기에서의 발현은 변이체에선 감소 현상이 유발된다는 것이다. C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 과발현은 애기장대에서 본 유전자인 *AtGA2ox8*와 마찬가지로 왜화 현상을 유발한다고 알려지고 있다 (Schomburg *et al.*, 2003). 상기 연구 결과를 분석해 보면 C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 과발현은 주로 sink 기관인 뿌리에서 다양한 대사 작용을 유발하여 왜화 현상을 유발하는 반면, C₁₉-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 본 유전자인 *AtGA2ox4*의 과발현은 주로 source 기관인 잎에서 다양한 대사 작용을 유도하여 왜화 현상을 유발하는 것으로 제안할 수 있을 것이다. 그리고 C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 발현은 직접적이든, 간접적이든 *AtGA2ox4*의 발현에 의해 조절을 받을 것으로 추측되며, 이러한 제안은 식물체의 왜화 현상 유도가 본 유전자에 의해 단독적으로 일어나는지 아니면 본 유전자와 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 상호 작용의 의해 일어나는지에 대해 보다 많은 연구를 필요로 할 것이다.

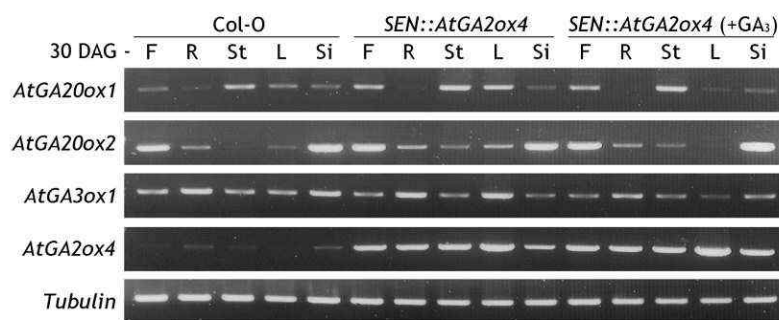


그림 20. Transcript accumulations for feedback mechanism-related genes of GA metabolism in the various organs of *Arabidopsis* Col-0 and *SEN::AtGA2ox4* plants. F, flowers; R, roots; S, stems; L, leaves; Si, siliques.

한편 본 유전자가 지베렐린 대사 작용에 있어서 feedback mechanism에 관여하고 최종적으로 지베렐린 이화 작용에 관여하는지를 확인하기 위하여 *SEN::AtGA2ox4* 변이체에서 GA20-oxidase를

coding하는 *AtGA20ox1*과 *AtGA20ox2*, 그리고 GA3-oxidase를 coding하는 *AtGA3ox1*에 대한 유전자 발현을 조사하였다. 그림 21에서 보는 바와 같이 *SEN::AtGA2ox4* 변이체는 야생형에 비하여 이들 유전자에 대한 발현이 모두 증가하였으며, 세부적으로 조사해 보았을 때, 특히 잎에서의 상기 유전자의 발현이 모두 증가되었으며, 이러한 유전자 발현은 모두 GA₃가 처리되었을 때 야생형의 유전자 발현 수준으로 회복됨을 알 수 있었다. 이러한 현상을 분석해 보면, *AtGA2ox4*의 과발현은 식물체내 지베렐린 함량 부족 현상을 유발하고, 이와 같은 활성 지베렐린 함량 부족은 지베렐린 합성 유전자의 발현을 유도하는 것으로 확인할 수 있었다. 따라서 본 유전자가 지베렐린 이화 작용에 관여함을 알 수 있었으며, 본 유전자에 의한 활성 지베렐린 함량 부족은 지베렐린 합성 유전자의 발현을 유도하는 것으로 사료된다. 또한 이와 같은 유전자 발현 조절의 대부분이 잎에서 조절되는 것으로 추측된다.

(4) *AtGA2ox4* 과발현 변이체의 GA₃에 의한 표현형 회복: 앞서 언급한 바와 같이 *AtGA2ox4* 유전자가 지베렐린 이화 작용에 관여하는 GA 2-oxidase 효소 기능을 가진다고 제안됨에 따라, 실질적으로 *AtGA2ox4* 유전자가 지베렐린 이화 작용에 관여하는 지를 확인하기 위하여 왜화 현상 표현형을 가지는 *SEN::AtGA2ox4-9*와 *SEN::AtGA2ox4-10* 라인을 재료로 하여 10⁻⁴ M GA₃의 농도로 발아 후 12일부터 1주일 간격으로 총 2회 시비하여 총 30일 동안 생육하였다. 이와 같은 활성 지베렐린인 GA₃의 처리는 *AtGA2ox4* 유전자의 과발현으로 인하여 활성 지베렐린의 함량 감소를 유발하여 생성된 왜화 표현형 변이체의 활성 지베렐린의 함량 회복을 통하여 애기장대 야생형과 같은 표현형의 회복을 유발할 것이다. GA₃를 처리한 왜화 변이체와 처리하지 않은 변이체를 비교해 보았을 때, GA₃를 처리하지 않은 변이체 라인들의 표현형은 앞서 언급한 바와 같이 왜화 현상 표현형을 나타내었으며 유전자 발현 정도의 차이에 따라 왜화 현상의 차이를 가지고 있었다. 그런 반면 GA₃를 처리한 *SEN::AtGA2ox4-9*와 *SEN::AtGA2ox4-10* 라인의 표현은 놀랍게도 거의 야생형 수준으로 표현형이 완벽하게 회복됨을 볼 수 있었다. 심지어 왜화 현상이 심하게 나타나는 *SEN::AtGA2ox4-10* 라인도 GA₃의 처리로 인하여 거의 야생형과 같은 표현형 회복을 나타내었다. 한편 본 유전자의 과발현으로 인한 왜화 표현형을 가진 변이체들은 개화 시기에 있어선 야생형과 큰 차이가 없었으며, 이러한 현상은 GA₃를 처리한 변이체에서도 야생형과 큰 차이를 가지지 않았다(그림 21).

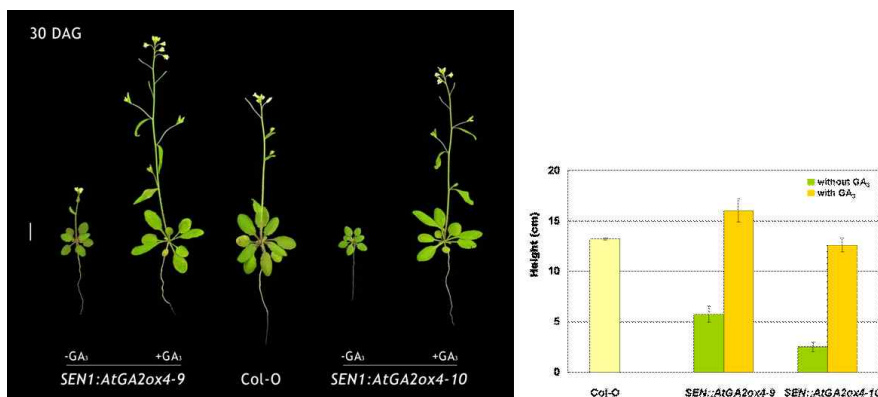


그림 21. Responses of *SEN::AtGA2ox4-9* and *SEN::AtGA2ox4-10* mutants against GA₃ treatment at 30 DAG (days after germination), respectively (n=6). For application for GA to plants growing on soil, 10⁻⁴M GA₃ was sprayed once a week. (Bar=1 cm).

이러한 사실로 미루어 보아 본 유전자는 식물의 왜화 현상 조절에 중요한 역할을 담당하는 반면 개화 시기 조절에 있어선 그 역할이 크지 않은 것으로 추측된다. 따라서 상기 *AtGA2ox4* 유전자에 대한 센스 구성체로 형질전환된 식물체가 GA₃ 요구 돌연변이체임을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 유전자의 폴리뉴클레오티드가 개화시기 조절이 필요치 않고 왜화 현상만을 요구하는 신기능성 작물 개발을 위한 좋은 표적이 될 수 있음을 시사한다.

표 2. GAs contents of *AtGA2ox4*-overexpressed *Arabidopsis* (n=3)

	GA12	GA53	GA19	GA20	GA1	GA3	GA24	GA9	GA4
Col	15.19	1.91	12.87	0.75	0.8	2.43	21.41	27.41	17.4
<i>AtGA2ox4-9-1</i>	9.59	1.17	14.14	4.11	1.88	2.92	14.63	2.37	7.75
<i>AtGA2ox4-10-2</i>	9.18	1.15	17.76	2.22	1.05	2.01	17.55	2.723	7.38

(5) *AtGA2ox4* 과발현 변이체의 기질 특이성 분석: 본 연구팀은 *AtGA2ox4* 유전자가 지베렐린 이화 작용에 관여하는 GA 2-oxidase 효소 기능을 가진다고 제안됨에 따라, 실질적으로 *AtGA2ox4* 유전자가 어떤 종류의 GA가 기질 특이성을 가지는지를 확인하기 위하여 *SEN::AtGA2ox4-9*와 *SEN::AtGA2ox4-10* 라인으로부터 GA를 추출하고 GC를 통하여 분석하였다(표 2). 그 결과, *AtGA2ox4* 과발현 변이체는 GA12, GA24, GA9, 그리고 GA4에 대한 특이적 함량 변화를 가진 반면, GA53, GA19, GA20 그리고 GA1에 대해서는 야생형과 비교해 보았을 때 큰 차이를 가지지 못하였다. 이런 사실은 *AtGA2ox4*가 GA1 pathway가 아닌 GA4 pathway에 관여하는 것으로 추측된다(그림 22). 한편 *AtGA2ox4* 과발현 변이체는 GA4와 GA12에 비하여 GA9에서 현격한 감소 현상을 보였다. 따라서 *AtGA2ox4*는 GA4나 GA12보다 GA9에 훨씬 강력한 기질 특이성을 가지는 것으로 보인다. 이러한 사실을 종합해 보면, *AtGA2ox4*는 GA pathway에 있어서 GA4 pathway에서 주된 역할을 담당하며, GA4 pathway의 최종산물인 GA4보다 중간 산물인 GA9에 대하여 기질 특이성을 가지는 것으로 제시할 수 있다.

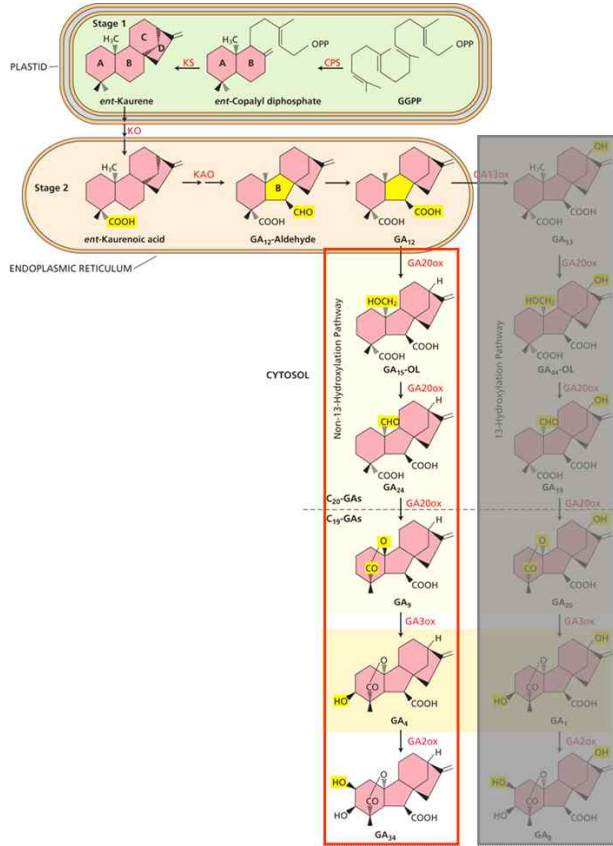


그림 22. Model of *AtGA20x4*-related GA pathway (red box)

다. *ATHG1* (AT-hook protein of Genomine 1, At4g19800)

(1) 애기장대로부터 수명연장 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATHG1* 유전자 발굴: 본 연구팀은 advanced RAM 변이체로부터 white-lethal, albinism 그리고 심각한 성장억제 등의 표현형적 특징을 가지는 GIR212709 변이체를 선별하였고, 본 변이체의 표현형은 At4G17800 유전자의 발현억제를 통하여 유발된 것으로 밝혔다. 본 유전자의 기능을 정확하게 분석하기 위하여 pCSEN 벡터를 사용하여 과발현체를 제작하여 그들의 특징을 분석하였다. pCSEN-*ATHG1* 벡터(그림 23A)로 형질전환된 T₁ 애기장대 *ATHG1 ox-5* 및 -6은 대조군(*ATHG1* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 발아 후 65일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 *ATHG1 ox-5* 및 -6 변이체들이 노화 지연의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 형질전환 개체에서 이러한 노화 지연 현상의 정도의 차이는 유전자의 과발현이 개체마다 다르게 나타남에 기인하는 것으로 판단된다(그림 23B). 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 제초제 저항성으로 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 60일째 수행하였다(그림 23C). pCSEN-*ATHG1* 구상체를 가지고 있는 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체 라인은 애기장대 야생형(Col-0)과 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 이러한 노화 지연 현상은 라인 마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 유전자의 과발

현이 라인 마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 아울러 이들 변이체들은 노화 지연 표현형뿐만 아니라 노화 지연동안 개체 크기와 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다.

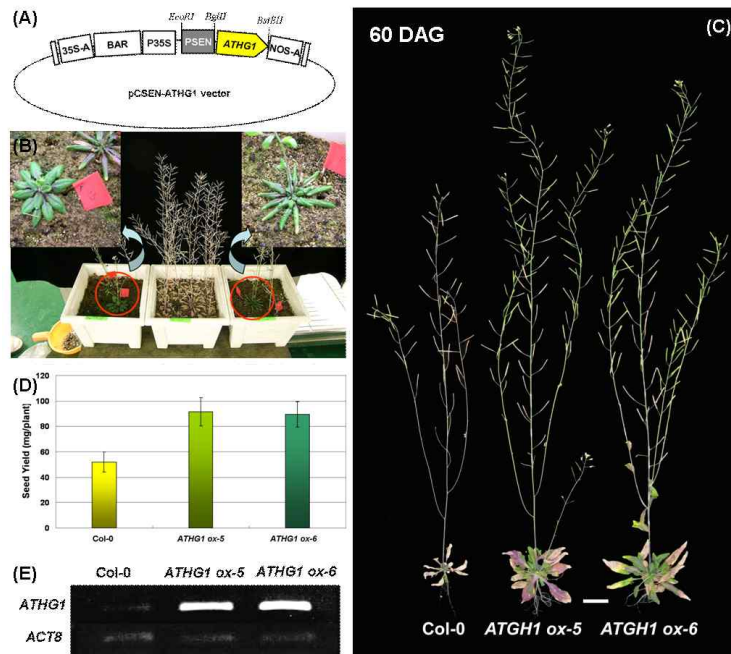


그림 23. *ATHG1* 과발현 벡터(A) 및 형질전환체의 표현형적 특징(B, C), 종자수확량(D), n=20, 그리고 유전자 발현(E)

ATHG1 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6*의 라인별 종자 수확량을 애기장대 야생형과 비교해 보았다. *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체 라인들은 모두 애기장대 야생형에 비하여 종자의 수확량이 약 1.8배 이상 증가하는 것으로 나타났으며, 이러한 사실은 *ATHG1* 유전자는 노화 지연을 통하여 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다(그림 23D). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 *ATHG1* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 발아 후 25일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체의 잎으로부터 전체 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 RT-PCR을 수행한 결과, 애기장대 야생형에 비하여 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체의 *ATHG1* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며(그림 23E), 이러한 사실은 본 변이체가 *ATHG1* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

(2) *ATHG1* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 대한 특성 분석: *ATHG1* 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T₂ 세대에서 발아 후 25일 이후부터 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 매 5일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 40일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 50일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATHG1 ox-5*와 *-6*의 경우 잎의 황화 현상이 55일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 60일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(그림 24A). 이러한 사실로 미루어보아, *ATHG1* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 노화에 따른 엽록소 함량 변화는 야생종의 경우 엽록소 함량이 발아 후 40일 이후부터 급격한 감소를 보이며 55일째 엽록소의 함량이 0%가 되었으나, *ATHG1 ox-5*와 *-6*의 경우 발아 후 55일이 되었을 때도 측정 초기의 40% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다(그림 24B). 엽록소 함량 변화와 더불어 광합성 효율 변화의 조사에서도 야생종은 발아 후 40일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 55일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATHG1 ox-5*와 *-6*의 경우 발아 후 60일까지 활성의 감소가 거의 일어나지 않았다(그림 24C). 상기 결과로부터, *ATHG1* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATHG1* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

야생종과 *ATHG1 ox-5*, *ATHG1 ox-6* 변이체에서 노화관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 각 노화관련 유전자들의 발현양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다. 노화 마커 유전자로는 *SAG12*, *SEN4* 및 *CAB2* 유전자를 사용하였으며, qRT-PCR 양성 대조구로는 *ACT8* 유전자를 사용하였다. 야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였다. 그러나 *ATHG1* 과발현 변이체, 특히 *ATHG1 ox-5* 변이체에서는 이들 유전자의 발현 감소 양상이 지연됨을 알 수 있었다. 한편, 노화단계에서 발현이 증가되는 유전자로 알려진 두 유전자, 즉 *SAG12* 및 *SEN4*와 같은 노화 관련 유전자들의 발현도는 야생종에서 발아 후 35일 이후 증가하여 45일째 최대의 발현치를 가지는데 비해, *ATHG1 ox-5* 변이체에서는 *SEN4*의 발현이 55일에 최대치를 나타냈으나 야생형의 발현 정도에는 훨씬 미치지 못하는 것으로 나타났다. 그리고 *ATHG1 ox-6*의 경우 *SEN4*의 발현이 55일째 약간 증가하는 것으로 나타났으나 그 발현 정도가 극히 미미한 것으로 보인다. 또한 *SAG12*의 발현에 있어서도 *ATHG1 ox-5*와 *-6* 변이체 모두는 발아 후 60일까지 거의 발현이 되지 않는 것으로 나타났다(그림 24D). 이러한 사실을 종합해보면 *ATHG1* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

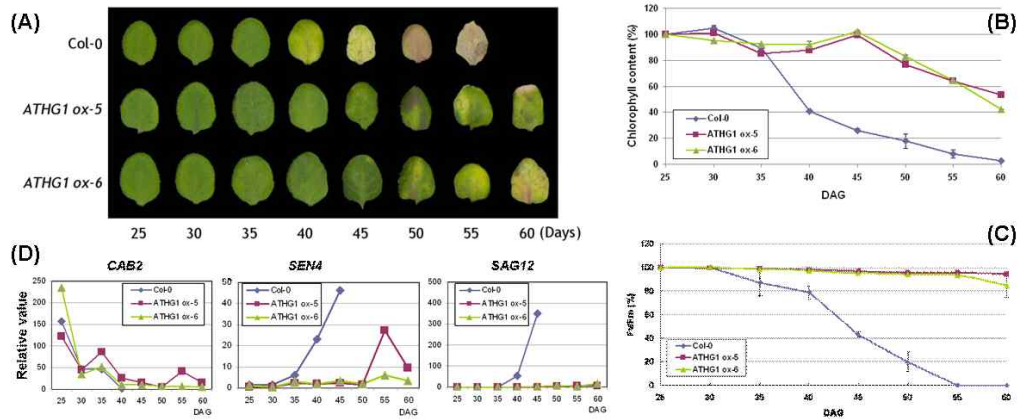


그림 24. ATHG1 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, n=6(B), 광합성 효율, n=6 (C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 ACT이며 각 수치는 ACT당 각 유전자 발현의 relative value(D)

(3) ATHG1 과발현 변이체의 세포 사멸 및 스트레스에 대한 특성 분석: ATHG1 과발현 변이체의 노화 진행에 따른 세포 사멸 및 H₂O₂의 축적을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 발아 후 25일째 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 detach하여 6일간 암상태에서 염색하였으며, 매 2일 간격으로 현미경 하에서 관찰하였다. 세포 사멸 분석은 TB(0.05% Lactophenol-Trypan blue) 염색 방법을 사용하였으며(Koch and Slusarenko, 1990), H₂O₂ 축적에 대한 분석은 DAB(3,3'-diaminobenzidine -4HCl, 0.05%, pH 5.8) 염색 방법(Thordal-Christensen *et al*, 1997)을 사용하여 현미경 하에서 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후 잎의 세포 사멸 및 H₂O₂의 축적이 급격하게 일어나 6일째 최대치를 이루었다. 이러한 사실은 잎의 노화 진행은 세포 사멸과 더불어 ROS의 축적, 특히 H₂O₂의 축적을 유발한다는 것을 알려주고 있다. 한편 ATHG1 과발현 변이체에서는 암처리 동안 세포 사멸 및 H₂O₂의 축적이 현저히 지연됨을 보여 주었다(그림 25A와 B). 따라서 ATHG1은 식물의 노화 지연을 통하여 세포 사멸 및 H₂O₂의 축적 지연을 유발하는 것으로 판단된다. ATHG1 과발현 변이체에서 나타나는 식물 잎의 노화 동안 유발되는 H₂O₂의 축적 감소가 실질적으로 외부 환경 스트레스의 하나인 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공하는지를 확인하기 위하여 외부 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형의 경우 H₂O₂ 처리 후 4일째 잎의 황화 현상 및 엽록소 함량 감소가 현저히 유발되는 반면, ATHG1 과발현 변이체에서는 4일째에도 잎의 황화 현상이 거의 유발되지 않았고 또한 엽록소 함량에 있어서도 초기 상태의 70% 이상을 유지하고 있었다(그림 25C와 D). 이러한 사실은 ATHG1이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

한편 본 유전자가 가뭄스트레스에 대해서도 저항성을 제공하는지를 확인하기 위하여 발아 후 30일된 ATHG1의 과발현 변이체를 13일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과 야생형 애기장대는 가뭄에 의해 잎의 황화 현상이 급속히 진행됨을 알 수 있었으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 가뭄에 의하여 초기 상태의 30% 이하로 현저히 감소함을

알 수 있었다. 그에 비하여 *ATHG1*의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 가뭄 처리에 의한 잎의 무게 감소가 거의 일어나지 않았다(그림 25E와 F). 이러한 사실은 *ATHG1*이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

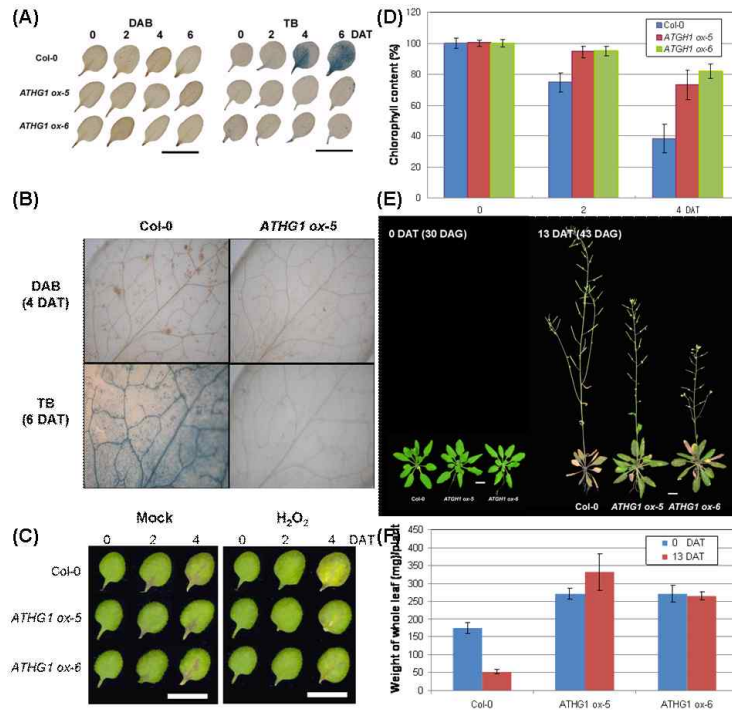


그림 25. *ATHG1* 과발현 형질전환체의 세포 사멸(A와 B), H_2O_2 스트레스에 대한 표현형적 특징 및 엽록소 함량, $n=6$ (C와 D), 그리고 가뭄 스트레스에 대한 표현형적 특징 및 잎 무게 변화, $n=6$ (E와 F)

(4) *ATHG1* 유전자의 세포내 위치 및 chromatin architecture에 대한 특성 분석: *ATHG1* 유전자의 염기서열로부터 유추되는 폴리펩티드 서열을 데이터베이스로 탐색한 결과, AT-hook 모티프를 가지고 있음이 관찰되었다. 이런 모티프들은 핵에서 다른 유전자의 발현을 조절하는 전사 조절자 또는 전사 인자에서 발견되는 모티프들이다. 따라서 본 발명자들은 본 발명의 *ATHG1* 단백질이 핵으로 이동하는지 여부를 확인하였다. 먼저 reporter gene으로 GFP를 함유하고 *ATHG1* 유전자가 삽입된 pCsV-*ATHG1*-GFP 벡터를 제작하였다. 이후 *ATHG1*의 세포내 위치를 확인하기 위해서 pCsV-*ATHG1*-GFP 벡터를 애기장대 원형질체에 transfection한 후 형광 현미경을 이용하여 관찰하였고, 핵의 위치 image는 DAPI (0.5ug/ul) staining 방법(Subramaniam *et al.*, 2001)을 통하여 확인하였다. 그 결과 *ATHG1::GFP*의 발현이 핵 속에서 초록 형광으로 나타남을 확인할 수 있었다(그림 26A). Auto에서 붉은 색으로 보이는 기관은 엽록체이다. 이러한 융합 단백질의 발현 부위가 핵임을 재확인하기 위하여 핵을 염색하는 DAPI를 이용하여 염색한 결과, *ATHG1::GFP*의 발현이 핵에서 나타남을 확인할 수 있었다(그림 26B). 이는 *ATHG1* 단백질이 핵으로 이동되어 핵 속에서 기능을 수행한다는 것을 보여주는 것이다.

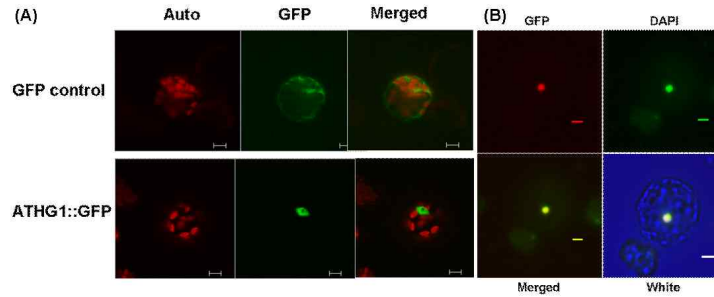


그림 26. Reporter 유전자 GFP를 이용한 *ATHG1*의 세포내 위치(A)와 DAPI를 통한 핵내 발현 확인(B)

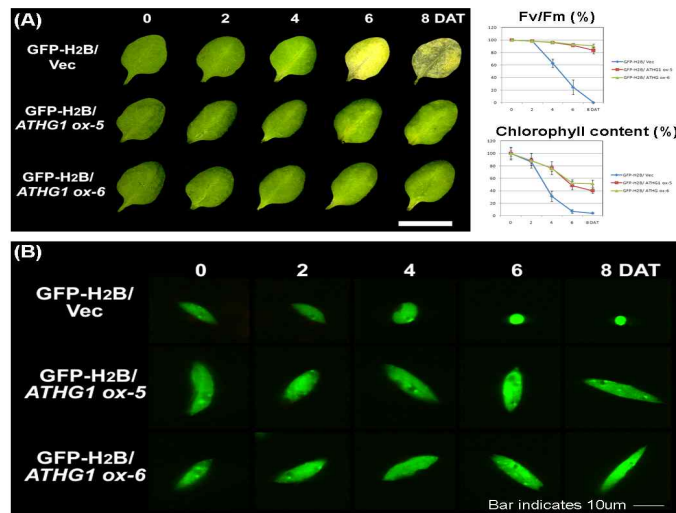


그림 27. Alteration of chromatin architecture by *ATHG1*. H2B-GFP 융합 식물체의 암-유도 노화과정(A)과 H2B-GFP 융합 단백질의 핵에서의 분포 패턴(B). The chromatin architectures were examined by following the distribution patterns of H2B-GFP fusion proteins that incorporate into chromatin. The patterns were examined by confocal microscopy of nuclei from the rosette leaves of transgenic *Arabidopsis*.

Histone2B (H2B)-GFP 융합 단백질은 포유 동물세포에서 염색체 dynamics를 분석하는데 있어서 sensitive한 기법으로 알려지고 있다(Kanda *et al.*, 1998). *ATHG1* 유전자가 chromatin architecture에서 어떤 기능을 담당하는지를 조사하기 위하여 H2B-GFP 융합 단백질을 발현하는 형질전환체를 생산하고, *ATHG ox* 변이체와 교배하였다. 암선 암처리에 의해 노화의 결과와 마찬가지로 융합 과발현 변이체는 대조구에 비하여 노화 지연에 대한 표현형적 특징이 뚜렷하였다(그림 27A). 이러한 노화 과정의 진행 동안 chromatin architecture를 조사한 결과, 대조구는 노화동안 핵에 골고루 분포되어 있는 형광 패턴이 점차적으로 응축되어 크기가 감소함을 보여주고 있으며, 이후 사멸 시기에 이러한 형광 패턴이 사라지는 것을 알 수 있었다. 그런 반면, 융합 과발현 변이체(H2B-GFP/*ATHG ox-5*와 -6)는 핵에 골고루 분포되어 있는 형광 패턴이 암처리 동안에도 크기의 변화 없이 여전히 균일한 분포를 가짐을 알 수 있었다(그림 27B). 이러한 사실로 미루어 보아 *ATHG1* 유전자는 핵에서 chromatin architecture를 조절함으로써 세포 사멸을 지연시

키고, 이러한 결과로 인해 노화 지연과 생산성 증대라는 표현형적 특징을 제공하는 것으로 판단된다.

2. 신규 수명연장 관련 신규 유전자 발굴 및 기능 검정

본 연구팀은 수명연장을 조절하는 기확보 유전자인 *ATHG1* 유전자의 AT-hook domain에 대한 phylogenetic tree를 이용한 기능 분석을 실시하였는데, AT-hook domain을 함유한 *ATHG1*, *ORE7* 그리고 *SOB3* 유전자의 공통적으로 노화지연에 대한 특징을 가지고 있었다. 따라서 본 연구팀은 AT-hook domain에 대한 direct approach를 수행하기 위하여 그림 28의 group I에서 4종의 유전자를 애기장대에서 분리하여 pCSEN 벡터를 사용하여 과발현시킨 후, 그들의 표현형적 특징을 분석하였다.

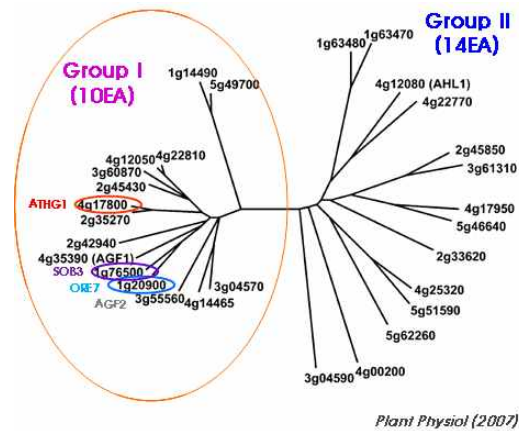


그림 28. AT-hook domain을 가지는 애기장대 유전자의 phylogenetic tree 분석

pSEN::ATPGs 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대를 일정 기간 동안 생육시킨 후 6일 동안 암 처리한 결과, 많은 ATPGs 유전자들이 식물의 노화 지연을 통한 수명연장이라는 특징을 제공하였다. 이러한 노화 지연 현상을 확인하기 위하여 T₂ transgenic 라인을 생산하여 6일 동안 dark-induced leaf senescence를 임의로 진행시켜 6일째의 엽록소 함량 및 표현형적 변화를 조사해본 결과, 대조구에 비하여 *ATPG3*, *ATPG6*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG10* 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. 따라서 본 연구팀은 수명연장 및 생산성 증대의 표현형적 특징을 가지는 *ATPG3*, *ATPG6*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG10*을 신규 유전자로 선정하고 이들에 대한 세부적인 연구를 수행하였다.

가. *ATPG3*(AT-hook protein of Genomine 3, At4g14465): 수명연장, 생산성 증대 및 스트레스 저항성 유전자

(1) 식물의 생산성 증대, 노화 지연 그리고 스트레스 내성을 제공하는 *ATPG3* 유전자 발굴: 애기장대의 AT-HOOK MOTIF NUCLEAR-LOCALIZED PROTEIN (GeneBank accession number NP_567432.1)의 염기서열을 기초로 하여 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머 (*PacI*/At4g14465 SOE-F, 5'-TTA ATT AAATGG CAA ACC CTT GGT GGA CG-3')와 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*XbaI*/At4g14465 SOE-R, 5'-TCT AGA TCA GTA AGG TGGTCT TGC GTG G-3')를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다. 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 29.5 kDa의 분자량을 갖는 281개의 아미노산을 암호화하는 846bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG3*(AT-hook protein of Genomine 3)으로 명명하였다.

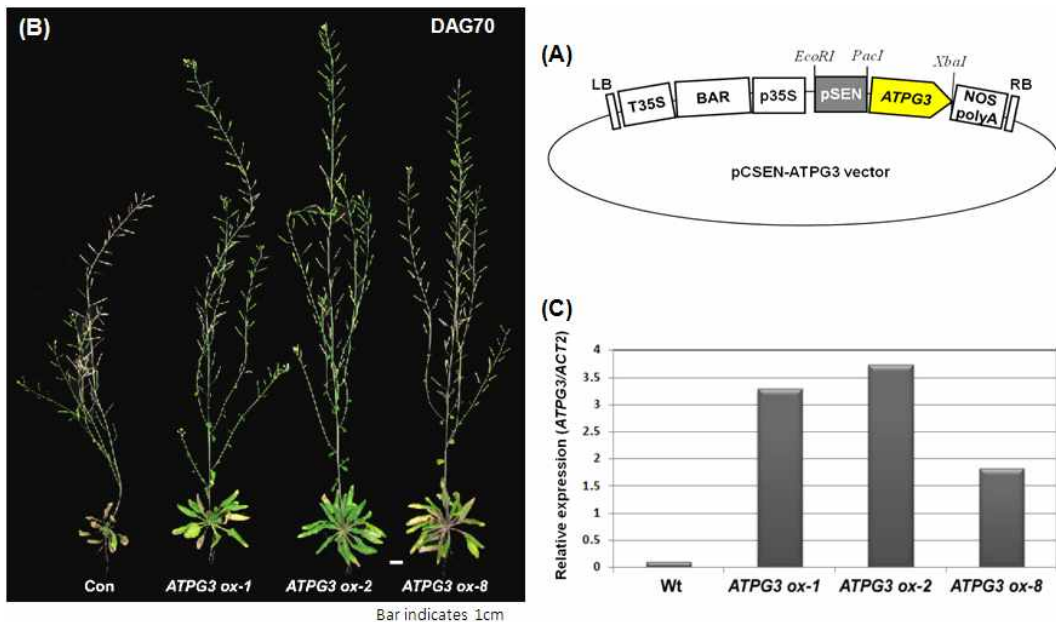


그림 29. *ATPG3* 과발현 벡터(A) 및 형질전환체의 표현형적 특징(B), 그리고 유전자 발현, 양성대조구는 *ACT*(C)

(2) *ATPG3* 과발현 애기장대의 표현형적 특징: 상기 유전자가 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 또한 노화 지연과 스트레스 내성을 제공하는지를 확인하기 위하여 *ATPG3* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG3* 전사체의 발현을 변화시켰다. 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머와 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 *ATPG3* 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 *ATPG3* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-ATPG3 재조합 벡터를 제작하였다(그림 29A). 상기 *SEN1* 프로모터는 식물의

생장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

상기 pCSEN-ATPG3 재조합 벡터로 형질전환된 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-ATPG3 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조군(ATPG3 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. pCSEN-ATPG3 구성체를 가지고 있는 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 수명 연장 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 흥미로운 점은 이들 변이체들은 개체 크기와 종자 생산량에서도 애기장대 야생형에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다(그림 29B). 이러한 수명 연장 현상과 생산성 증대는 라인 마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 유전자의 과발현이 라인 마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다(그림 29C).

선별된 노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 *ATPG3* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8* 변이체의 잎으로부터 전체 RNA를 각각 추출하여 cDNA를 합성하고, 이후 합성된 cDNA를 주형으로 하고, *ATPG3* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자에 대한 유전자 발현을 분석한 결과 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8* 변이체의 *ATPG3* 유전자의 발현이 전체적으로 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG3* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다(그림 29C).

(3) *ATPG3* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석: *ATPG3* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8*의 라인별로 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다(그림 30). 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.

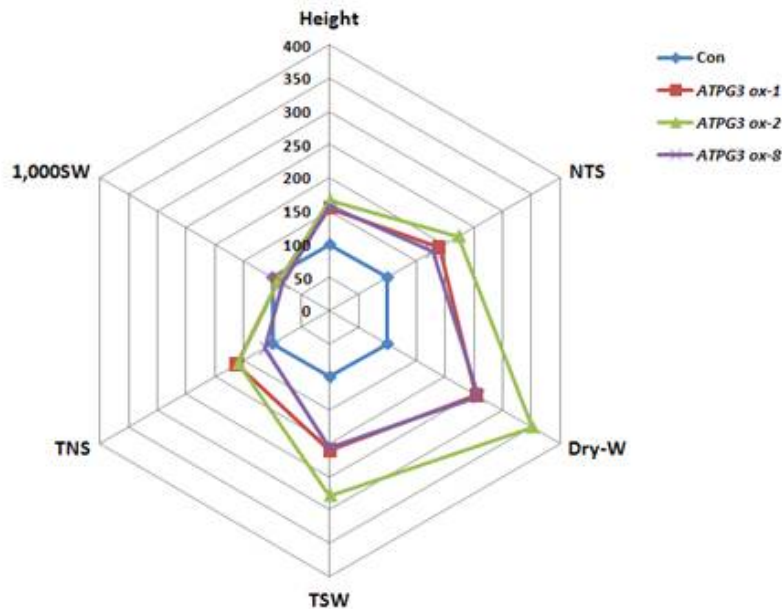


그림 30. *ATPG3* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; Dry-W, weight of plant after dry (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

ATPG3 ox-1, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 2배 이상 종자 무게에 있어서 증가하는 것으로 나타났으며, 또한 변이체의 장각과 수의 증가는 총 종자 무게의 양상과 유사하였다. 한편 종자 1,000개의 무게에는 변이체 전체는 대조구에 비하여 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자의 발현은 종자의 개체 크기가 아닌 전체 무게의 증가에 영향을 미치는 것으로 판단되며, 이러한 형질은 본 유전자가 화기 형성을 촉진하여 전체 장각과형성의 증가를 유도하여 결과적으로 전체 종자 무게의 증가를 유발하는 것으로 판단된다. 그리고 생체량과 생체 건량에 있어서도 과발현 변이체는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상을 가졌다. 이러한 사실은 *ATPG3* 유전자가 노화 지연과 더불어 개체 크기, 종자 크기 및 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하고, 그리고 과발현 변이체의 라인별 생산성 증대의 차이는 라인별 *ATPG3* 유전자의 발현 정도의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 본유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 효율 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

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 있다는 것이다.

이러한 결과를 종합해보면, *ATPG3* 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.

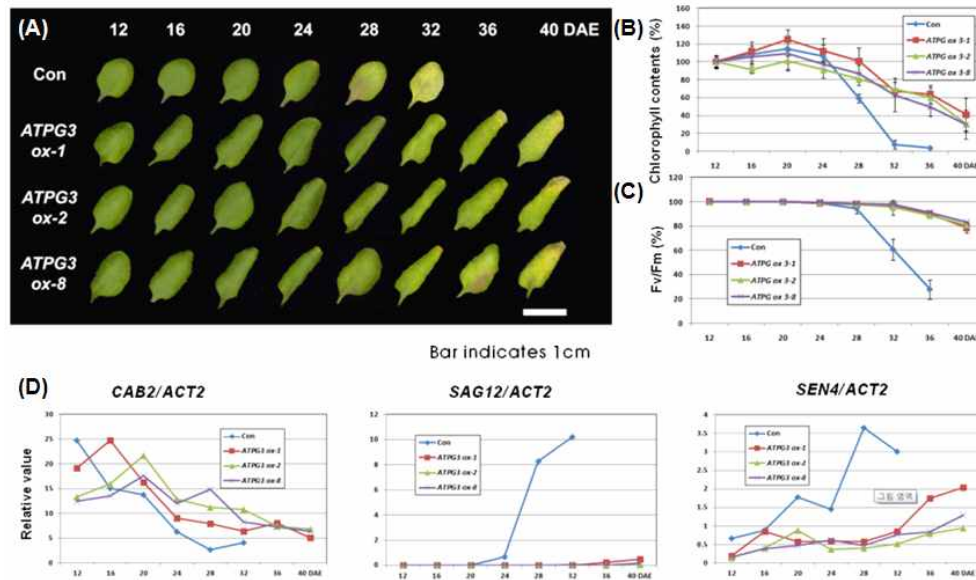


그림 31. *ATPG3* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, n=6(B), 광합성 효율, n=6(C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT2*당 각 유전자 발현의 relative level(D)

(4) *ATPG3* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 대한 특성 분석: 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰하였다. 그 결과, 야생종 야생형의 경우 28일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 36일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8*의 경우 잎의 황화 현상이 32일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일 이후부터 일어남을 확인할 수 있었다(그림 31A). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG3* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다.

엽록소는 80% (V/V) acetone을 사용하여 추출하였으며, 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, 그림 31B에 도시된 바와 같이, 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 최저치로 떨어졌으나, *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8*의 경우 자엽 생성 후 28일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 이상의 엽록소 함량을 보이며, 그 후 엽록소 함량의 감소가 천천히 일어남을 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. 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, 그림 31C에 도시된 바와 같이, 야생종은 자엽 생성 후 28일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 36일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8*의 경우 자엽 생성 후 40일에도 광합성 효율이 초기의 80%를 유지하고 있었다. 상기 결과로부터, *ATPG3* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG3* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

야생종과 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8* 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG3* 유전자와 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다. *ATPG3* 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 대조구조로는 *ACT2* 유전자를 사용하였다. 야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였으나, *ATPG3* 과발현 변이체들은 *CAB2*의 발현 감소가 지연되는 것으로 나타났다. 노화의 signal로 사용되는 *SAG12* 발현의 경우, 야생종은 28일과 32일째 최대 발현을 나타내는 반면, *ATPG3* 과발현 변이체들은 40일까지 증가 현상이 거의 나타나지 않았으며, 식물의 노화 동안 점진적으로 발현이 증가되는 것으로 알려진 *SEN4*의 발현은 야생종에서는 28일째 발현이 최대로 증가하는 반면, *ATPG3* 과발현 변이체들은 노화 초기 과정에서는 *SEN4*의 발현 증가가 크게 나타나지 않다가 36일 이후부터 발현 증가 현상을 나타냈다. 하지만 이러한 변이체의 *SEN4* 발현 정도는 야생형의 노화 동안의 발현 정도에 비하여 현저히 낮음을 알 수 있었다(그림 31D). 한편 *ATPG3* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 전체적으로 *ATPG3* 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 노화 전 과정 동안 발현 수준이 현저히 높으며 일부 구간에서 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(data not shown). 따라서 과발현 변이체들의 노화 지연 현상은 *ATPG3* 유전자의 과발현에 의해 유도되는 것으로 생각된다. 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG3* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

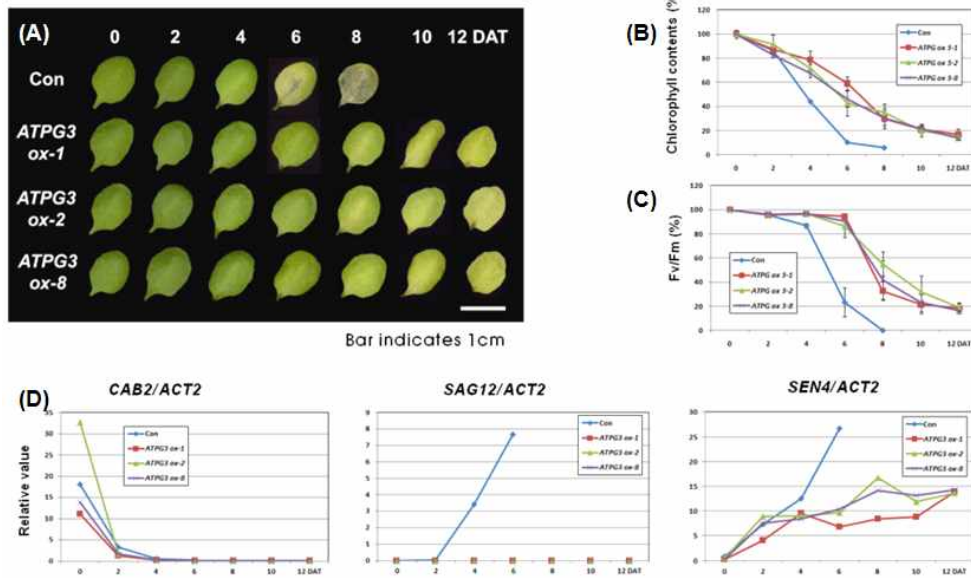


그림 32. *ATPG3* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, $n=6$ (B), 광합성 효율, $n=6$ (C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT*당 각 유전자 발현의 relative level(D)

(5) *ATPG3* 과발현 변이체의 암-유도 노화에 대한 특성 분석: 노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG3* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T_2 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 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암 처리 후 6일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8*의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 나타나며(그림 32A), 암 처리에 의한 노화 동안 엽록소 함량과 광합성 효율 변화에 있어서도 야생종에 비하여 *ATPG3* 변이체들은 정도의 차이는 있지만 엽록소 함량과 광합성 효율의 감소가 지연됨을 알 수 있었다(그림 32B와 C).

또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 조사하였다. 그 결과, 그림 32D에 도시된 바와 같이, 야생형에 비하여 *ATPG3* 변이체들은 *CAB2*의 발현 감소는 유사하였으나 *SAG12*의 발현은 지연되고, *SEN4*의 발현율은 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 보아 *ATPG3* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

(6) *ATPG3* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석: *ATPG3* 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 가

몸에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 그림 33A와 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 *ATPG3* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG3*이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

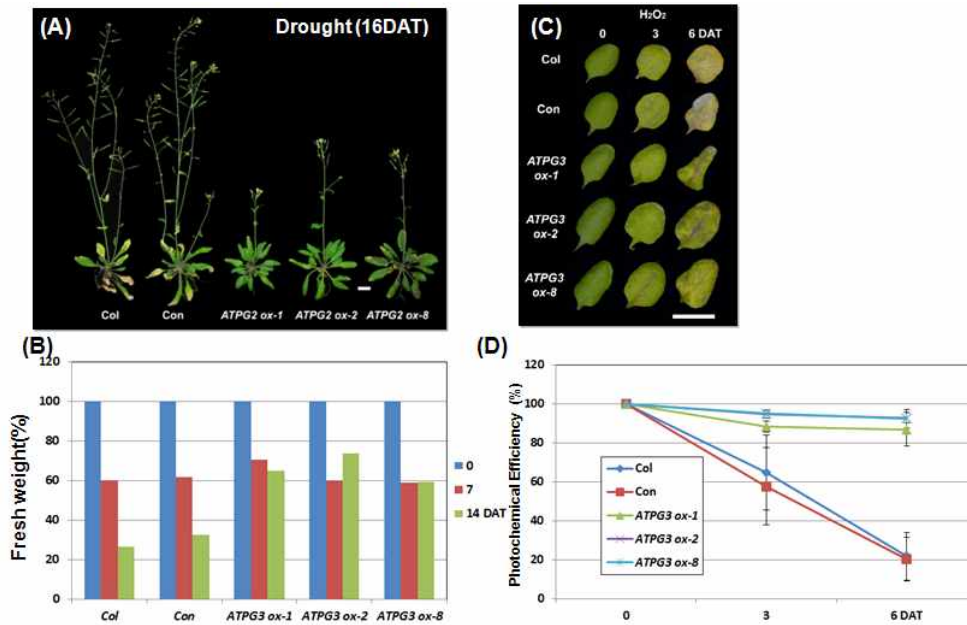


그림 33. *ATPG3* 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화 n=6(B), 그리고 H_2O_2 스트레스에 대한 표현형적 특징(C) 및 광합성 효율 변화, n=6(D)

ATPG3 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 *ATPG3* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량(data not shown) 및 광합성 효율의 감소, 특히 광합성 효율의 감소가 지연됨을 확인할 수 있었다(그림 33C와 D). 이러한 사실은 *ATPG3*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

따라서 *ATPG3* 유전자는 식물의 생산성 증대와 수명연장뿐 만 아니라 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성도 제공하여 스트레스 저항성을 가진 생산성증대 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

나. *ATPG6*(AT-hook protein of Genomine 6, At2g45430): 생산성 증대, 스트레스 저항성 및 수명 연장 유전자

(1) 식물의 생산성 증대, 스트레스 저항성 그리고 수명 연장을 제공하는 *ATPG6* 유전자 발굴: 애기장대의 *AHL22* (AT-hook motif nuclear-localized protein 22, GeneBank accession number NP_182067.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머(*PacI*/2g45430 SOE-F, 5'-TTA ATT AAA TGG ATC AGG TCT CTC GCT CTC-3')와 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*XbaI*/At2g45430 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA GAA AGA TGG TCT CGG AGT 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 33.5 kDa의 분자량을 갖는 317개의 아미노산을 암호화하는 954bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG6*(AT-hook protein of Genomine 6)으로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 *ATPG6* 단백질의 등전점(isoelectric point)은 6.97로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "*ATPG6*" 혹은 "*ATPG6* 유전자"라 하고, 단백질은 "*ATPG6*" 혹은 "*ATPG6* 단백질"이라고 한다).

(2) *ATPG6* 과발현 애기장대의 표현형적 특징: *ATPG6* 유전자가 식물의 생산성 증대와 스트레스 내성 기능을 가지고 또한 노화 지연 기능을 가지는지를 확인하기 위하여, 먼저 *ATPG6* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG6* 전사체의 발현을 변화시켰다.

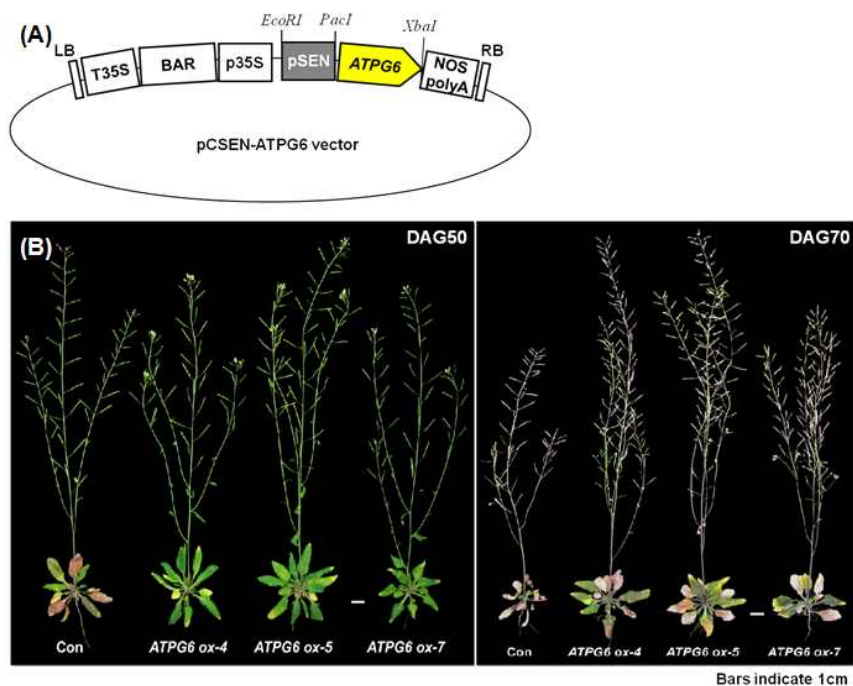


그림 34. *ATPG6* 과발현 벡터(A) 및 발아 후 50일째와 70일째 생육한 형질전환체의 표현형적 특징(B)

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 *ATPG6* 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 *ATPG6* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

한편, 그림 34A는 pCSEN 벡터에 *ATPG6* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터를 도시한 그림이다. 그림에서 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.

상기 pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T1)를 수확하였다. 대조군으로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *ATPG6* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

pCSEN-*ATPG6* 벡터로 형질전환된 T1 애기장대는 대조군(*ATPG6* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 변이체들은 뚜렷한 개체 크기 및 종자 수확량 증가와 같은 생산성 증대와 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 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 34B). pCSEN-*ATPG6* 구성체를 가지고 있는 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 생산성 증대 현상이 뚜렷하게 나타났으며 흥미로운 점은 이들 변이체들은 야생형에 비하여 50일째와 70일째 모두 개체 크기 증가 및 장각과 형성과 종자 생산량 증가 등의 생산성 증대에 대한 뚜렷한 표현형적 특징을 나타내었다. 한편 이들 변이체 모두 노화 지연의 표현형적 특징이 70일째 명확하게 나타났으며, 이러한 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특징은 라인마다 조금의 차이를 가지고 있었다. 이러한 차이는 아마 변이체 라인별로 유전자의 과발현 정도 차이에 기인하는 것으로 추측되며, 이러한 유전자 발현 정도의 차이에 의한 표현형적 특징은 앞서 출원한 AT-hook 도메인을 가지는 *ATPG4* 유전자의 특성과 같을 것으로 추측된다(이동희 등, PCT 특허출원 PCT/KR2012/008798, 2012).

(3) *ATPG6* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석: *ATPG6* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체의 생산성 증대에 대한 특성을 확인하기 위하여 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7*의 라인별로 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대

조구와 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.

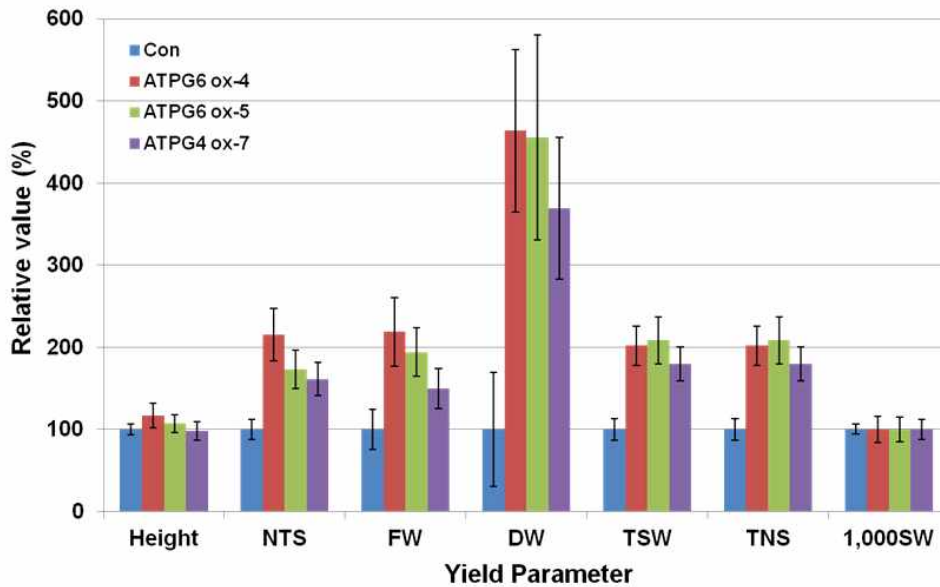


그림 35. *ATPG6* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant (g); DW, dry weight of plant (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number: 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

ATPG6 ox-4, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 종자 생산이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5* 변이체 라인들은 종자 생산량이 200% 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 종자 생산의 증가는 조금은 차이가 있으나 변이체의 장각과 생산 증가와 비례하는 것으로 보아 본 유전자가 장각과 형성을 촉진함으로써 종자 생산량 증가를 제공하는 것으로 사료된다. 한편 종자 1,000개의 무게에서 변이체 전체는 대조구에 비하여 큰 변이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자의 발현은 종자의 개체 크기가 아닌 전체 무게의 증가에 영향을 미치는 것으로 판단되며, 이러한 형질은 본 유전자가 화기 형성을 촉진하여 전체 장각과 형성의 증가를 유도하여 결과적으로 전체 종자 무게의 증가를 유발하는 것으로 판단된다. 그리고 생체량과 생체 건량에 있어서도 과발현 변이체는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상을 가졌다. 흥미로운 사실은 이들 변이체 모두 생체량에 비하여 생체건량에 있어서 엄청난 증가 현상은 가진다는 것이다. 이러한 사실로 미루어 보아 본 유전자 발현은 생체건량 증가와 같은 바이오매스 증대에 효과가 있음을 시사한다. 상기의 내용을 종합해보면 *ATPG6* 유전자가 종자 생산량 증가와 더불어 생체량/생체건량 증가와 같은 바이오매스 증가와 같은 작물의 생산성 증대를 유발하며(그림 35), 한편 이러한 과발현 변이체의 라인별 생산성 증대에 대한 차이는 라인별로 *ATPG6* 유전자의 발현 정도의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 타 작물에 대한 적용은 생산성 증대라는 측면에서 효용 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

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

이러한 결과를 종합해보면, *ATPG6* 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. 이러한 유전자 발현 정도의 차이에 의한 생산성 증대의 농업 형질 특징은 앞서 발표한 AT-hook 도메인을 가지는 *ATPG4* 유전자의 특성과 같을 것으로 추측된다(이동희 등, PCT 특허출원 PCT/KR2012/008798, 2012).

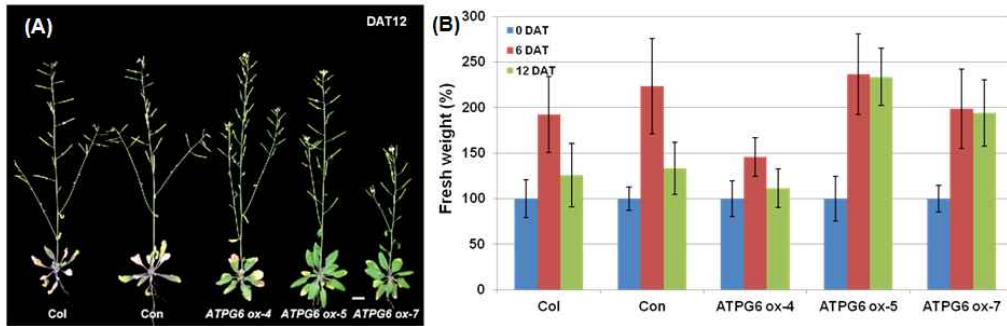


그림 36. *ATPG6* 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화 n=6(B)

(4) *ATPG6* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석: *ATPG6* 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일 된 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 36A와 B에 도시되었으며, 제시된 값은 라인별로 각 6개체의 평균값±표준편차이다. 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 *ATPG6* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 특히 *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7* 변이체 라인들은 *ATPG6 ox-2* 변이체 라인에 비하여 훨씬 높은 가뭄 스트레스 저항성을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 *ATPG6* 유전자의 높은 발현은 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 유도한다는 것을 의미한다.

ATPG6 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H₂O₂를 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 라인별로 각 6개체 이상을 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 측정 은 오 등의 방법(*Plant Mol. Biol.* 30:939, 1996)에 따랐다.

구체적으로 각 DAE(day after emersion)의 잎을 15분간 암 처리한 후, 식물 효율 분석기(Plant Efficiency Analyzer)(Hansatech)를 이용하여 엽록소의 형광을 측정하였고, 광합성 효율은 엽록소의 형광도 특성을 이용한 PS II (photosystem II)의 광화학적 효율(photochemical efficiency)로 나타 내었는데, 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.

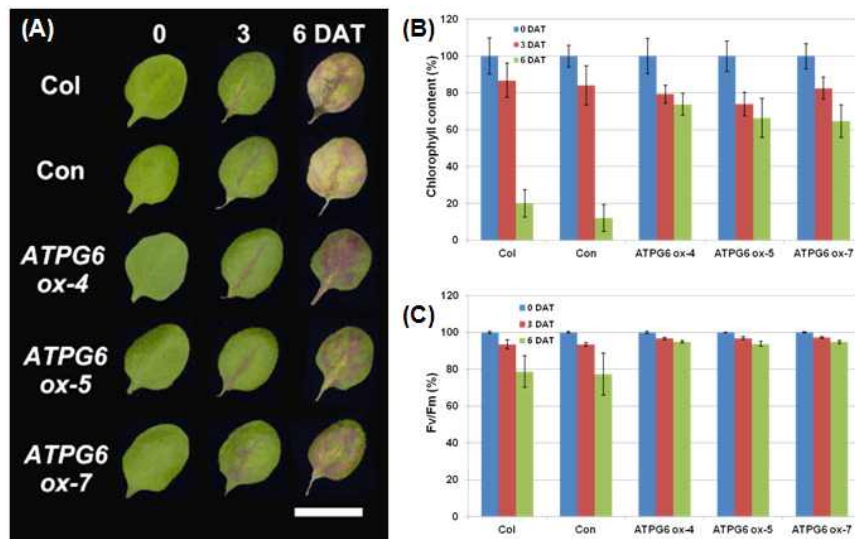


그림 37. *ATPG6* 과발현 형질전환체의 H_2O_2 스트레스에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량 변화(B), 그리고 광합성 효율 변화(C), $n=6$

그 결과 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG6* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소, 특히 엽록소 함량의 감소가 지연됨을 확인할 수 있었다 (도 37A, B와 C). 이러한 사실은 *ATPG6*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

따라서 *ATPG6* 유전자는 식물의 생산성 증대뿐만 아니라 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성도 제공하여 스트레스 저항성을 가진 생산성 증대 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

(5) *ATPG6* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 잎의 표현형적 변화: *ATPG6* 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, 잎 엽록소 함량, 광합성 활성, 그리고 노화

관련 유전자의 발현율을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 라인별로 각 6 개체 이상에서 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 24일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일 이후부터 일어남을 확인할 수 있었다(그림 38A). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG6* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 그리고 *ATPG6 ox-7* 변이체는 *ATPG6 ox-4*와 *ATPG6 ox-5* 변이체에 비하여 노화지연의 표현형질이 좀 더 뚜렷함을 알 수 있었다. 이러한 사실은 약간의 차이점이 있지만 본 유전자의 발현이 높으면 높을수록 노화 지연의 표현 형질이 강력해짐을 시사한다.

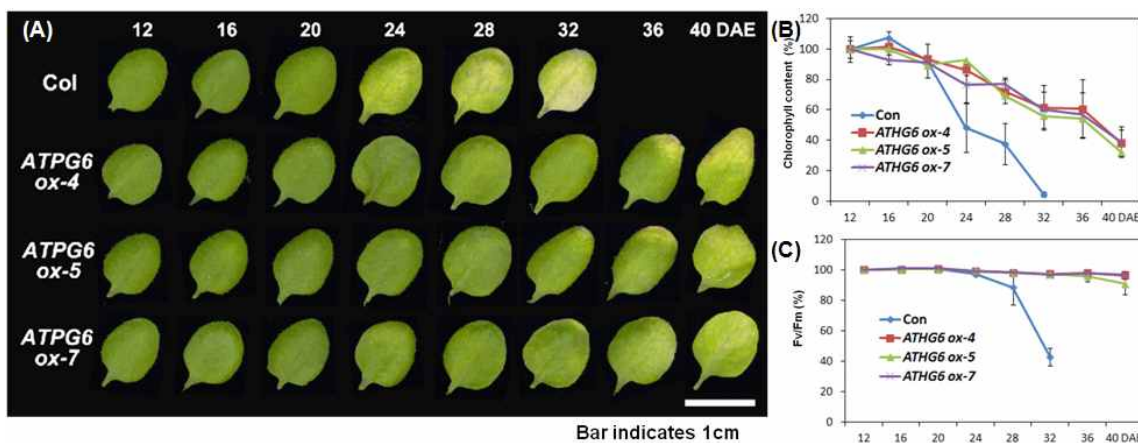


그림 38. *ATPG6* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, n=6(B), 그리고 광합성 효율(C), n=6.

엽록소의 함량 측정을 위해 각 시료 잎을 80% (V/V) acetone을 사용하여 엽록소를 추출하였다. 엽록소 함량은 전술한 바와 같이 663.2 nm와 664.8 nm의 흡광 계수를 이용하여 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(Biochemical Society Transduction 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였다. 그 결과, 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 20일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 최저치로 떨어졌으나, *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7*의 경우 자엽 생성 후 32일이 되었을 때도 측정 초기의 60% 이상의 엽록소 함량을 보이며, 그 후 엽록소 함량의 감소가 급격히 일어남을 확인할 수 있었다. 또한 변이체 라인들의 엽록소 함량 변화를 비교해 보았을 때, 앞의 표현형 분석에서와 마찬가지로 *ATPG6 ox-4*와 *ATPG6 ox-7* 변이체들은 *ATPG6 ox-5* 변이체에 비하여 엽록소 함량 감소의 지연에 대한 표현형질이 약간 뚜렷함을 알 수 있었다(그림 38B). 그러나 전체적인 경향을 보면 모든 변이체들은 야생형에 비하여 엽록소 함량 감소의 지연 효과가 강력했으며, 변이체간의 지연 효과는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

광합성 효율의 측정은 전술한 바와 같은 방법(Plant Mol. Biol. 30:939, 1996)을 이용하여 측

정하였다. 그 결과, 야생종은 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7*의 경우 자엽 생성 후 36일에도 광합성 효율이 초기의 90%를 유지하고 있었다. 이러한 광합성 효율의 감소 지연도 앞선 엽록소 함량에서와 마찬가지로 *ATPG6 ox-4*와 *ATPG6 ox-7* 변이체들은 *ATPG6 ox-4* 변이체에 비하여 보다 뚜렷한 표현형을 보였다. 그러나 전체적인 경향을 보면 모든 변이체들은 야생형에 비하여 광합성 효율 감소의 지연 효과가 강력했으며, 변이체간의 지연 효과는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(그림 38C). 상기 결과로부터, *ATPG6* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG6* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

(6) *ATPG6* 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석: 노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG6* 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 및 광합성 효율을 각 변이체 라인별로 6개체를 대상으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 6일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 보여지며(그림 39A), 암 처리에 의한 노화 동안 엽록소 함량과 광합성 효율 변화에 있어서도 야생종에 비하여 *ATPG6* 변이체들은 정도의 차이는 있지만 함량 및 활성 감소가 지연됨을 알 수 있었다(그림 39B와 C).

본 연구팀은 나이-의존적 노화 및 암-유도 노화에 대한 보다 심도있는 분석을 위하여 현재 노화관련 마커 등을 이용하여 노화에 대한 분자생물학적 분석을 계속 수행하고 있다.

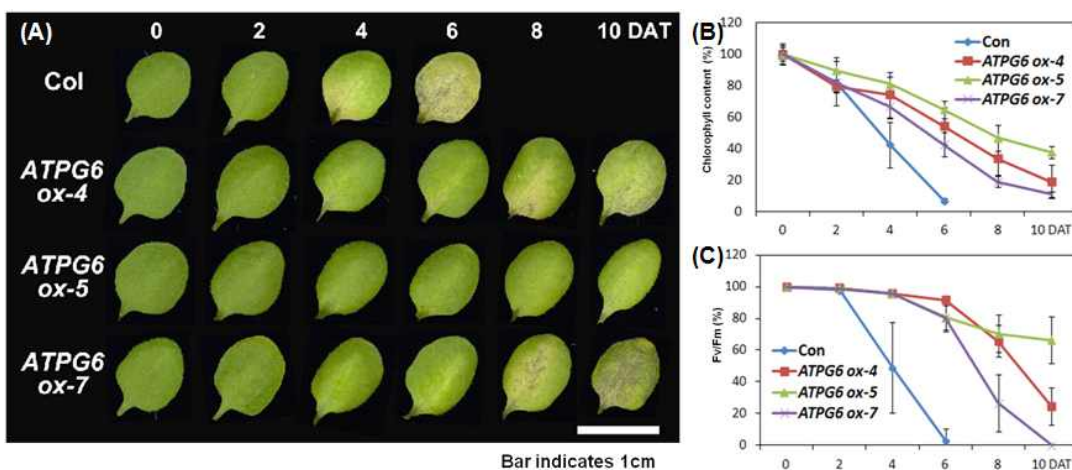


그림 39. *ATPG6* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량(B), 그리고 광합성 효율(C), n=6.

상기의 내용을 종합해보면 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다. *ATPG6* 유전자의 과발현은 식물

의 개체 크기 증가, 생체량/생체건량 증가, 종자 수확량과 같은 생산성 증대라는 농업 형질을 제공하며, 또한 가뭄 혹은 산화 스트레스에 대한 저항성 제공과 더불어 노화 지연이라는 형질을 제공한다. 이러한 형질 제공은 *ATPG6* 유전자의 과발현 정도에 따라 기인하는 것으로 추측된다. *ATPG6* 유전자의 적정 수준에서의 과발현은 개체 크기 증가, 생체량/생체건량 증가, 종자 수확량과 같은 생산성 증대라는 농업형질 제공에 보다 효과적일 것이다. 따라서 본 유전자의 발현을 조절할 수 있는 프로모터(비교적 발현이 낮은 프로모터, 유도성 프로모터, 기관 혹은 화합물 특이적 프로모터 등)를 적용하면 야생형과 동일한 시기의 수확량 증가를 가지는 생산성 증대 작물 개발에 많은 장점을 제공하리라 판단된다. 한편 *ATPG6* 유전자는 노화 지연 및 스트레스 저항성에 대한 형질도 강력하게 나타나는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 적절한 발현 조절은 작물의 생산성 증대와 더불어 스트레스 저항성을 제공하여 다수안정성 작물 개발에 많은 장점을 제공할 뿐만 아니라 작물의 노화 지연 기능을 제공하여 생산성 증대 및 수명 연장 형질을 요구하는 작물의 개발에도 많은 장점을 제공하리라 판단된다.

다. *ATPG7* (AT-hook protein of Genomine 7, At4g22810): 수명 연장, 생산성 증대 및 스트레스 저항성 유전자

(1) 애기장대로부터 늑기연장 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG7* 유전자 발굴: 식물의 늑기연장 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG7* 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related, GeneBank accession number NP 194012.1)의 염기서열을 기초로 하여 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머(*PacI*/AT4G22810 SOE-F, 5'-TTA ATT AAA TGG ATC CAG TAC AAT CTC ATG G-3')와, 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*XbaI*/AT4G22810 SOE-R, 5'-TCT AGA TCA ATA CGG TGG TCG TCC CGT-3')를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리한 결과, 약 34.3 kDa의 분자량을 갖는 324개의 아미노산을 암호화하는 975bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG7*(AT-hook protein of Genomine 7)로 명명하였다.

상기 유전자가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *ATPG7* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG7* 전사체의 발현을 변화시켰다. 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머 및 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 *ATPG7* cDNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *PacI*과 *XbaI*으로 절단하고, inducible promoter인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 *ATPG7* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터를 제작하였다(그림 40A). 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다. pCSEN-*ATPG7* 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대 AT7-4 및 AT7-8은 대조군(*ATPG7* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 발아 후 60째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 AT7-4 및 AT7-8 변이체들이 수명 연장의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 형질전환 개체에서 이러한 수명 연장 현상의 정도의 차이는 유전자의 과발현이 개체마다

다르게 나타남에 기인하는 것으로 판단된다(그림 40B).

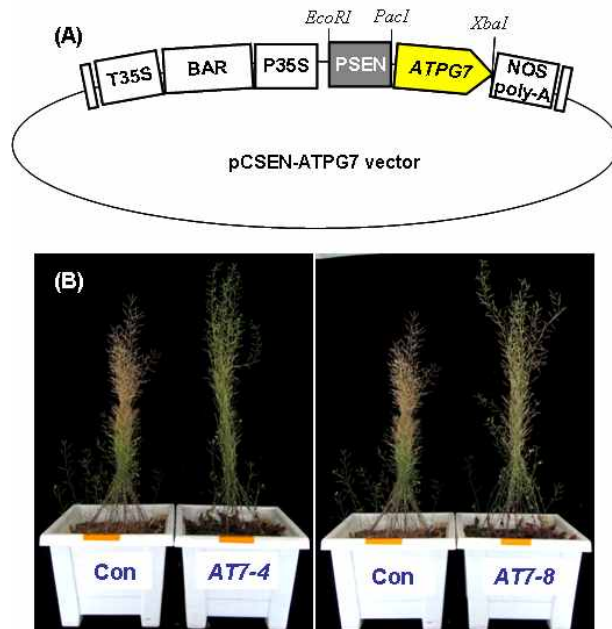


그림 40. *ATPG7* 유전자에 대한 형질전환 벡터 모식도(A)와 T₁ 형질전환체의 발아 후 60일째 표현형적 특징(B)

이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 선별된 수명 연장 표현형을 가지는 변이체의 *ATPG7* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6* 변이체의 잎으로부터 전체 RNA를 각각 추출하여 cDNA를 합성하였다. 이후, 합성된 cDNA를 주형으로 하고 *ATPG7* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자에 대해 PCR을 수행하였다. 그 결과 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6* 변이체의 *ATPG7* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며(그림 41), 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG7* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

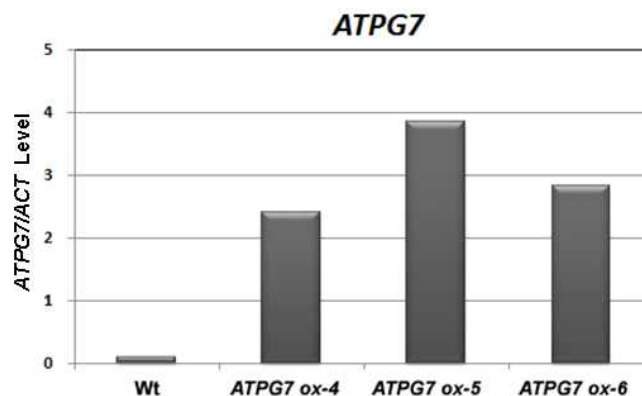


그림 41. 애기장대 야생형과 *ATPG7*-과발현체의 *ATPG7* 유전자의 발현 분석, 양성대조구는 *ACT*

선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 42). pCSEN-ATPG7 구성체를 가지고 있는 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 노화 지연 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 51에서 나타나듯이 유전자의 과발현이 라인마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 흥미로운 사실은 노화 지연 형질이 강력한 *ATPG7 ox-5*는 생산성 증대에 있어서 큰 표현형적 차이를 못 가지는 반면, 노화 지연 형질이 강하지 않는 *ATPG7 ox-4*는 생산성 증대에 있어서 대조군에 비하여 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.

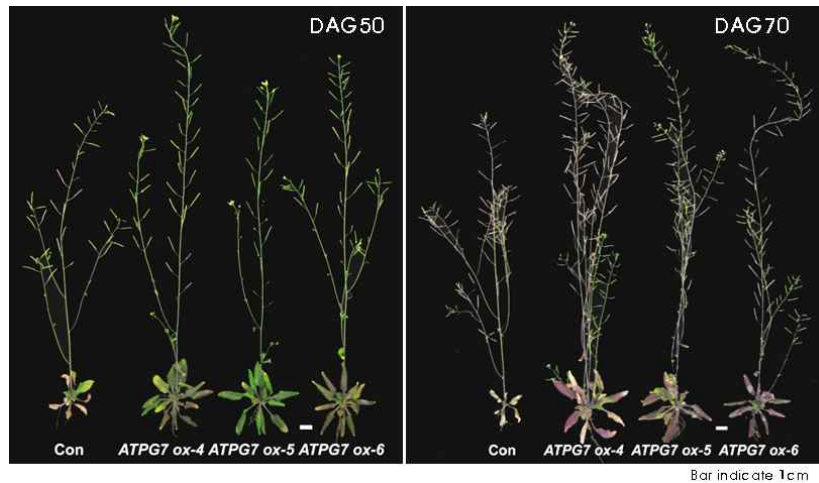


그림 42. *ATPG7* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 발아 후 50일 그리고 70일째 표현형적 특징

(2) *ATPG7* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석: *ATPG7* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6*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. *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 1.5배 이상 종자 무게 및 종자 수에 있어서 증가하는 것으로 나타났으며, 종자 1,000개의 무게에는 대조구와 큰 차이가 없었다. 그리고 생체량과 생체건량에 있어서는 과발현 변이체는 대조구에 비하여 약 2.8배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 사실은 *ATPG7* 유전자가 노화 지연과 더불어 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다(그림 43). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

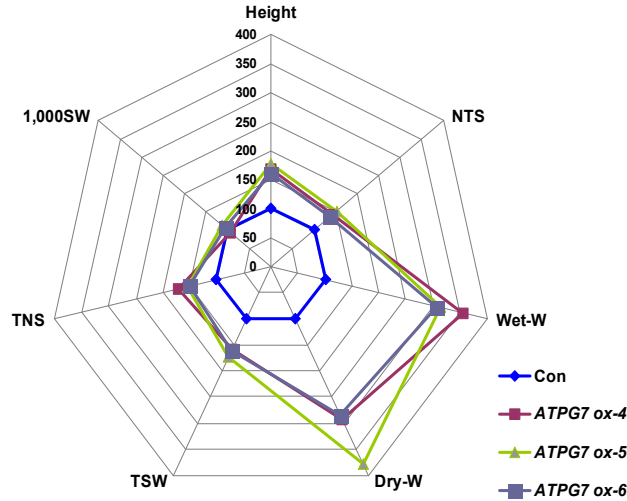


그림 43. *ATPG7* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; Dry-W, weight of plant after dry (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

(3) *ATPG7* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 대한 특성 분석: *ATPG7* 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, 잎 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 24일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6*의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(그림 44). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG7* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 엽록소 함량 조사에 있어서 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 20일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6*의 경우 자엽 생성 후 36일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다(그림 45A). 엽록소 함량과 마찬가지로 광합성 효율에 있어서도, 야생종은 자엽 생성 후 28일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6*의 경우 자엽 생성 후 36일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않다가 40일째 라인에 따라 정도의 차이는 있지만 약 20% 범위까지 활성 소실이 일어났다(그림 45B). 상기 결과로부터, *ATPG7* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG7* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

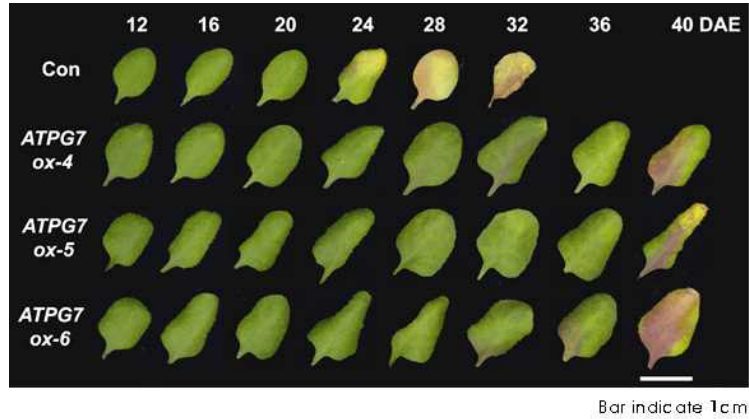


그림 44. *ATPG7* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징

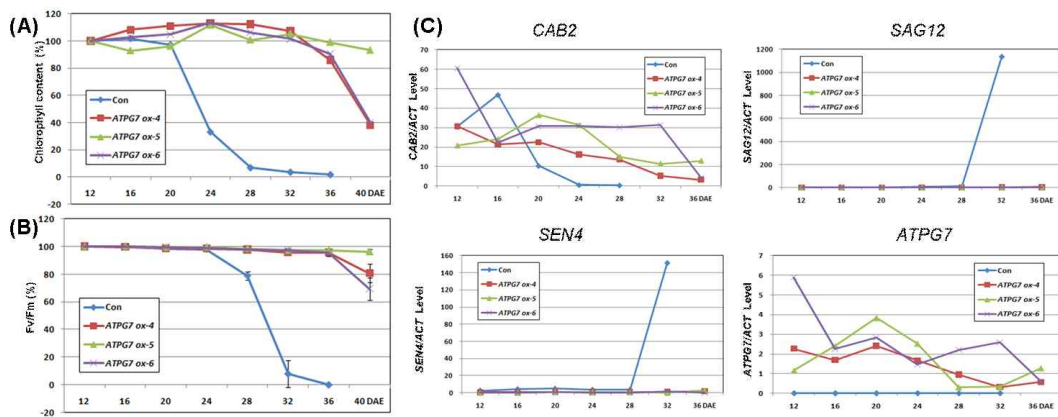


그림 45. *ATPG7* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 엽록소 함량 (n=6)(A), 광합성 효율 (n=6)(B), 그리고 *ATPG7*과 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성대조구는 *ACT*(C)

야생종과 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6* 변이체에서 노화 관련 유전자 (senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG7* 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 *ATPG7* 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, *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6* 변이체 모두는 *SEN4*와 *SAG12*의 발현이 자엽 생성 후 36일째까지 변화가 없는 것으로 나타났다. 한편 *ATPG7* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 전체적으로 *ATPG7* 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 발현 수준이 현저히 높으며 노화 동안 라인별로 정도의 차이는 있지만 점진적으로 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(그림 45C). 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG7* 유전자는 분

자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

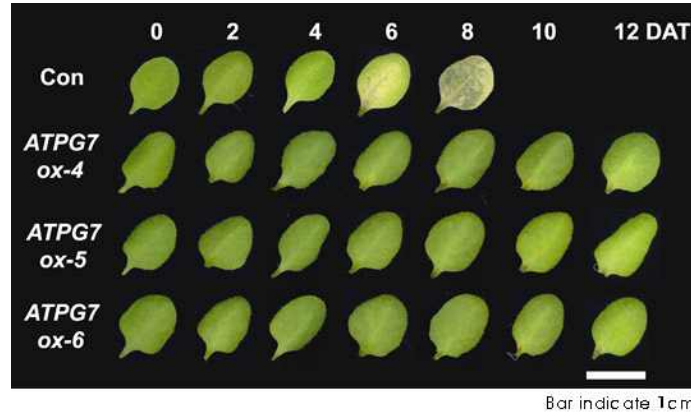


그림 46. *ATPG7* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징

(4) *ATPG7* 과발현 변이체의 암-유도 노화에 대한 특성 분석: 노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG7* 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 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6*의 경우 잎의 황화 현상이 12일 이후부터 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(그림 46). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암 처리 후 6일 이후 급격한 감소를 보여 암 처리하지 않은 상태의 약 10% 정도의 수치를 나타냈으나, *ATPG7 ox-5*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6*의 경우, 대부분 6일째에도 80% 정도의 엽록소 함량을 나타냈다(그림 47A). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 *ATPG7* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(그림 47B). 또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 나이-의존적 노화와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 그림 47C에 도시된 바와 같이, 야생형이 암 처리 후 4일째 *SAG12*의 발현이 현저히 증가하고 8일째 *SEN4*의 발현이 현저히 증가하는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 전 기간 동안 *SAG12*의 발현이 나타나지 않았으며 *SEN4*의 발현은 6일째 잠시 증가하였으나 그 증가도가 야생형에 비하여 현저히 낮음을 알 수 있었다. 한편 *ATPG7* 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 *ATPG7* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 수명을 연장시키는 것으로 판단된다.

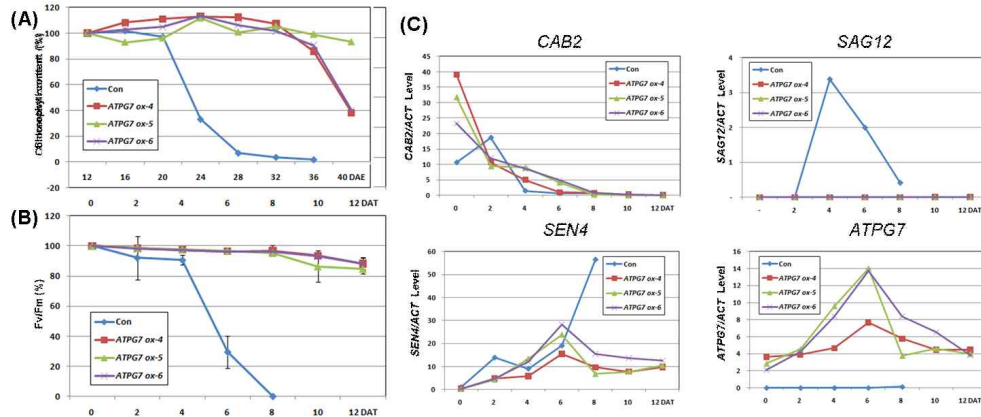


그림 47. *ATPG7* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 엽록소 함량 (n=6)(A), 광합성 효율 n=6)(B), 그리고 *ATPG7*과 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 *ACT*(C)

(5) *ATPG7* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석: *ATPG7* 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 48A와 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 *ATPG7* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG7*이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

ATPG7 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 6일 동안 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG7* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소에 있어서도 지연됨을 확인할 수 있었다(그림 48C와 D). 이러한 사실은 *ATPG7*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

따라서 *ATPG7* 유전자는 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성을 제공하여 스트레스 저항성 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

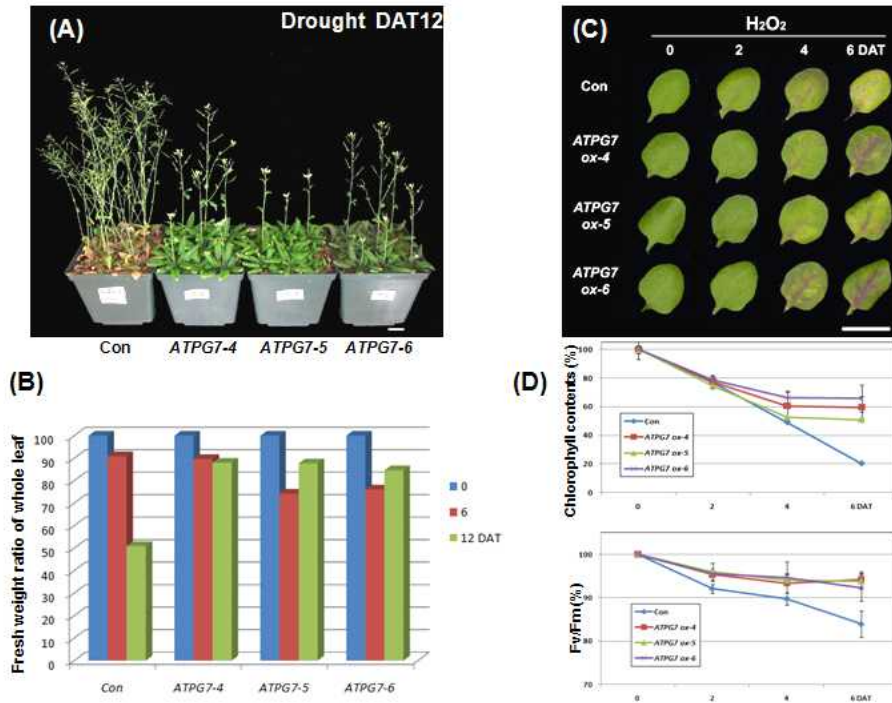


그림 48. *ATPG7* 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화 $n=6$ (B), 그리고 H_2O_2 스트레스에 대한 표현형적 특징(C) 및 엽록소 함량과 광합성 효율 변화, $n=6$ (D)

라. *ATPG10* (AT-hook protein of Genomine 10): 수명 연장, 생산성 증대 및 스트레스 저항성 유전자

(1) 애기장대로부터 녹기 연장 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG10* 유전자 발굴: 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related)로 알려진 *ATPG10*은 약 29.4 kDa의 분자량을 갖는 276개의 아미노산을 암호화하는 831bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG10*(AT-hook protein of Genomine 10)으로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 *ATPG10* 단백질의 등전점(isoelectric point)은 8.34로 나타났다.

상기 유전자가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *ATPG10* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG10* 전사체의 발현을 변화시켰다. Inducible promoter인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 *ATPG10* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터를 제작하였다. 그림 49A는 pCSEN 벡터에 *ATPG10* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터를 도시한 그림이다. pCSEN-*ATPG10* 벡터로 형질전환된 T_1 애기장대 *AT10-3*은 대조구(*ATPG10* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)와 발아 후 60일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 *AT10-3* 변이체 라인은 수명 연장의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 또한 흥미롭게도 종자 수확량 증가와 개체 크기 증가와 같은 생산성 증대 특징을 가졌다(그림 49B).

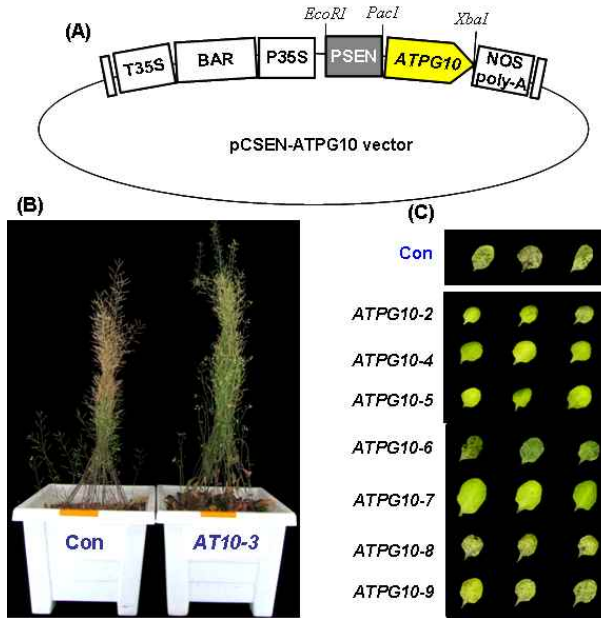


그림 49. *ATPG10* 유전자에 대한 형질전환 벡터 모식도(A)와 T₁ 형질전환체의 발아 후 60일째 표현형적 특징(B), 그리고 T₂ 형질전환 라인의 암처리 후 6일째 잎의 표현형적 특징

이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대 대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 일정 기간 생육 후 6일 동안의 암처리 후 수행하였다. pCSEN-ATPG10 구성체를 가지고 있는 과발현 변이체 라인들은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체잎의 수명 연장 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 수명 연장 표현형뿐만 아니라 수명 연장 동안 잎 크기에서도 일부 라인에서는, 특히 *ATPG10-7* 라인은 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다(그림 49C).

이러한 표현형질에 대해 보다 정확히 분석하기 위하여 우리는 애기장대 T₂ 형질전환 라인을 증폭시킨 후 바스타 제초제 처리를 통하여 T₂ 형질전환 애기장대를 선별하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 50). pCSEN-ATPG10 구성체를 가지고 있는 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 생산성 증대 현상이 뚜렷하게 나타났으며 흥미로운 점은 이들 변이체 중 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인은 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났다. 생산성 증대 특성을 가지는 변이체들은 발아 후 50일 동안 생육했을 때는 개체 크기에 있어서 야생형에 비하여 비슷하거나 혹은 약간 작았으나, 발아 후 70일 동안 생육했을 때는 개체 크기 및 종자 생산량 증가와 같은 생산성 증대에 있어서 애기장대 야생형에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다. 이러한 노화 지연 현상과 생산성 증대는 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 그림 51에서 나타나듯이 유전자의 과발현이 라인마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다.

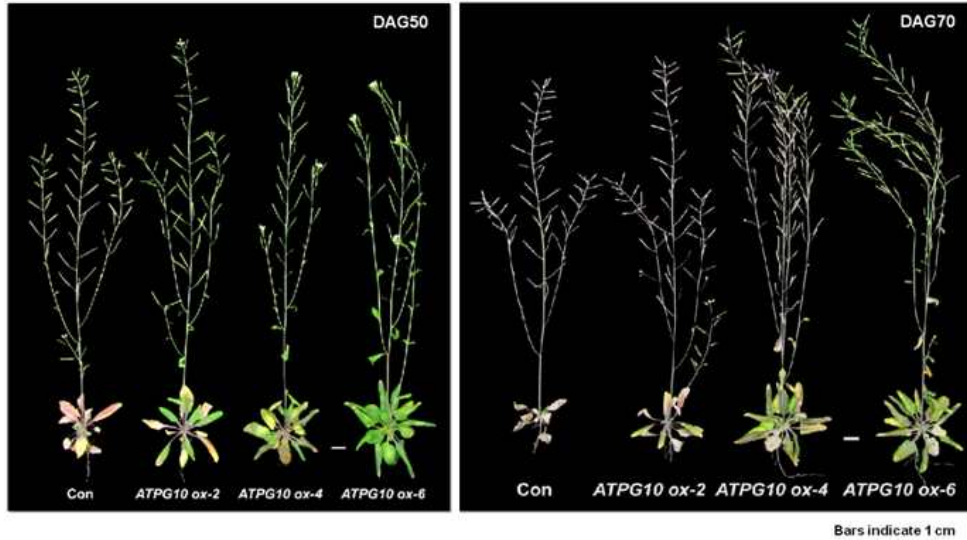


그림 50. *ATPG10* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 발아 후 50일 그리고 70일째 표현형적 특징

선별된 노화 지연/생산성 증대 표현형을 가지는 변이체의 *ATPG10* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 24일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체의 잎으로부터 전체 RNA를 각각 추출하고, 이를 주형으로 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 그림 70에서 도시된 바와 같이 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체의 *ATPG10* 유전자의 발현이 전체적으로 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG10* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

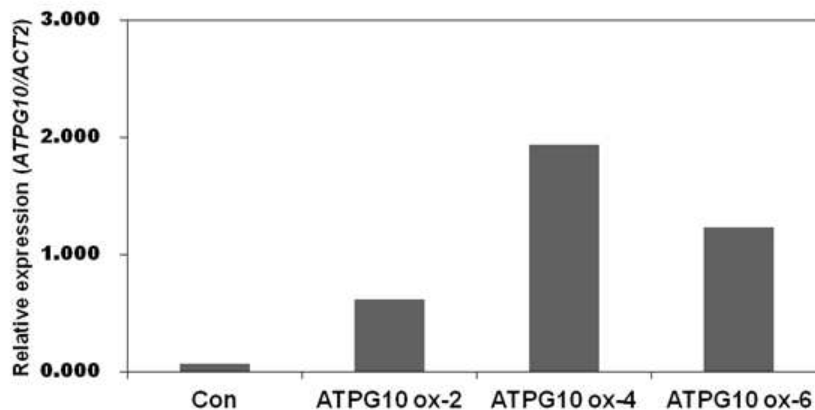


그림 51. 애기장대 야생형과 *ATPG10*-과발현체의 *ATPG10* 유전자의 발현 분석, 양성 대조구는 *ACT*.

ATPG10 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인 모두는 대조구에 비하여 개체 크기, 종자 수확량 등의 생산성 증대 형질이 높은 것으로

나타났다. 그런데 흥미로운 사실은 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 *ATPG10 ox-2* 변이체는 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체에 비하여 노화 지연에 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. 특히 유전자의 발현 조절을 통하여 애기장대 야생형과 같은 수확시기를 가지고 생산성이 증대되는 식물의 제작이 용이함에 따라 *ATPG10*은 우량 생산성 증대 작물 개발에 있어 훌륭한 유전자원으로 활용할 수 있을 것이다.

(2) *ATPG10* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석: *ATPG10* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체의 생산성 증대에 대한 특성을 확인하기 위하여 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6*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.

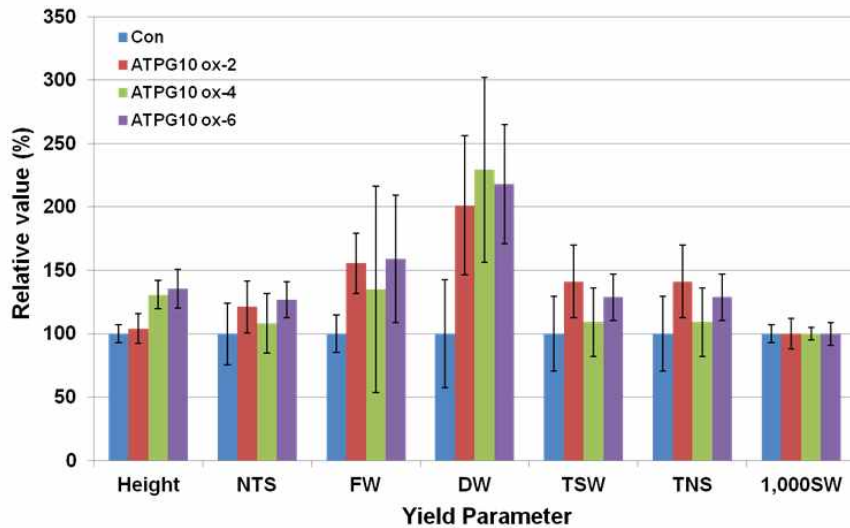


그림 52. *ATPG10* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant (g); DW, dry weight of plant (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

ATPG10 ox-2, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 종자 생산이 증가하는 것으로 나타났으며, 이러한 종자 생산의 증가는 변이체의 장각과 생산 증가에 기인하는 것으로 나타났다. 한편 종자 1,000개의 무게에서 변이체 전체는 대조구에 비하여 큰 변이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자의 발현은 종자의 개체 크기가 아닌 전체 무게의 증가에 영향을 미치는 것으로 판단되며, 이러한 형질은 본 유전자가 화기 형성을 촉진하여 전체 장각과 형성의 증가를 유도하여 결과적으로 전체 종자 무게의 증가를 유발하는 것으로 판단된다. 그리고 생체량과 생체 건량에 있어서도 과발현 변이체는

대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상을 가졌다. 흥미로운 사실은 *ATPG10 ox-4* 변이체 라인에는 *ATPG10 ox-2*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인들에 비하여 생체건량 증가에 있어서 뚜렷한 증가 현상은 가진다는 것이다. 이러한 사실로 미루어 보아 본 유전자 발현의 상대적 증가는 생체 건량과 같은 바이오매스 증가에 효과가 높음을 나타낸다. 상기의 내용을 종합해보면 *ATPG10* 유전자가 종자 생산량 증가와 더불어 생체량/생체건량 증가와 같은 바이오매스 증가와 같은 작물의 생산성 증대를 유발하며(그림 52), 이러한 과발현 변이체의 라인별 생산성 증대의 차이는 라인별 *ATPG10* 유전자의 발현 정도의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 타작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 효용 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

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 있다는 것이다.

이러한 결과를 종합해보면, *ATPG10* 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.

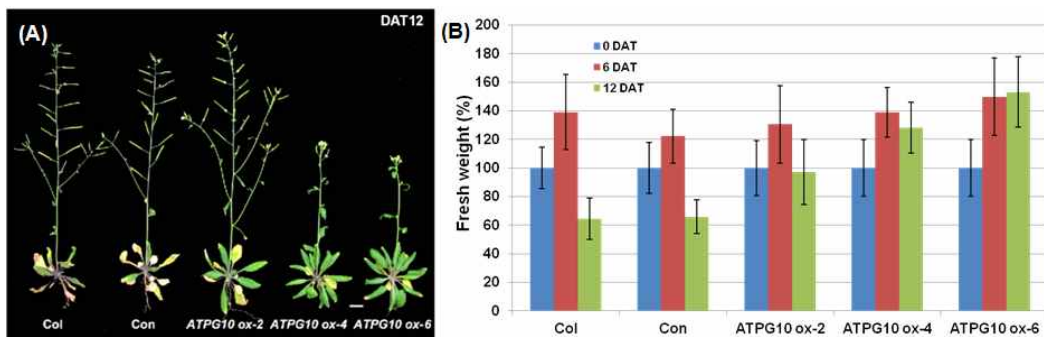


그림 53. *ATPG10* 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화 n=6(B)

(3) *ATPG10* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석: *ATPG10* 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일 된 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 53A와 B에 도시되었으며, 제시된 값은 라인별로 각 6개체의 평균값±표준편차이다. 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 *ATPG10* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있

었다. 특히 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인들은 *ATPG10 ox-2* 변이체 라인에 비하여 훨씬 높은 가뭄 스트레스 저항성을 가지는데 이는 본 변이체들의 상대적 유전자 발현 정도에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 *ATPG10* 유전자의 높은 발현은 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 유도한다는 것을 의미한다.

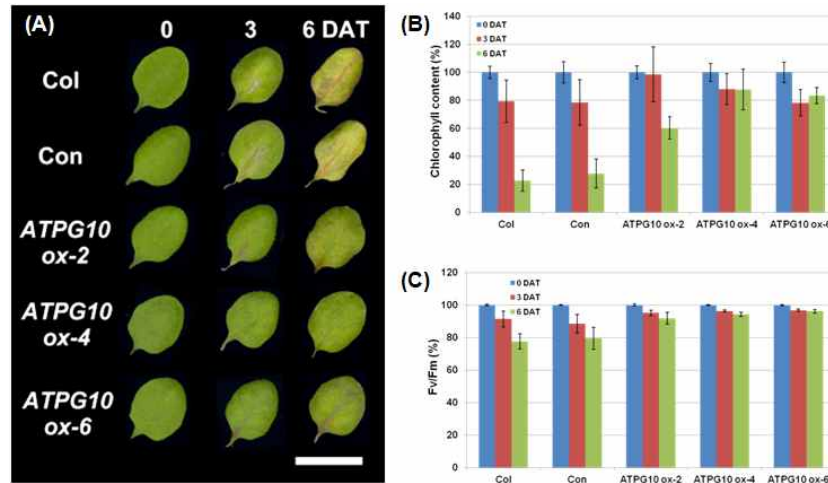


그림 54. *ATPG10* 과발현 형질전환체의 H_2O_2 스트레스에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량 변화(B), 그리고 광합성 효율 변화(C), n=6

ATPG10 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H_2O_2 를 첨가하여 발아 후 25일 된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 3일 간격으로 6일 동안 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H_2O_2 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 *ATPG10* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소, 특히 엽록소 함량의 감소가 지연됨을 확인할 수 있었다 (그림 54). 앞선 가뭄 스트레스 저항성과 마찬가지로 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인들은 *ATPG10 ox-2* 변이체 라인에 비하여 훨씬 높은 H_2O_2 스트레스 저항성을 가지는데 이는 본 변이체들의 상대적 유전자 발현 정도에 기인하는 것으로 판단된다. 이러한 사실은 *ATPG10* 이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

따라서 *ATPG10* 유전자는 식물의 생산성 증대뿐만 아니라 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성도 제공하여 스트레스 저항성을 가진 생산성 증대 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

(4) *ATPG10* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화 조절에 대한 특성 분석: *ATPG10* 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, 광합성 활성, 그리고 노화 관련 유전자의 발현율을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 라인별로 각 6개체 이상에서 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 24일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6*의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일 이후부터 일어남을 확인할 수 있었다(그림 55). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG10* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 그리고 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체들은 *ATPG10 ox-2* 변이체에 비하여 노화지연의 표현형질이 보다 뚜렷함을 알 수 있었다. 이러한 사실은 본 유전자의 발현이 높으면 높을수록 노화 지연의 표현형질이 강력해짐을 제시할 수 있다.



그림 55. *ATPG10* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징

ATPG10 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 엽록소 함량 변화는 그림 56A에 도시되었으며, 제시된 값은 라인별로 각 6개체의 평균값±표준편차이다. 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 20일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 최저치로 떨어졌으나, *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6*의 경우 자엽 생성 후 32일이 되었을 때도 측정 초기의 60% 이상의 엽록소 함량을 보이며, 그 후 엽록소 함량의 감소가 급격히 일어남을 확인할 수 있었다. 또한 변이체 라인들의 엽록소 함량 변화를 비교해 보았을 때, 잎의 표현형 분석에서와 마찬가지로 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체들은 *ATPG10 ox-2* 변이체에 비하여 엽록소 함량 감소의 지연에 대한 표현형질이 보다 뚜렷함을 알 수 있었다.

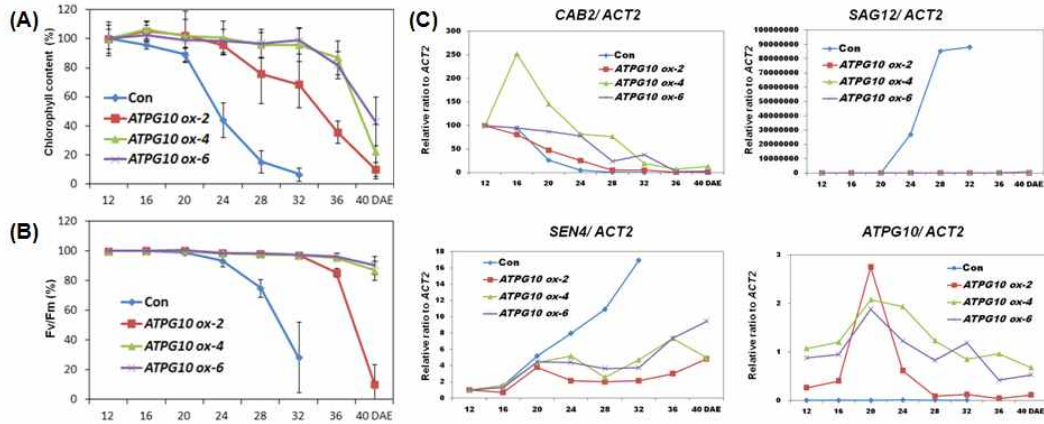


그림 56. *ATPG8* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 엽록소 함량 (n=6)(A), 광합성 효율 (n=6)(B), 그리고 *ATPG8*과 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 *ACT2*(C)

한편 광합성 효율의 경우, 야생종은 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6*의 경우 자엽 생성 후 36일에도 광합성 효율이 초기의 80%를 유지하고 있었다. 이러한 광합성 효율의 감소 지연도 앞선 엽록소 함량에서와 마찬가지로 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체들이 *ATPG10 ox-2* 변이체에 비하여 보다 뚜렷한 표현형을 보였다(그림 56B). 그러나 전체적인 경향을 보면 모든 변이체들은 야생형에 비하여 광합성 효율 감소의 지연 효과가 강력했으며, 변이체간의 지연 효과는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 상기 결과로부터, *ATPG10* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG10* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

야생종과 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체에서 노화 관련 유전자 (senescence-associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG10* 유전자와 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다. 노화 마커 유전자로는 *SAG12*, *SEN4* 및 *CAB2* 유전자를 사용하였으며, qRT-PCR 양성 대조구로는 *ACT2* 유전자를 사용하였다. 야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였으나, *ATPG10* 과발현 변이체들은 *CAB2*의 발현 감소가 지연되는 것으로 나타났다. 노화의 signal로 사용되는 *SAG12* 발현의 경우, 야생종은 20일에 발현되어 32일째 최대 발현을 나타내는 반면, *ATPG10* 과발현 변이체들은 40일까지 증가 현상이 거의 나타나지 않았으며, 식물의 노화 동안 점진적으로 발현이 증가되는 것으로 알려진 *SEN4*의 발현은 야생종에서는 32일째 발현이 최대로 증가하는 반면, *ATPG10* 과발현 변이체들은 노화 과정 동안 *SEN4*의 발현 증가가 지속적으로 일어나 큰 증가폭을 나타내지 않았으며, 변이체의 *SEN4* 발현 정도는 야생형의 노화 동안의 발현 정도에 비하여 현저히 낮음을 알 수 있었다. 한편 *ATPG10* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 야생형의 경우 노화 동안 발현이 거의 나타나지 않는 반면 *ATPG10* 유전자 과발현 변이체들은 야생

형에 비하여 노화 전 과정 동안 발현 수준이 현저히 높으며 일부 구간에서 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(그림 56C). 따라서 과발현 변이체들의 노화 지연 현상은 *ATPG10* 유전자의 과발현에 의해 유도되는 것으로, 특히 본 유전자 발현의 정도가 높으면 높을수록 노화 지연의 표현형적 특징은 강력할 것으로 생각된다. 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG10* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

(5) *ATPG10* 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석: 노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG10* 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 각 변이체 라인별로 6개체를 대상으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6*의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 보여지며(그림 57), 암 처리에 의한 노화 동안 엽록소 함량과 광합성 효율 변화에 있어서도 야생종에 비하여 *ATPG10* 변이체들은 정도의 차이는 있지만 함량 및 활성 감소가 지연됨을 알 수 있었다(그림 58A와 B)

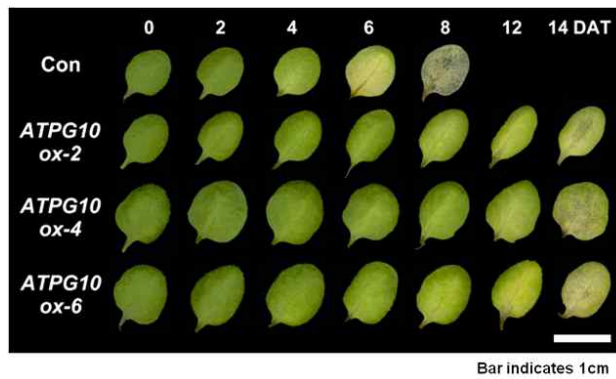


그림 57. *ATPG10* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징

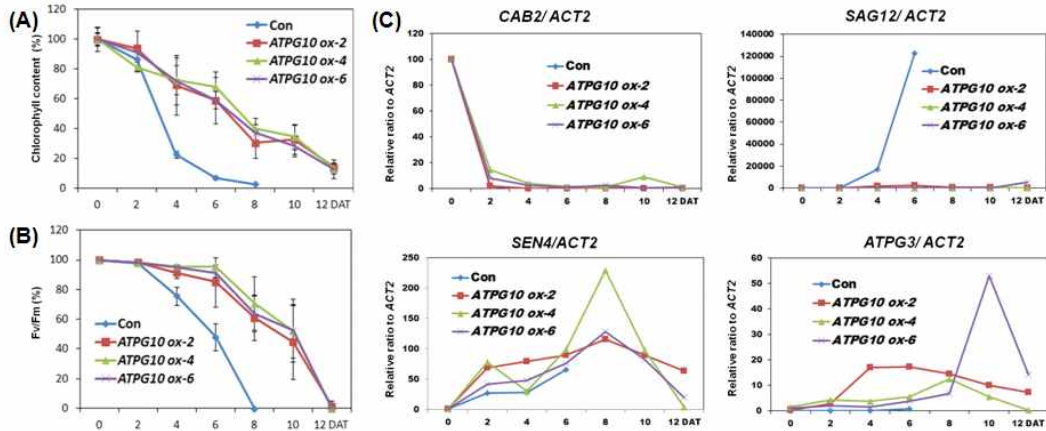


그림 58. *ATPG10* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 엽록소 함량 (n=6)(A), 광합성 효율 (n=6) (B), 그리고 *ATPG8*과 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 *ACT2*(C)

또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 암-유도 노화동안 조사해 본 결과, 그림 61C에 도시된 바와 같이, 야생형에 비하여 *ATPG10* 변이체들은 *CAB2*의 발현 감소는 유사하였으나 *SAG12*의 발현은 지연되고, *SEN4*의 발현율은 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 보아 *ATPG10* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

*ATPG10*에 대한 연구 결과를 종합해보면 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다. *ATPG10* 유전자의 과발현은 식물의 개체 크기 증가, 생체량/생체건량 증가, 종자 수확량과 같은 생산성 증대라는 농업형질을 제공하며, 또한 가뭄 혹은 산화 스트레스에 대한 저항성 제공과 더불어 노화 지연이라는 형질을 제공한다. 이러한 형질 제공은 *ATPG10* 유전자의 과발현 정도에 따라 나타나는데, *ATPG10* 유전자의 적정 수준에서의 과발현은 개체크기 증가, 생체량/생체건량 증가, 종자 수확량과 같은 생산성 증대라는 농업형질 제공에 보다 효과적이다. 특히 본 유전자의 적정 수준에서의 발현 조절은 수확시기가 야생형과 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. 한편 *ATPG10* 유전자의 발현 정도에 비례하여 식물의 노화 지연 및 스트레스 저항성에 대한 형질이 강력하게 나타나는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 적절한 발현 조절은 작물의 생산성 증대와 더불어 스트레스 저항성을 제공하여 다수안정성 작물 개발에 많은 장점을 제공할 뿐만 아니라 작물의 노화지연 기능을 제공하여 생산성 증대 및 늑기연장 형질을 요구하는 작물의 개발에도 많은 장점을 제공하리라 판단된다.

제 3 절. 국화 우량 품종의 식물체 재생 및 형질전환 시스템 확립

본 연구팀은 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 통하여 수명 연장 우량 형질전환 계통 개발을 위한 기반기술을 확보하고자 국화 스탠다드 주요 품종을 대상으로 식물체 재생 및 형질전환 시스템 확보를 위한 연구를 수행하였다.

이를 위하여 국내에서 육성된 국화 스탠다드 신품종 ‘백마’의 기관형성을 통한 식물체 재생 시스템을 개발하였으며, 이어서 국내 주요 국화 스탠다드 품종인 ‘신마’를 대상으로 *Agrobacterium* 매개 형질전환으로 GFP 유전자가 도입된 형질전환체를 생산하고 이들의 유전자 도입 및 발현 분석을 통하여 국화의 안정적인 형질전환 시스템을 확보하였다.

1. 국내 육성된 국화 우량 품종의 선발

국내에서 상업적으로 재배되는 국화는 83%가 절화용 스탠다드 품종이며, 스탠다드 품종은 ‘신마’, ‘백마’ 등 5-6 품종이 생산량의 약 90% 이상을 차지하고 있다. 이와 같이 국화는 소수의 스탠다드 품종이 국화 전체 재배면적의 대부분을 차지할 만큼 품종의 중요성이 크기 때문에 스탠다드 신품종 육성은 매우 큰 상업적 파급효과를 가지게 된다. 국내에서 개발된 국화 스탠다드 신품종인 ‘백마’는 일본으로의 수출이 증가하는 추세를 보이고 있으며 앞으로도 지속적인 수출 확대가 예상되고 있는 유망 품종이다. 그러나 국화 ‘백마’는 기내배양에서의 신초 기관형성이 어려운 것으로 알려져 있었다. 따라서 본 연구에서는 국화 스탠다드 품종 ‘백마’의 효율적인 기관형성을 통한 식물체 재생 시스템을 확립하여 형질전환 방법을 통한 신품종 육성의 기초자료로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

기내배양으로 유지하고 있는 식물체에서 잎을 절취하여 4면을 절단하여 만든 절편체를 재료로 사용하여 신초 기관형성의 적정 조건을 알아보았다. 잎 절편체로부터의 신초 기관형성에 적합한 성장조절제의 농도를 알아보기 위하여 MS 염류와 비타민, sucrose 30g/L, AgNO₃ 5mg/L, agar 8g/L를 첨가한 기본배지에 BA 0.5, 1.0, 2.0mg/L에 NAA 0.5, 2.0mg/L와 IBA 0.5, 2.0mg/L를 각각 조합처리 하였다.

모든 처리구에서 배양 3-4주 후부터 잎 절편체의 절단부에서 캘러스가 형성되기 시작하였고, 배양 6주 후부터 신초가 형성되기 시작하였다. 절편체의 생존율은 모든 처리구에서 77% 이상으로 나타났으며, 캘러스 형성율은 94% 이상으로 높게 나타났다. 신초 재생율은 BA 1.0mg/L와 NAA 0.5mg/L 첨가 처리구에서 55.6%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 BA 1.0mg/L와 NAA 0.5mg/L 처리구와 BA 0.5mg/L와 IBA 2.0mg/L 첨가 처리구에서 44.4%와 38.9%로 높게 나타났다. 한편, BA 0.5mg/L와 IBA 또는 NAA 2.0mg/L 처리구에서는 뿌리가 형성되기도 하였다. 이로 보아, 국화 ‘백마’의 신초 재생에는 BA와 IBA 조합보다는 BA와 NAA의 조합을 사용하는 것이 효과적이며, 농도는 BA 1.0mg/L와 NAA 0.5mg/L를 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다 (표 3, 그림 59).

표 3. 국화 ‘백마’의 잎 절편체로부터 신초 재생에 미치는 식물생장조절제 조합처리의 영향

Plant growth regulators (mg/L)			Survival rate (%)	Callus formation (%)	Shoot regeneration (%)	Remarks
BA	NAA	IBA				
0.5	0.5	-	77.8	100.0	44.4	
0.5	-	0.5	94.4	94.4	0.0	
0.5	2.0	-	100.0	100.0	11.1	Rooting
0.5	-	2.0	100.0	100.0	38.9	Rooting
1.0	0.5	-	100.0	100.0	55.6	
1.0	-	0.5	100.0	100.0	16.7	Browning
2.0	0.5	-	100.0	100.0	27.8	
2.0	-	0.5	100.0	100.0	11.1	

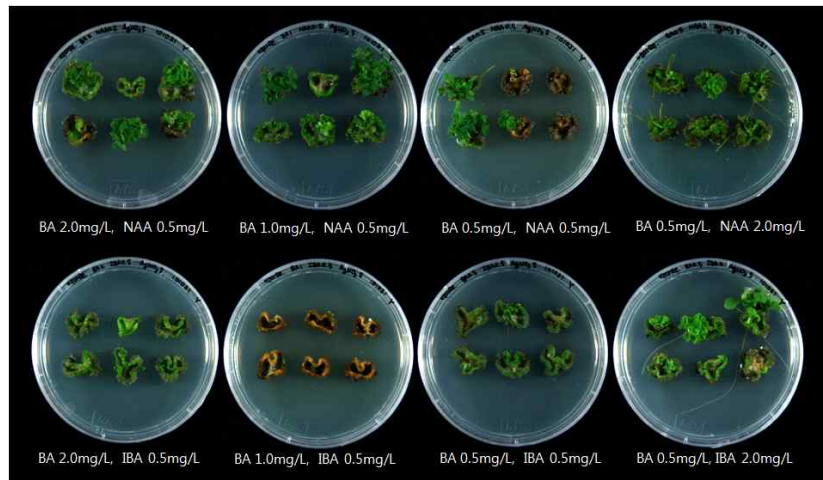


그림 59. 식물생장조절제 처리에 따른 국화 ‘백마’의 잎 절편체로부터 신초 재생

2. 보고 유전자 도입 국화 형질전환체 생산 및 발현 분석

가. 보고 유전자 도입 국화 형질전환 및 형질전환체 생산

국화 스탠다드 품종 ‘신마’를 대상으로 보고유전자 *GFP*가 도입된 형질전환체를 생산하기 위하여 기내 신초배양을 통해 얻어진 식물체로부터 잎을 절취하여 4면을 절단한 절편체를 재료로 사용하여 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 실시하였다. 형질전환 실험의 기본배지로 신초재생배지를 사용하였는데, 신초재생배지(SIM)는 MS 염류와 비타민, sucrose 30g/L, agar 8g/L인 기본배지에 BA 2.0mg/L, NAA 0.5mg/L가 첨가된 배지를 사용하였다. MS배지에서 배양한 세균현탁액에 절단한 절편체를 침지하여 실온에서 20분간 접촉한 후 신초재생배지(SIM)에 acetosyringone 100µM을 첨가한 공조배양배지(CM)에서 3일간 배양하였다. 배양 후 신초재생배지(SIM)에 kanamycin(Km) 20mg/L, cefotaxime(Cx) 500mg/L가 첨가된 선발배지(TSM)에서 4주 동안 암배양한 후 16/8 광주기인 명조건으로 옮겨 배양하였다.

형질전환시킨 절편체를 항생제가 포함된 선발배지에서 배양하였을 때, 암배양 2주 후부터 절편체의 절단면으로부터 캘러스가 형성되기 시작하였다. 형성된 캘러스를 배양 6-8주 후 분리하여 항생제가 포함된 신초재생배지로 옮겨주었고, 배양 10-12주 사이에 캘러스로부터 신초가 발달하였다. 길이 5mm 이상 정상적으로 신장한 신초를 분리하여 MS배지에 Km 30mg/L가 첨가된 신장배지(TEM)로 옮겨주어 신초의 신장 및 발근을 유도하였다(그림 60).

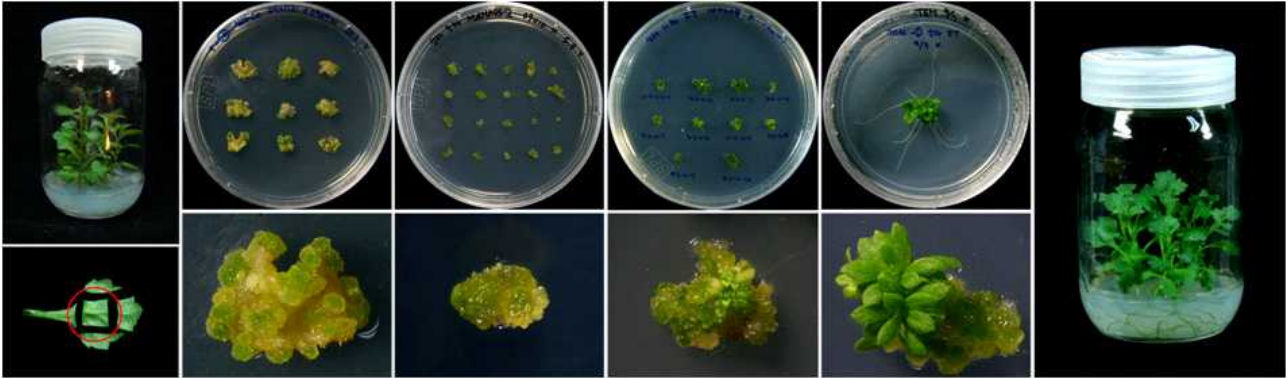


그림 60. 국화 ‘신마’의 보고유전자 *GFP* 도입 형질전환 식물체 개발

보고유전자 *GFP*를 도입하기 위한 *Agrobacterium* 매개 형질전환에서 캘러스 형성율은 60.6%로 나타났으며, 캘러스로부터 9개의 신초가 재생되었다. 재생된 신초를 분리하여 항생제가 포함된 신초 신장배지에서 배양하였다. 신초신장배지에서 일부 계통은 갈변되면서 고사하였으며 최종적으로 7개의 형질전환 계통을 선발할 수 있었다. 본 실험에서 보고유전자 *GFP* 도입 형질전환 효율은 3.2%로 나타났다(표 4).

표 4. 국화 ‘신마’의 보고유전자 *GFP* 도입 형질전환 효율

No. of explants	No. of callus formed	Callus formation (%)	No. of regenerated shoots	Shoot regeneration (%)	No. of survived shoots	Transformation efficiency (%)
216	131	60.6	9	4.2	7	3.2

나. 보고 유전자 도입 국화 형질전환 계통의 발현 분석

국화 스탠다드 품종 ‘신마’를 대상으로 보고유전자 *GFP*를 도입하여 생산한 형질전환 신초의 *GFP* 발현 여부를 검정하기 위해 형질전환 식물체의 green fluorescent protein (*GFP*) 형광을 현미경을 이용하여 조사하였다. *GFP* 형광 관찰을 위하여 470/40 nm의 exciter 필터, 495 nm LP dichromatic beam splitter, 525/50 nm barrier 필터를 장착한 실체형광현미경 (Stemi SV11, Zeiss, Germany)을 사용하였다. 신장배지(TEM)에서 신장과 발근이 성공적으로 이루어진 형질전환 식물체를 대상으로 잎과 줄기를 절단하여 형광현미경을 통해 *GFP* 발현을 관찰하였다.

이 결과 형질전환하지 않은 대조구에서는 GFP가 발현되지 않았으나 형질전환 신초에서는 줄기 절단면 부분에서 GFP가 강하게 발현되는 것을 확인하여 유전자 도입과 발현이 성공적으로 이루어진 것을 알 수 있었다(그림 61).

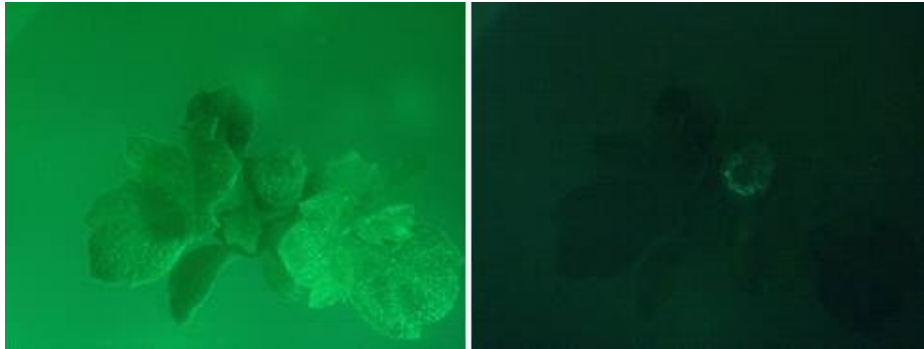


그림 61. 형광현미경을 통한 국화 형질전환체의 GFP 발현 검정. 좌 : 국화 Wild-type, 우 : 형질전환체

제 4 절. 식물 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체 육성

본 연구팀은 제1협동과제 연구팀에서 개발한 기확보 유전자 4종 및 유용 유전자 4종을 전달받아 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 통하여 식물의 수명이 연장된 우량 형질전환 계통을 개발하고자 연구를 수행하였다.

이를 위하여 제1협동과제 연구팀으로부터 기능성 유전체 연구를 통하여 개발한 기확보 유전자 4종 및 유용 유전자 4종에 대한 형질전환 벡터 construct가 도입된 *A. tumefaciens*를 전달받았다. 그리고 국화 스탠다드 품종 ‘신마’의 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 통하여 이들 유전자를 도입하기 위한 형질전환을 수행하였으며, 도입 유전자별로 형질전환체를 생산한 다음 표현형 및 기능 분석을 실시하여 최종적으로 우량 형질전환 계통을 선발하였다.

1. 국화 형질전환용 벡터 construct 제작

식물의 수명 연장 국화 형질전환체를 개발하고자 기능이 검정된 기확보 수명연장 유전자 4종에 대한 발현 construct를 제작하였다. 적용 유전자는 *ORE12*, *ORE15*, *AtGA2ox4*, 그리고 *ATHG1*이며, 적용 벡터는 *ORE15*의 경우 항시 발현 35S promoter를 가진 pCAMBIA3301 벡터, *ORE12*의 경우 2X 35S promoter를 가진 pNB96 벡터, 그리고 *ATHG1*와 *AtGA2ox4*의 경우 발달 단계 동안 발현양을 조절할 수 있는 SEN1 promoter를 가진 pCSEN 벡터를 사용하였다(그림 62).

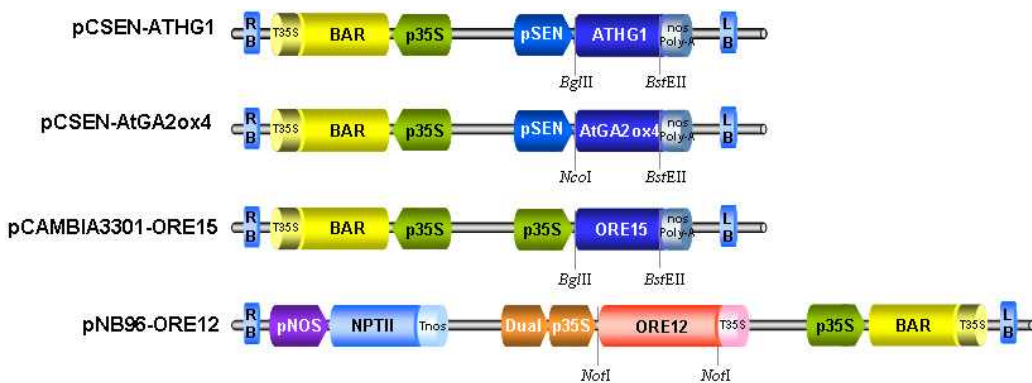


그림 62. 기확보 유전자에 대한 국화 형질전환용 벡터 construct. RB, right border; LB, left border; BAR, phosphinothricin resistance gene; p35S, CaMV 35S promoter; T35S, poly A signal of CaMV 35S; pSEN, SEN1 promoter; nos Poly A; poly A signal of nos.

한편 유용 유전자 4종(*ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7* 그리고 *ATPG8*)은 발달단계 동안 임의로 발현을 조절하기 위해 inducible promoter, SEN1 promoter를 적용한 pCSEN 벡터(그림 66)를 사용하여 국화 형질전환용 벡터를 제작하였다. *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG8* 4종의 유용 유전자는 모두 벡터로의 도입을 성공하여, 국화 형질전환 및 형질전환 식물체 생산에 사용하였다.



그림 63. Inducible promoter, SEN1 promoter를 적용한 pCSEN 벡터를 이용한 유용 유전자에 대한 국화 형질전환용 벡터 construct. RB, right border; LB, left border; BAR, DL-phosphinothricin resistance gene; p35S, CaMV 35S promoter; T35S, poly A signal of CaMV 35S; pSEN, SEN1 promoter; nos Poly A; poly A signal of nos.

2. 기확보 수명연장 유전자 4종 도입 국화 형질전환체 생산 및 기능 분석

본 연구팀은 상업적 가치가 높은 절화용 화훼 작물로서 노화 지연 및 생산성 증대 우량 국화 품종을 개발하기 위하여 기능이 검증된 기확보 유전자 *ORE15*, *AtGA2ox4*, *ATHG1*와 *ORE12* 도입 형질전환을 수행하였다. 형질전환을 수행하여 확보된 형질전환체에 대한 기능 분석을 통해 노화지연 및 생산성 증대 우량 국화 형질전환체로서의 가치가 있음을 확인하였다. 이 4종 유전자 도입 형질전환체 생산 및 기능 분석을 수행하는 세부 연구내용은 다음과 같다.

가. 기확보 유전자 도입 형질전환체 생산

협동과제팀으로부터 전달받은 수명연장 유전자 *ORE15*, *AtGA2ox4*, *ATHG1*와 *ORE12* 유전자를 이용하여 국화 ‘신마’ 형질전환을 수행하였다. 수명연장 유전자가 도입된 형질전환체를 생산하기 위하여 기내 배양 신초로부터 잎을 절취하여 만들어진 절편체를 사용하여 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 실시하였다. 형질전환 실험에서 기본배지로 신초재생배지를 사용하였는데, 신초재생배지(SIM)는 MS 염류와 비타민, sucrose 30g/L, agar 8g/L인 기본배지에 BA 2.0mg/L, NAA 0.5mg/L가 첨가된 배지를 사용하였다. 액체 MS 배지에서 배양한 세균현탁액에 절단한 절편체를 침지하여 실온에서 20분간 접종한 후 신초재생배지(SIM)에 acetosyringone 100 μ M을 첨가한 공조배양배지(CM)에서 3일간 배양하였다. 배양 후 신초재생배지(SIM)에 PPT 1.5mg/L, Cx 500mg/L가 첨가된 선발배지(TSM)에서 4주 동안 암배양 한 후 16/8 광주기인 명조건으로 옮겨 배양하였다.

암배양 2-3주 후부터 leaf primordia가 형성되었고, 배양 3-4주 후부터 다수의 신초가 형성되기 시작하였다. 배양 8-12주 후에 multi shoot를 절편체로부터 분리하여 MS배지에 PPT 2.0mg/L가 첨가된 신장배지로 옮겨 형질전환 신초의 신장과 발근을 유도하였다. 기확보 수명연장 유전자가 도입된 형질전환체는 항생제가 포함된 신장배지에서 성공적으로 발근되었다(그림 64).

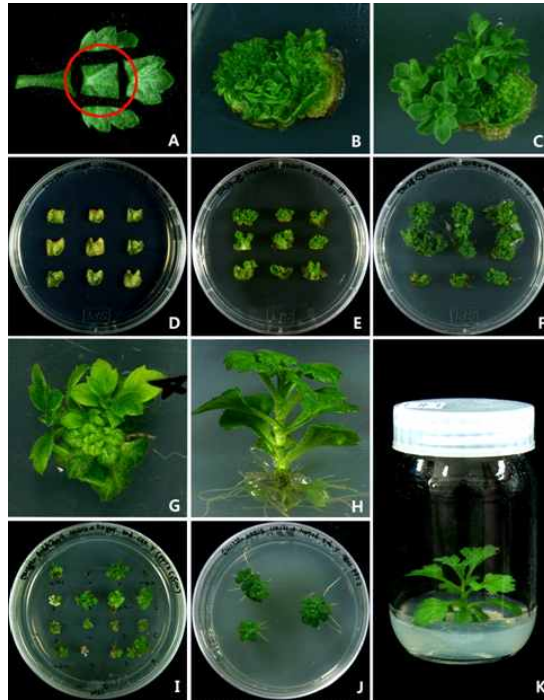


그림 64. 국화 ‘신마’의 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 통한 수명연장 유전자 도입 형질전환 식물체 생산

국화 ‘신마’의 수명연장 유전자 도입을 위한 형질전환 효율을 비교해 보았을 때 도입 유전자에 따라 차이를 나타내었다. 절편체의 생존율은 92.6-100.0%로 거의 차이를 보이지 않았으나, 캘러스 형성율은 36.3-93.6%로 상당한 차이가 있었다. 또한 절편체로부터의 신초 재생율도 26.7-82.1%로 매우 큰 차이를 보여주었다. 그러나 PPT가 포함된 신초신장배지에서 재생 신초를 배양하였을 때 다수의 신초가 갈변 고사하였고, 생존한 형질전환 신초는 2.9-16.0%로 나타났다. 형질전환을 통하여 생산된 형질전환 신초 가운데 기내에서 성공적으로 발근된 계통을 보면 *ORE15*는 16계통, *AtGA2ox4*는 18계통, *ATHG1*는 10계통, 그리고 *ORE12*는 20계통이었다. 이 계통들의 PCR 분석을 통하여 유전자 도입이 확인된 계통을 기준으로 최종적인 형질전환 효율을 계산한 결과, *ORE15* 유전자는 3.3%, *AtGA2ox4* 유전자는 9.0%, *ATHG1* 유전자는 1.4% 그리고 *ORE12* 유전자는 8.0%로 나타났다(표 5).

표 5. 국화 '신마'의 기확보 수명연장 유전자 *ORE15*, *AtGA2ox4*, *ATHG1*와 *ORE12* 도입을 위한 형질전환 효율

Vector	Target gene	No. of explants (A)	No. of survived explants ^z	Survival rate (%) ^z	No. of explants with calli ^z	Callus formation (%) ^z	No. of explants with shoot ^z	Shoot regeneration (%) ^z	No. of shoots subcultured onto TEM ^y	No. of plants survived on TEM ^x	PCR positive shoots (B)	Transformation efficiency (B/A %)
pCAMBIA 3301	<i>ORE15</i>	420	389	92.6	339	80.7	112	26.7	205	16	14	3.3
pCSEN	<i>AtGA2ox4</i>	201	201	100.0	73	36.3	165	82.1	471	18	18	9.0
pCSEN	<i>ATHG1</i>	348	347	99.7	155	44.5	241	69.3	509	10	10	1.4
pNB96	<i>ORE12</i>	125	122	97.6	117	93.6	65	52.0	49	20	10	8.0

수명연장 유전자 *ORE15*, *AtGA2ox4*와 *ATHG1*을 이용하여 국화 ‘신마’ 형질전환을 수행한 후, 선발배지에서의 재생과정을 거쳐 신장배지(TEM)에서 성공적으로 신장 및 발근이 이루어진 형질전환 신초를 선별하여 분자 분석을 통해 유전자 도입 여부와 유전자 발현을 확인하였다. PCR 검정을 통해 유전자 도입여부가 확인된 소식물체를 기내에서 꺼내어 온실에 활착하여 장일조건(16/8)에서 6주간 재배한 후, 식물의 초장이 30cm 이상이 되었을 때 단일처리(12/12)를 시작하여 개화를 유도하였다. 유전자의 기능 분석을 하기 위해 수명연장 유전자 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체를 온실에서 재배하여 성장 및 개화특성 검정과 형질전환체 생리검정을 수행하였다(그림 65).



그림 65. 기확보 수명연장 유전자 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 생육특성 검정을 위한 온실 재배 모습

나. *ORE15* 유전자 도입 국화 형질전환체 : 고생장성 농업형질 발현

(1) *ORE15* 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석

(가) PCR과 RT-PCR 검정 : *ORE15* 유전자 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체를 확보하기 위해 형질전환을 실시하였다. 선발 및 재생 과정을 통하여 선발배지에서 신장 및 발근이 성공적으로 이루어진 신초 16 계통을 확보하였다. 이 계통을 대상으로 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 목적 유전자 *ORE15*와 선발마커유전자 *bar*에 대한 PCR을 실시하였다.

형질전환을 통해 재생된 16계통 중 14계통에서 *ORE15* 유전자 732bp와 *bar* 유전자 314bp에 해당되는 band가 나타났으며 이를 근거로 14계통을 형질전환 계통으로 구분하였다. PCR을 통하여 유전자 도입이 확인된 14개 형질전환 계통에 대한 RT-PCR을 통하여 *ORE15* 유전자의 발현을 확인하였다(그림 66).

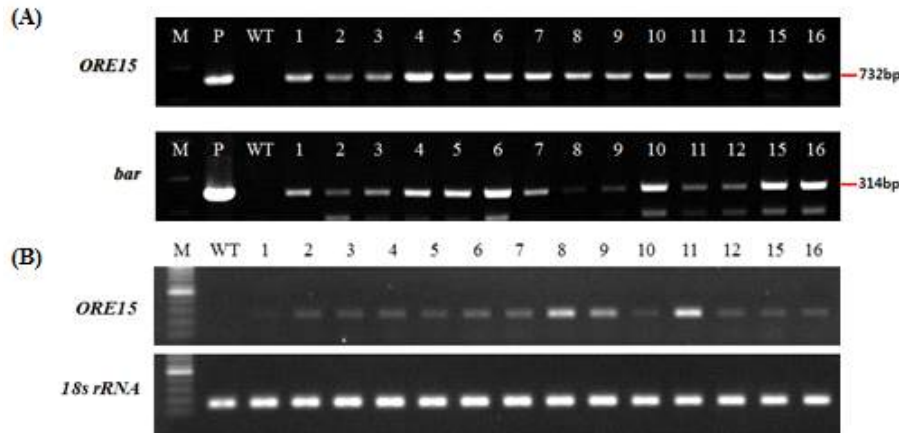


그림 66. *ORE15* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 (A) PCR과 (B) RT-PCR을 통한 유전자 도입 및 발현 검정

(나) qPCR 검정 : *ORE15* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환 계통의 예상되는 T-DNA copy 수를 조사하기 위해 genomic PCR을 통해 유전자 도입이 확인된 형질전환 계통을 대상으로 qPCR 검정을 수행하였다. DNA 정량용 항시발현 국화 *18S rRNA* 유전자와 copy 수 분석용 선발마커 유전자 *bar*의 염기서열을 기초로 하여 qPCR 용 primer와 probe를 제작하였으며, 이를 이용하여 qPCR을 이용한 copy수 분석은 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 방법으로 copy 수를 분석하였고 같은 조건의 실험을 3반복 수행하였다.

ORE15 유전자 도입 국화 형질전환체 copy 수를 확인한 결과, 14개 형질전환 계통중 2개 이상의 copy 수를 가지고 있는 것으로 예상되는 1번 계통을 제외한 나머지 13개 형질전환 계통에서 copy 수가 2개 이하로 적은 T-DNA copy가 도입된 것으로 판단된다(그림 67).

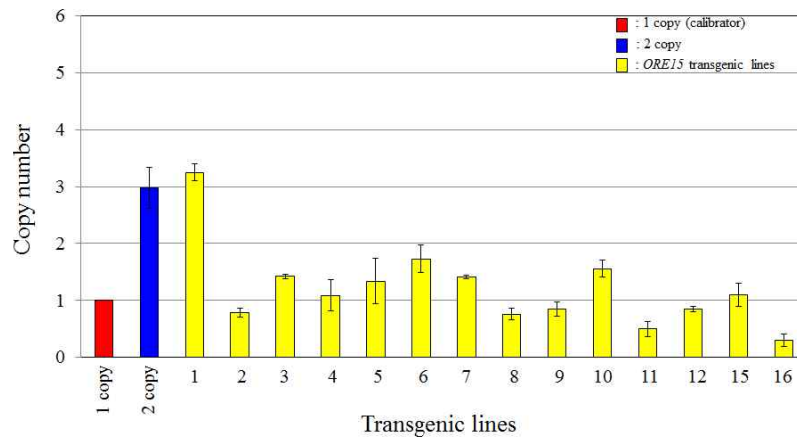


그림 67. *ORE15* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 qPCR을 통한 copy 수 분석

(다) Southern blot 검정 : *ORE15* 유전자가 도입된 국화 형질전환체의 T-DNA copy 수를 알아보고자 genomic PCR, qPCR 그리고 표현형 검정을 통해 유전자 도입 및 표현형적 특징이 확인된 8개 형질전환 선발계통(1, 2, 3, 6, 8, 10, 11, 16)을 대상으로 Southern blot 검정을 수행하였다.

ORE15 유전자가 도입된 형질전환 선발계통 중 초장이 증가한 11번 형질전환 계통은 T-DNA 수가 1 copy 도입된 것으로 보여지며, 나머지 선발계통은 2 copy 이상의 multi copy가 도입된 것으로 나타났다(그림 68).

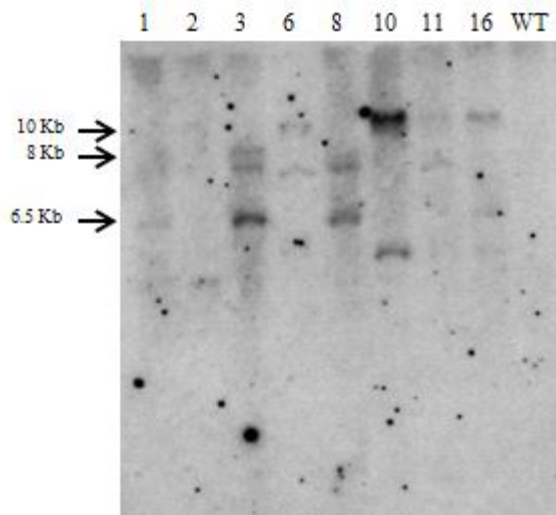


그림 68. *ORE15* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 Southern blot 분석

(2) *ORE15* 형질전환체의 일차 표현형 분석

(가) 표현형 검정 : PCR과 RT-PCR을 통해 유전자 도입 및 발현이 확인된 *ORE15* 유전자 도입 국화 14개 형질전환 계통을 이용한 예비실험으로 온실에서 표현형 검정을 실시하여 애기장대에서 나타난 것과 유사한 표현형을 나타내는 6개의 형질전환 계통을 선발하였으며 이후부터 선발 계통을 이용하여 정밀 분석을 실시하였다(그림 69)

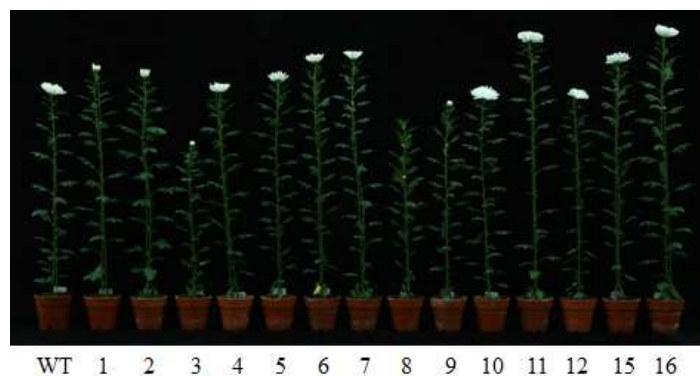


그림 69. *ORE15* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 표현형

(나) 온실 재배를 통한 성장 및 개화특성 검정 : 선발된 *ORE15* 유전자 도입 6개의 국화 형질전환 계통(1, 6, 7, 11, 15, 16)의 생산성 증대에 대한 농업적 형질을 확인하기 위해 대조구와 함께 온실에서 재배하여 성장 및 개화 특성을 검정하였다.

선발된 6개의 형질전환 계통을 재배하여 개화를 유도한 후 초장, 설상화 수, 지상부 생체중, 화

경 등의 성장 및 개화 특성을 조사하였다. 대조구에 비해 모든 형질전환 계통에서 초장이 증가하였는데, 1, 11, 15와 16번 형질전환 계통은 대조구에 비해 초장이 각각 10.0%, 22.1%, 16.6%, 24.5% 증가하였다. 또한 초장이 증가한 4개의 형질전환 계통은 대조구에 비해 설상화 수가 28.0%, 20.4%, 25.4%, 28.4% 증가하였고, 생체중의 경우 11, 16번 형질전환 계통은 대조구에 비해 40.3%, 38.1%가 증가하였다. 초장이 증가한 1, 15번 형질전환 계통은 대조구에 비해 생체중이 다소 증가한 것으로 나타났으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다. 초장과 설상화 수가 증가한 1번 형질전환 계통은 화경이 대조구에 비해 25.3%로 증가하여 생산성 증대 효과가 큰 것으로 나타났다. 초장, 설상화수 그리고 생체중 증가로 생산성 증대 효과가 인정된 11, 16번 형질전환 계통은 qPCR 검정시 copy 수도 1 copy로 예상되어 이벤트화 가능성이 높다고 생각된다 (그림 70, 71).

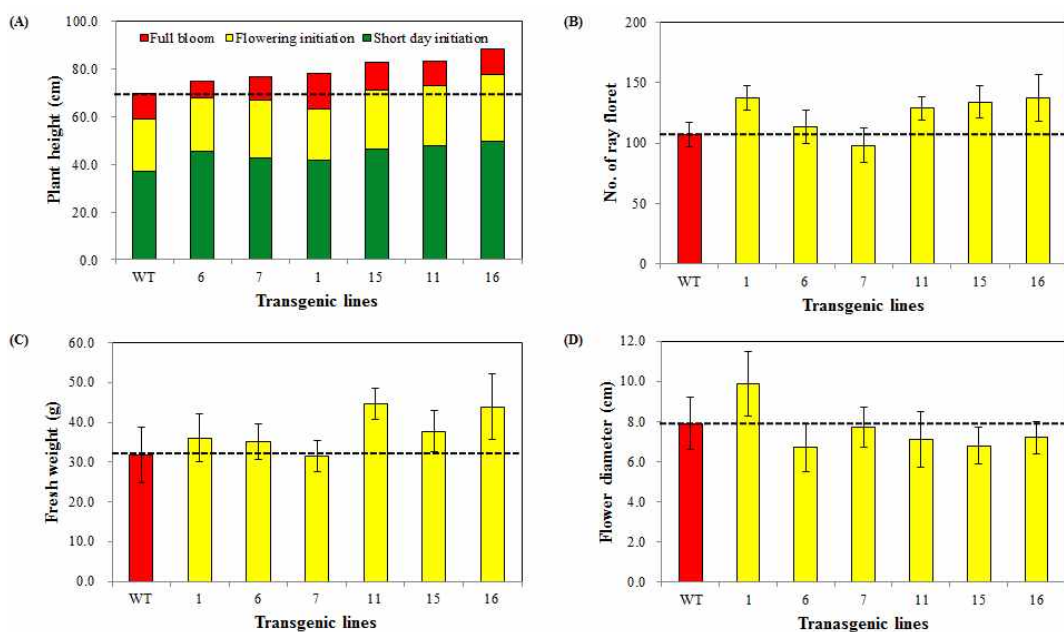


그림 70. *ORE15* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 설상화수, (C) 지상부 생체중, (D) 화경

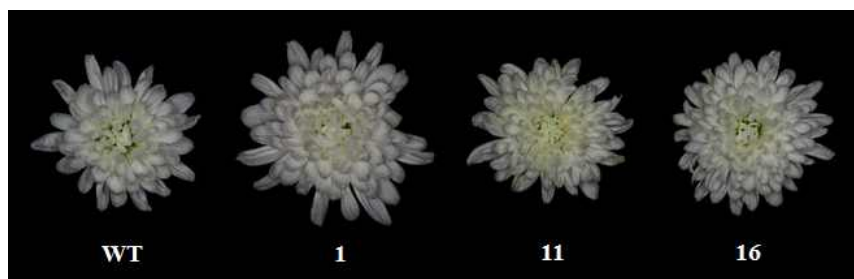


그림 71. *ORE15* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 만개기 꽃의 모습

(3) *ORE15* 형질전환체의 이차 기능 분석

(가) 생리 특성 검정 : *ORE15* 유전자의 목표형질 중 하나인 노화지연 특성을 검정하기 위해

온실에서 재배된 *ORE15* 도입 국화 형질전환체가 개화하였을 때, 정단부를 포함한 줄기 30cm 부분을 비스듬하게 절단한 후 증류수가 채워진 시험관에 삽화하고 꽃 냉장고에 저장하면서 절화 수명과 엽록소 함량 변화를 관찰하였다. 절화는 온도 12°C, 습도 70%, 광도 22 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 하에서 12시간 광 처리 조건의 꽃 냉장고에 저장하였다. 꽃과 잎의 절화 수명은 대조구에서 22-23일이었으며, 형질전환 계통간에 차이가 나타났다. 6번 형질전환 계통은 꽃과 잎의 절화 수명이 각각 24, 30일로 나타나 선발된 6개 형질전환 계통 중 절화의 수명이 가장 많이 연장된 것으로 나타났다(그림 72A).

절화의 잎 노화를 검정하기 위해 꽃 냉장고에 저장된 절화를 총 4주간 일주일 간격으로 엽록소 간이 측정기(SPAD-502, Minolta)를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 측정위치는 증류수가 채워진 시험관에서부터 3장의 잎을 선택하여 잎의 주맥을 중심으로 엽맥이 포함되지 않도록 좌, 우 부분을 측정하였다. 엽록소 함량 측정시 0일차에 측정한 엽록소 함량은 대조구(52.4)와 형질전환 계통간에 큰 차이가 나타나지 않았다. 그러나 절화 저장 2주 후 엽록소 함량이 현저히 감소하여 측정 4주차에는 대조구가 37.7% 감소하였고 6번 형질전환 계통은 28.3% 감소하여 엽록소 함량이 대조구에 비해 적은 감소율을 나타내었다. 그러나 통계적 유의성은 인정되지 않았고, 이로 보아 *ORE15* 도입 국화 형질전환 계통에서 절화의 수명 연장 효과는 나타나지 않았다(그림 72B).

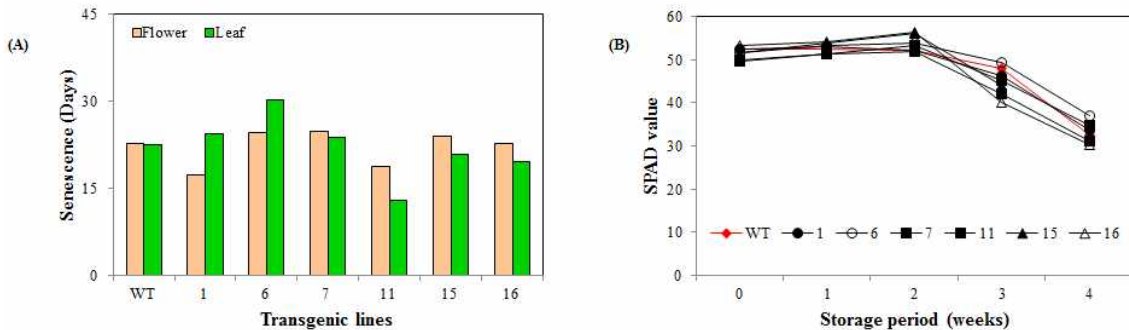


그림 72. *ORE15* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 생리 검정. (A) 절화 수명, (B) 절화 잎의 SPAD value

ORE15 유전자 도입 국화 형질전환 선발 계통이 초장, 설상화 수, 생체중 그리고 화경 등의 생장 및 개화특성에서 대조구에 비해 전반적으로 증가한 것으로 나타났으나, 절화 수명 연장 효과는 인정되지 않았다. 최종적으로 선발 계통 중 일부 계통(11번, 16번 계통)은 대조구에 비해 고생장성 표현형을 나타내어 앞으로 이벤트로의 육성이 가능한 우수 형질전환 계통이라고 판단되며, *ORE15* 유전자는 국화에서 생산성 증대라는 고생장성 농업 형질을 가진 우량 형질전환체를 생산할 수 있는 유용 유전자임을 확인할 수 있었다.

다. *AtGA2ox4* 유전자 도입 국화 형질전환체 : semi-dwarfism 목표형질 발현

(1) *AtGA2ox4* 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석

(가) PCR과 RT-PCR 검정 : 국화 스탠다드 품종 ‘신마’를 공시 재료로 사용하여 *AtGA2ox4* 유전자를 도입하기 위한 형질전환을 실시하였다. 형질전환을 통해 재생된 신초 중 항생제가 포함된 신장배지에서 발근 및 신장이 성공적으로 이루어진 형질전환 식물체 18계통을 확보하였다. 이들 계통을 대상으로 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 목적 유전자 *AtGA2ox4*와 선발마커유전자 *bar*에 대한 PCR을 실시하였다.

선발된 18개 계통 형질전환체의 PCR 분석에서 목적 유전자 *AtGA2ox4*와 선발마커유전자 *bar*에 해당하는 각각 879bp와 314bp의 band가 모든 형질전환체에서 나타났다. PCR을 통해 유전자 도입이 확인된 18개 형질전환 계통에 대한 RT-PCR을 실시하였을 때, 모든 형질전환 계통에서 삽입된 *AtGA2ox4* 유전자가 발현되고 있음을 확인할 수 있었으며, 형질전환 계통간에 유전자의 발현에 차이가 나타났다(그림 73).

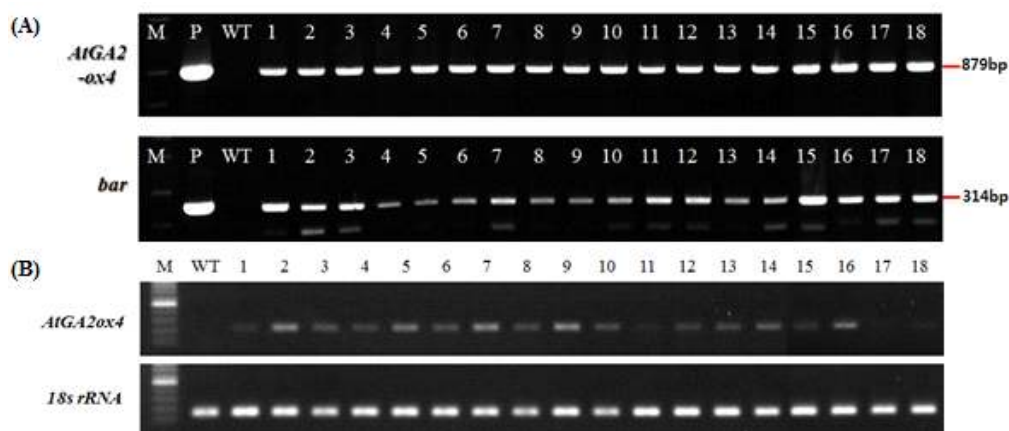


그림 73. *AtGA2ox4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 (A) PCR과 (B) RT-PCR을 통한 유전자 도입 및 발현 검정

(나) qPCR 검정 : *AtGA2ox4* 유전자가 도입된 국화 형질전환체의 예상되는 T-DNA copy 수를 알아보기 위해 genomic PCR로 유전자 도입이 확인된 18개 국화 형질전환 계통을 대상으로 qPCR 검정을 수행하였다. Primer와 probe는 선발마커유전자 *bar*의 염기서열을 기초로 제작하였으며 qPCR을 이용한 copy수 분석은 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 방법으로 분석하였고 같은 조건의 실험을 3반복 수행하였다.

AtGA2ox4 유전자 도입 국화 형질전환체를 대상으로 도입 유전자의 copy 수를 확인 한 결과, 18개 형질전환 계통에서 도입된 유전자의 copy 수가 계통간에 다양한 차이를 보여주었고 이들 중 2 copy 이하인 계통은 약 10계통으로 예상되었다(그림 74).

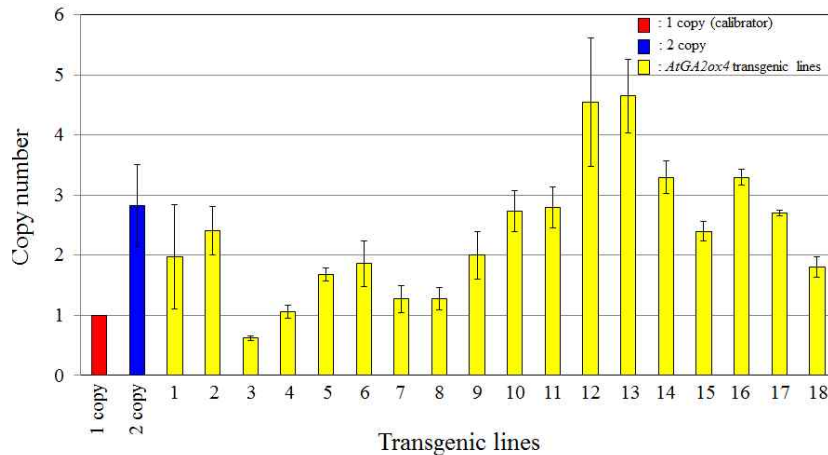


그림 74. *AtGA2ox4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 qPCR을 통한 copy 수 분석

(다) Southern blot 검정 : *AtGA2ox4* 유전자가 도입된 국화 형질전환체의 T-DNA copy 수를 알아보하고자 genomic PCR, qPCR 그리고 표현형 검정을 통해 유전자 도입 및 표현형적 특징이 확인된 6개 형질전환 선발계통(1, 3, 9, 10, 13, 17)을 대상으로 Southern blot 검정을 수행하였다.

AtGA2ox4 유전자가 도입된 형질전환 선발계통은 왜화현상과 수명연장 효과가 나타난 8, 9번 계통, 초장이 증가한 1, 13번 형질전환 계통, 그리고 대조구와 차이를 보이지 않은 10, 17번 계통이었다. 왜화현상과 수명연장 효과가 인정된 8, 9번 형질전환 계통은 T-DNA가 1 copy 도입된 것으로 보여지며, 반대로 초장이 증가한 1, 13번 형질전환 계통은 2 copy 이상의 multi copy가 도입된 것으로 나타났다(그림 75).

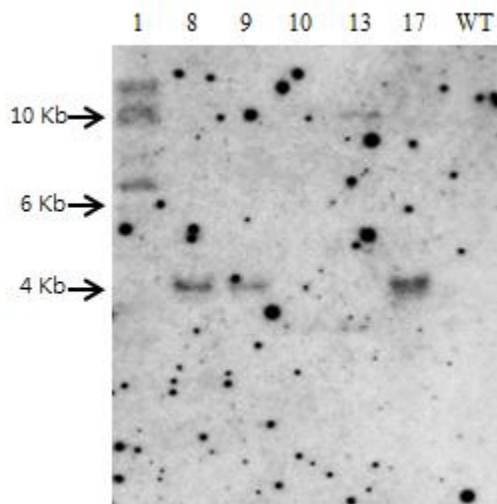
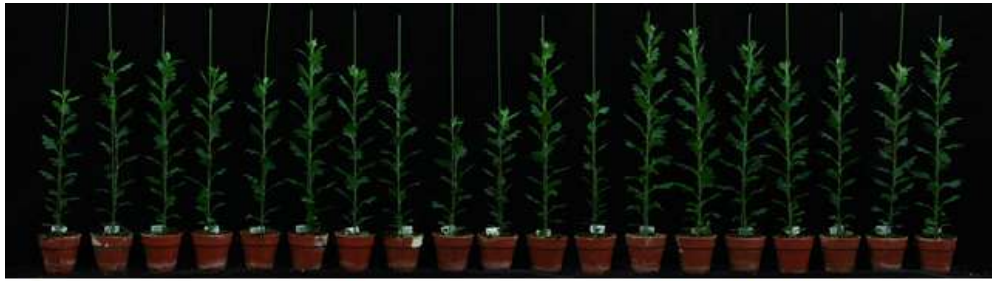


그림 75. *AtGA2ox4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 Southern blot 분석

(2) *AtGA2ox4* 형질전환체의 일차 표현형 분석

(가) 표현형 검정 : PCR과 RT-PCR을 통해 유전자 도입 및 발현이 확인된 *AtGA2ox4* 유전자 도입 국화 18개 형질전환 계통을 이용한 예비실험으로 표현형 검정을 실시하여 4개의 형질전환 계통을 선발하였으며 이후부터 선발된 4계통을 이용하여 정밀 분석을 실시하였다(그림 76).



WT 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

그림 76. *AtGA2ox4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 표현형

(나) 온실 재배를 통한 성장 및 개화특성 검정 : 선발된 *AtGA2ox4* 유전자 도입 4개의 국화 형질전환 계통(1, 8, 9, 13번 계통)의 생산성 증대에 대한 농업적 형질을 확인하기 위해 대조구와 함께 온실에서 재배하여 성장 및 개화 특성을 검정하였다.

선발된 4개의 형질전환 계통을 재배하여 개화를 유도한 후 초장, 설상화 수, 지상부 생체중, 화경 등의 성장 및 개화 특성을 조사하였다. 8, 9번 형질전환 계통에서는 대조구에 비해 초장이 각각 14.0%, 9.8% 감소하였고 설상화 수가 46.8%, 15.6% 증가하였으며 생체중과 화경은 대조구와 차이가 인정되지 않았다. 한편, 1, 13번 형질전환 계통에서는 대조구에 비해 초장이 각각 18.6%, 12.9% 증가하였고 13번 계통에서는 생체중도 54.0% 증가하였으나, 설상화 수와 화경은 32.3%, 38.8% 감소하였다(그림 77, 78).

국화의 *AtGA2ox4* 형질전환 계통의 성장 및 개화 특성을 검정하였을 때, 초장과 생체중이 증가한 계통(1, 13번)과 반대로 감소한 계통(8, 9번)이 나타났다. 이와 같이 *AtGA2ox4*라는 gibberellin oxidase를 생합성하는 유전자를 도입되었음에도 불구하고 서로 다른 표현형을 나타낸 것은 도입 유전자의 copy 수에 의한 유전자 발현의 차이에 기인한 것이라 사료된다. 본 연구의 Southern blot 분석 결과를 보면 8, 9번 계통은 1 copy가 도입되었으며, 1, 13번 계통에서는 3 copy 이상의 multi copy가 도입되었음을 알 수 있었다. 즉 low copy가 도입된 8, 9번 계통에서는 *AtGA2ox4* 유전자가 많이 발현되어 초장이 대조구에 비해 증가하였으나 1, 13번 계통에서는 multi copy가 도입되어 co-suppression 효과가 나타난 것으로 판단된다. 이로 인하여 1, 13번 형질전환 계통에서는 오히려 내생 gibberellin 농도가 증가하여 초장의 증가를 가져온 것이라고 생각되며, 이를 확인하기 위하여 *AtGA2ox4* 형질전환 계통의 gibberellin 함량 분석을 실시할 예정이다.

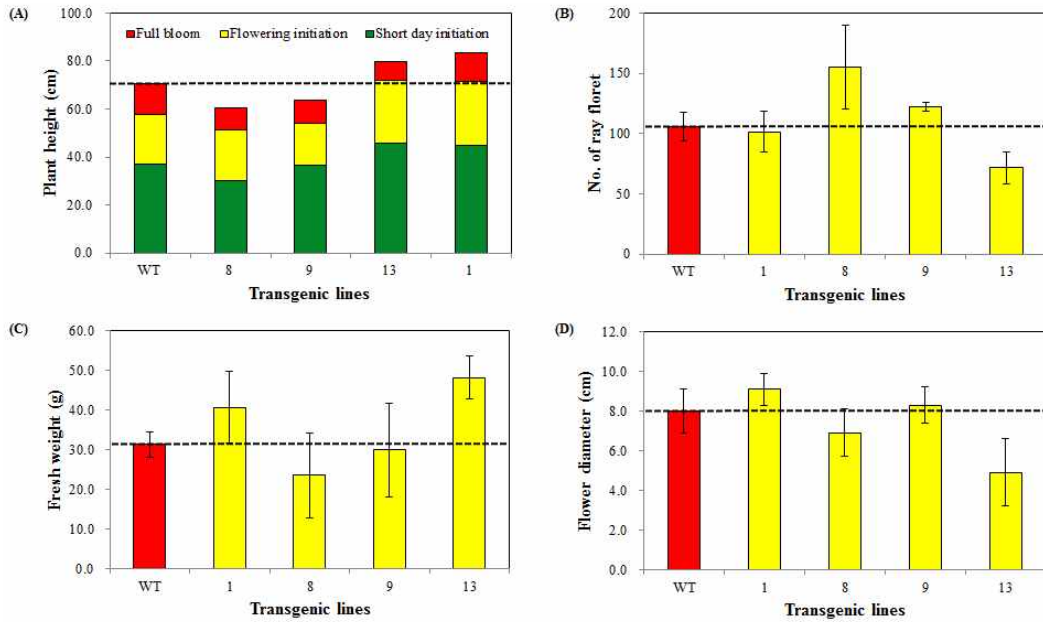


그림 77. *AtGA2ox4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 설상화수, (C) 생체중, (D) 화경



그림 78. *AtGA2ox4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 만개기 꽃의 모습

(3) *AtGA2ox4* 형질전환체의 이차 기능 분석

(가) 생리 특성 검정 : *AtGA2ox4* 유전자의 노화지연 특성을 검정하기 위해 온실에서 재배된 *AtGA2ox4* 도입 국화 형질전환체의 개화를 유도한 후, 정단부를 포함한 줄기 30cm 부분을 비스듬하게 절단하여 증류수가 채워진 시험관에 삽화하고 꽃 냉장고에 저장하면서 절화 수명과 엽록소 함량 변화를 관찰하였다. 절화는 온도 12°C, 습도 70%, 광도 $22\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 하에서 12시간 광 처리 조건의 꽃 냉장고에 저장하였다. 꽃과 잎의 절화 수명은 대조구에서 22-23일이었으며, 형질전환 계통간에 차이가 나타났다. 형질전환 계통 중 초장이 증가한 1, 13번 형질전환 계통의 경우 대조구에 비해 절화 잎의 수명이 다소 연장된 것으로 나타났으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다(그림 79A).

절화의 잎 노화를 검정하기 위해 꽃 냉장고에 저장된 절화를 총 4주간 일주일 간격으로 엽록소 간이 측정기(SPAD-502, Minolta)를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 측정위치는 증류수가 채워진 시험관에서부터 3장의 잎을 선택하여 잎의 주맥을 중심으로 엽맥이 포함되지 않도록 좌, 우 부분을 측정하였다. 대조구의 경우 엽록소 측정 2주차 이후부터 엽록소 함량이 급격히 감소하여 4주차의 엽록소 함량 감소율이 34.2%로 나타났다. *AtGA2ox4* 도입 형질전환체에서

는 전반적으로 절화 앞의 엽록소 함량 감소율이 대조구에 비해 적었으나 통계적 유의성은 없었으며, 이로 보아 *AtGA2ox4* 도입 국화 형질전환 계통에서 절화의 수명 연장 효과는 인정되지 않았다(그림 79B).

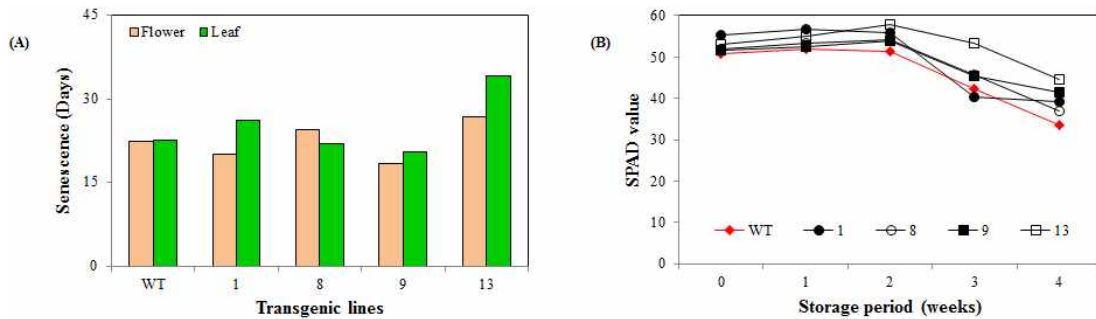


그림 79. *AtGA2ox4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 생리 검정. (A) 절화 수명, (B) 절화 앞의 SPAD value

AtGA2ox4 도입 애기장대의 경우 왜화현상이 나타난 계통에서 노화지연이 뚜렷하게 나타났지만 국화에서는 다소의 노화 지연 효과가 나타나기는 했으나 통계적 유의성은 인정되지 않아 노화 지연 효과는 없는 것으로 판단된다.

라. *ATHG1* 유전자 도입 국화 형질전환체

(1) *ATHG1* 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석

(가) PCR과 RT-PCR 검정 : 국화 스탠다드 품종 ‘신마’를 공시 재료로 사용하여 *ATHG1* 도입 형질전환을 실시하였으며, 이를 통해 재생된 신초 중 항생제가 포함된 신장배지에서 발근 및 신장이 성공적으로 이루어진 5개의 형질전환 계통을 확보하였다. 이 계통을 대상으로 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 목적 유전자 *ATHG1*과 선발마커유전자 *bar*에 대한 PCR을 실시하였다.

형질전환을 통해 재생된 5계통의 PCR 검정을 수행한 결과, 목적 유전자 *ATHG1*과 선발마커유전자 *bar*에서 각각 933bp와 314bp에 해당되는 band가 나타났다. PCR을 통해 유전자 도입이 확인된 5개 형질전환 계통에 대한 RT-PCR을 실시하여 *ATHG1* 유전자의 발현을 확인하였다. *ATHG1* 유전자가 도입된 국화 5개 형질전환 계통 모두에서 *ATHG1* 유전자의 발현이 확인되었으나 유전자 발현량은 매우 적게 나타났다(그림 80).

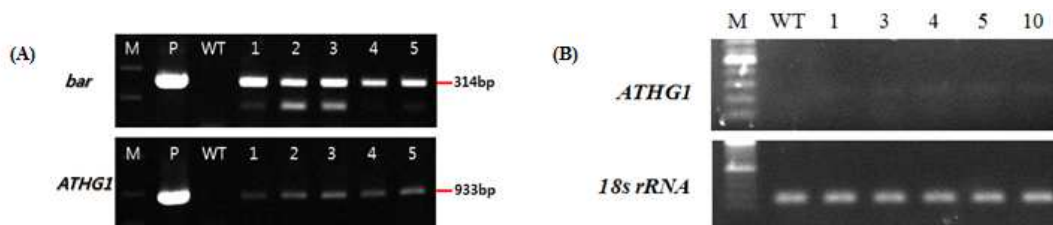


그림 80. *ATHG1* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 (A) PCR과 (B) RT-PCR을 통한 유전자 도입 및 발현 검정

(2) *ATHG1* 형질전환체의 일차 표현형 분석

(가) 온실 재배를 통한 성장 및 개화특성 검정 : *ATHG1* 유전자 도입 및 발현이 확인된 5개 형질전환 계통의 성장 및 개화 특성을 검정하기 위하여 대조구와 함께 온실에서 재배 시험을 수행하였다(그림 81).

ATHG1 도입 5개 국화 형질전환 계통은 대조구에 비해 초장이 6.0-24.5% 감소하였다. 그리고 1, 2번 형질전환 계통에서는 화경이 대조구에 비해 각각 16.9%, 10.4% 감소하였다. 그 외의 다른 조사항목에서는 대조구와 형질전환 계통간의 차이가 인정되지 않았다(그림 82, 83).

ATHG1 유전자가 도입된 애기장대는 유전자의 과발현시 개체 크기와 종자 생산량에서 뚜렷한 증가가 나타났으나 본 연구에서 개발된 *ATHG1* 도입 국화 5개 형질전환체 계통에서는 초장이 감소하고 생산성 증대에 대한 효과가 나타나지 않았다.

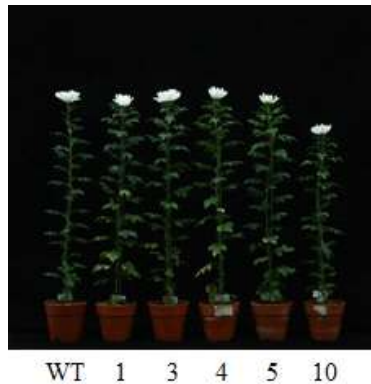


그림 81. *ATHG1* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 표현형

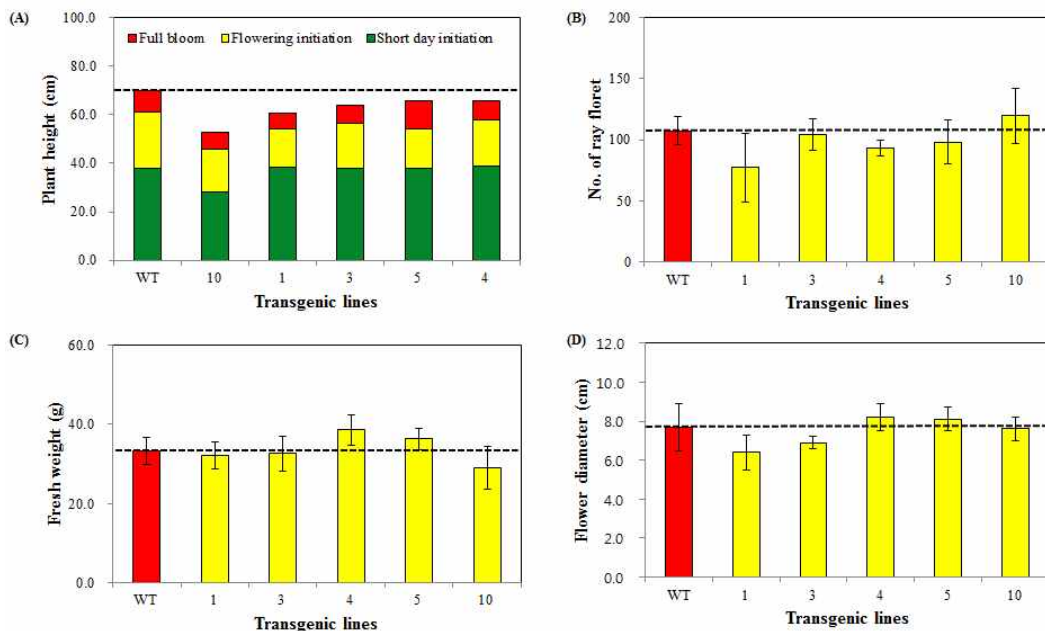


그림 82. *ATHG1* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 설상화수, (C) 생체중, (D) 화경



그림 83. *ATHG1* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 만개기 꽃의 모습

(3) *ATHG1* 형질전환체의 이차 기능 분석

(가) 생리 특성 검정 : *ATHG1* 유전자의 노화지연 특성을 검정하기 위해 온실에서 재배된 *ATHG1* 도입 국화 형질전환체의 개화를 유도한 후, 정단부를 포함한 줄기 30cm 부분을 비스듬하게 절단하여 증류수가 채워진 시험관에 삽화하고 꽃 냉장고에 저장하면서 절화 수명과 엽록소 함량 변화를 관찰하였다. 절화는 온도 12°C, 습도 70%, 광도 $22\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 하에서 12시간 광주기 조건의 꽃 냉장고에 저장하였다. 절화 수명을 조사하였을 때, 절화에서의 꽃과 잎의 수명은 대조구에서 22-23일이었다. 형질전환 계통에서는 계통간의 차이가 나타났는데, 꽃의 수명은 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았고 잎의 수명은 대조구에 비해 전체적으로 감소되었다. 이와 같이 *ATHG1* 도입 국화 형질전환체에서는 예상과 달리 절화의 노화가 대조구에 비해 빠르게 진행되었다(그림 84A).

절화의 잎 노화를 검정하기 위해 꽃 냉장고에 저장된 절화를 총 4주간 일주일 간격으로 엽록소 간이 측정기(SPAD-502, Minolta)를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 측정위치는 증류수가 채워진 시험관에서부터 3장의 잎을 선택하여 잎의 주맥을 중심으로 엽맥이 포함되지 않도록 좌, 우 부분을 측정하였다. 대조구의 경우 엽록소 측정 3주차 이후부터 엽록소 함량이 급격히 감소하기 시작하였고, 절화 채취 시점과 비교하였을 때 처리 4주차의 엽록소 함량 감소율이 38.2%로 나타났다. *ATHG1* 도입 형질전환체 가운데 일부 계통에서는 절화 잎의 엽록소 함량 감소율이 대조구에 비해 다소 적었으나 통계적 유의성은 없었다(그림 84B).

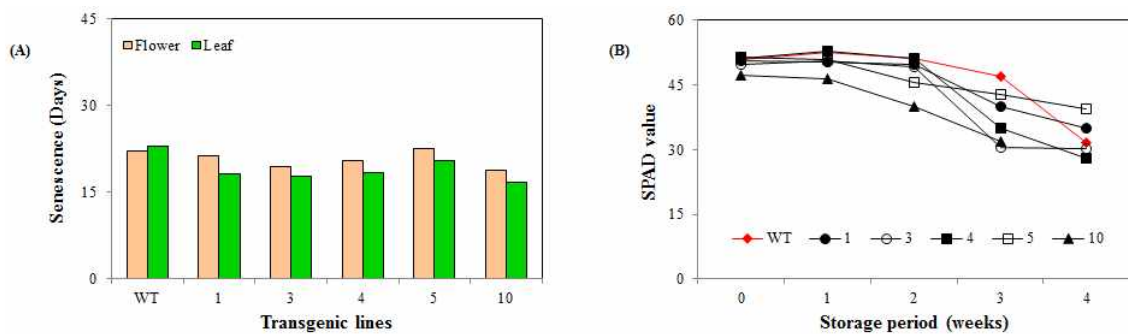


그림 84. *ATHG1* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 생리 검정. (A) 절화 수명, (B) 절화 잎의 SPAD value

애기장대의 경우 *ATHG1* 유전자가 과발현하게 되면 수명연장이 되면서 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구를 통해 개발된 국화 형질전환체의 경우 대조구에 비해 생산성 증대 효과가 나타나지 않았으며 수명은

오히려 단축되는 것으로 나타났다. 결론적으로 *ATHG1* 유전자 도입 국화 형질전환체의 수명연장과 생산성이 증대된 우량 형질전환체를 개발하기 위해서는 보다 많은 형질전환체를 생산하여 이들의 특성을 분석하는 추가적인 연구가 필요할 것이라고 판단된다.

3. 유용 유전자 4종 도입 국화 형질전환체 생산 및 기능 분석

AT-hook domain을 포함하는 *ATPGs* 유전자들이 과발현되는 애기장대 변이체에서는 공통적으로 노화를 지연하는 특징을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 애기장대에서 분리한 *ATPGs* 유전자를 애기장대에 도입하여 과발현시킨 변이체를 분석하였을 때, *ATPG3*과 *ATPG4* 유전자는 수명연장 및 생산성 증대의 표현형적 특징을 나타내었고, *ATPG7*와 *ATPG8* 유전자의 경우 노화지연에 대한 대표적인 표현형적 특징을 나타내었다. 이러한 4가지 유용 유전자가 각각 도입된 pCSEN 벡터를 가진 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환을 통하여 국화 ‘신마’의 형질전환체를 생산한 다음 표현형 및 기능 분석을 실시하여 최종적으로 우량 형질전환 계통을 선발하였다.

가. 유용 유전자 도입 형질전환체 생산

협동과제팀으로부터 전달받은 유용 수명연장 유전자 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*과 *ATPG8* 유전자를 이용하여 국화 ‘신마’ 형질전환을 수행하였다. 수명연장 유전자가 도입된 형질전환체를 생산하기 위하여 기내 배양 식물체로부터 잎을 절취하여 4면을 절단한 절편체를 재료로 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 실시하였다. 형질전환 실험에서는 기본배지로 신초재생배지를 사용하였는데, 신초재생배지(SIM)는 MS 염류와 비타민, sucrose 30g/L, agar 8g/L인 기본배지에 BA 2.0mg/L, NAA 0.5mg/L가 첨가된 배지를 사용하였다. 액체 MS배지에서 배양한 세균현탁액에 절단한 절편체를 침지하여 실온에서 20분간 접종한 후 신초재생배지(SIM)에 acetosyringone 100µM을 첨가한 공조배양배지(CM)에서 3일간 배양하였다. 배양 후 신초재생배지(SIM)에 PPT 1.5mg/L, Cx 500mg/L가 첨가된 선발배지(TSM)에서 4주 동안 암배양 한 후 16/8 광주기인 명조건으로 옮겨 배양하였다.

형질전환된 절편체를 PPT 1.5mg/L, Cx 500mg/L가 포함된 선발배지에서 배양하였을 때, 배양 3-4주 후부터 절편체에서 multi shoot가 형성되기 시작하였다. 이들 절편체를 4주 간격으로 3-4회에 걸쳐 동일한 조성의 배지로 옮겨 배양하였다. 신초의 길이가 0.3-0.5cm 이상 발달하였을 때, multi shoot를 절편체로부터 분리하여 MS배지에 PPT 2.0mg/L가 첨가된 신장배지(TEM)로 옮겨 배양하였다. 신장배지에서 multi shoot중 상당수의 신초가 생장이 멈추고 갈변 고사하였으며 일부의 신초만이 신장과 함께 뿌리를 형성하였다.

국화 ‘신마’의 수명연장 유전자 도입 형질전환 식물체를 생산하는 실험에서의 형질전환 효율은 도입 유전자에 따라 차이를 나타내었다. 형질전환된 절편체의 생존율은 74.1-100.0%, 캘러스 형성율은 74.1-98.0%로 나타났다. 형질전환된 절편체로부터 재생된 신초 가운데 신장배지(TEM)에서 신장 및 발근이 성공적으로 이루어진 계통을 기준으로 형질전환 효율을 계산한 결과 *ATPG3* 유전자 2.2%, *ATPG4* 유전자 4.9%, *ATPG7* 유전자 6.9% 그리고 *ATPG8* 유전자 5.1%인

것으로 나타났다. 현재 유용 수명연장 유전자를 도입한 국화 형질전환 계통을 충분히 확보하기 위하여 추가적으로 형질전환체를 생산하기 위한 실험을 진행하고 있다(표 6).

표 6. 유용 수명연장 유전자 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*와 *ATPG8* 도입 국화 '신마'의 형질전환 효율

Vector	Target gene	No. of explants (A)	No. of survived explants ^z	Survival rate (%) ^z	No. of explants with calli ^z	Callus formation (%) ^z	No. of explants with shoot ^z	Shoot regeneration (%) ^z	No. of shoots subcultured onto TEM ^y	No. of plants survived on TEM ^x (B)	Transformation efficiency (B/A %)
pCSEN	<i>ATPG3</i>	90	87	96.7	84	93.3	75	83.3	135	2	2.2
pCSEN	<i>ATPG4</i>	81	60	74.1	60	74.1	60	74.1	225	4	4.9
pCSEN	<i>ATPG7</i>	102	100	98.0	100	98.0	62	60.8	439	7	6.9
pCSEN	<i>ATPG8</i>	79	77	97.5	76	96.2	48	60.8	259	4	5.1

유용 유전자 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*과 *ATPG8*을 이용하여 국화 '신마' 형질전환을 수행한 후, 신초재생배지에서의 신초 형성과정을 거쳐 신장배지(TEM)에서 성공적으로 신장 및 발근이 이루어진 형질전환 식물체를 선별하였다. 선별된 형질전환 계통을 대상으로 분자 분석을 통해 유전자 도입 및 발현을 확인하였다. PCR 검정을 통해 유전자 도입이 확인된 소식물체를 기내에서 꺼내어 활착시킨 후 온실에서 재배하였다. 온실에서 장일조건(16/8)으로 6주간 재배한 후, 식물의 초장이 30cm 이상이 신장되었을 때 단일처리(12/12)를 시작하여 개화를 유도한 다음 형질전환 계통별 성장과 개화특성, 그리고 생리 검정을 실시하였다(그림 85).



그림 85. 유용 수명연장 유전자 도입 국화 '신마' 형질전환체의 생육특성 검정을 위한 온실 재배 모습

나. *ATPG3* 유전자 도입 국화 형질전환체

(1) *ATPG3* 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석

(가) PCR과 RT-PCR 검정 : *ATPG3* 유전자 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체를 확보하기 위해 형질 전환을 실시하였으며, 선발 및 재생 과정을 통하여 선발배지에서 신장 및 발근이 성공적으로 이루어진 2개의 형질전환 계통을 확보하였다. 이 계통을 대상으로 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 목적 유전자 *ATPG3*와 선발마커유전자 *bar*에 대한 PCR을 실시하였다.

ATPG3 도입 형질전환 식물체 2계통의 PCR 분석에서 목적 유전자 *ATPG3*과 선발마커 유전자인 *bar*에서 각각 801bp와 314bp에 해당되는 band가 확인되었다. PCR을 통해 유전자 도입이 확인된 2개 형질전환 계통의 유전자 발현을 검정하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR에서 2개 형질전환 계통 모두 유전자 발현이 확인되었으며, 계통간의 차이는 나타나지 않았다(그림 86).

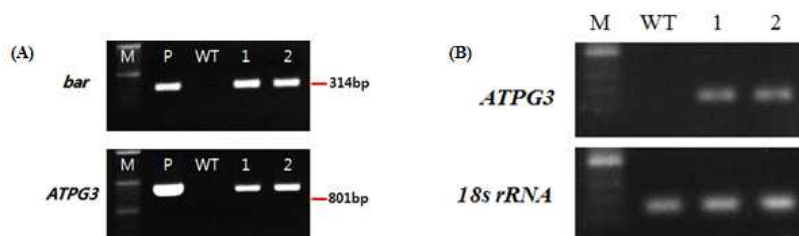


그림 86. *ATPG3* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 (A) PCR과 (B) RT-PCR을 통한 유전자 도입 및 발현 검정

(2) *ATPG3* 형질전환체의 일차 표현형 분석

(가) 온실 재배를 통한 성장 및 개화특성 검정 : PCR과 RT-PCR을 통해 유전자 도입 및 발현이 확인된 *ATPG3* 유전자 도입 국화 형질전환 식물체 2계통을 온실에서 재배하여 표현형 검정을 실시하였다(그림 87).

개화특성을 검정한 결과, 2개의 형질전환 계통은 대조구와 비교하였을 때 초장, 설상화 수, 생체중 그리고 화경 등에서 거의 차이가 없었다(그림 88, 89).

애기장대의 경우 *ATPG3* 유전자의 과발현시 애기장대 야생형에 비하여 개체 크기와 종자 생산량에서 뚜렷한 생산성 증대 현상이 나타났으나, 개발된 *ATPG3* 유전자 도입 국화 형질전환 계통에서는 애기장대와 다르게 생산성 증대 효과가 나타나지 않았다.



WT 1 2

그림 87. *ATPG3* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 표현형

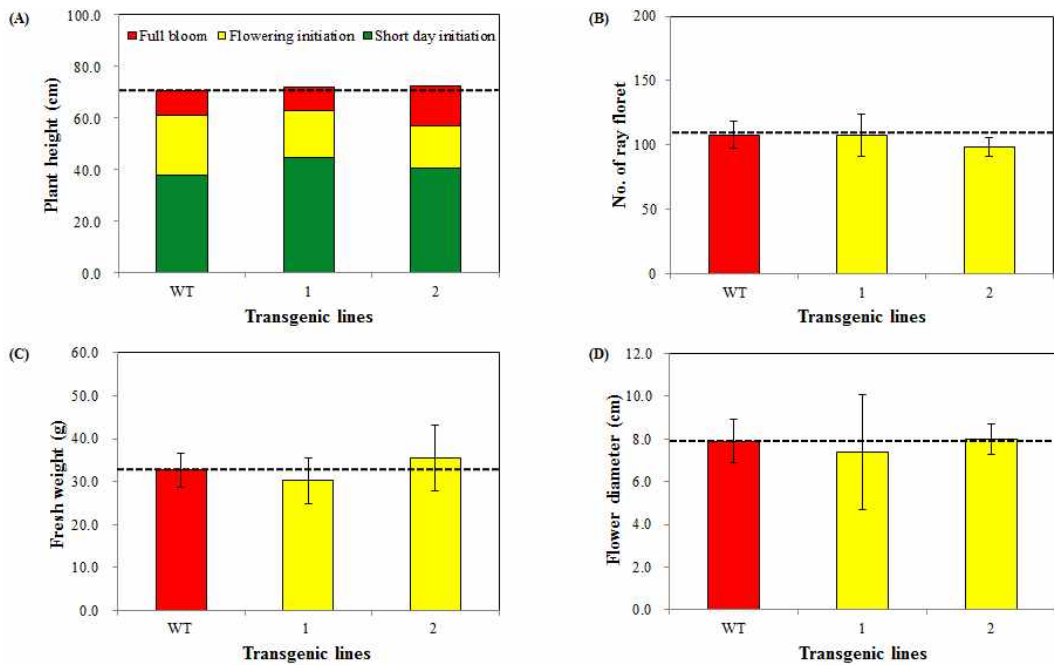


그림 88. *ATPG3* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 설상화수, (C) 지상부 생체중, (D) 화경



그림 89. *ATPG3* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 만개기 꽃의 모습

(3) *ATPG3* 형질전환체의 이차 기능 분석

(가) 생리 특성 검정 : 수명연장 유전자 도입 *ATPG3* 형질전환 계통의 수명연장 특성을 검정하

기 위해 온실에서 재배된 *ATPG3* 도입 국화 형질전환체가 개화하였을 때 꽃을 포함한 줄기 30cm 부분을 비스듬하게 절단하여 증류수가 채워진 시험관에 삽화하여 꽃 냉장고에 저장하면서 1주 간격으로 절화 수명과 엽록소 함량 변화를 관찰하였다. 저장된 절화는 온도 12℃, 습도 70%, 광도 $22\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 하에서 12시간 광주기 조건의 꽃 냉장고에 저장하였다. 대조구의 꽃과 잎 절화 수명은 22-23일이었고, 1번 형질전환 계통은 절화의 꽃 수명이 28일로 나타나 대조구에 비해 5일 이상 꽃의 수명이 연장되었지만, 절화 잎의 수명은 대조구와 차이가 없었다. 반면에 2번 형질전환 계통의 경우 절화의 꽃 수명은 대조구와 차이를 나타내지 않았지만 절화 잎의 수명은 32일로 대조구에 비해 일주일 이상 절화수명이 연장된 것으로 나타났다(그림 90A).

형질전환체 절화의 잎 노화 정도를 검정하기 위해 꽃 냉장고에 저장된 절화를 총 4주간 일주일 간격으로 엽록소 간이 측정기(SPAD-502, Minolta)를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 측정위치는 증류수가 채워진 시험관에서부터 3장의 잎을 선택하여 잎의 주맥을 중심으로 엽맥이 포함되지 않도록 좌, 우 부분을 측정하였다. 대조구의 경우 절화 저장 2주차 이후부터 엽록소 함량이 급격히 감소하기 시작하였으며, 절화 채취 초기로부터 4주차까지의 엽록소 함량 감소율이 34.8%로 나타났다. 형질전환 계통 중 절화 잎의 수명이 지연된 2번 형질전환 계통의 경우 4주간의 엽록소 함량 감소율은 24.4%로 대조구보다 적은 감소를 보여주었으며, 이로 보아 *ATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 계통은 대조구보다 엽록소가 오래 유지된다는 것을 확인할 수 있었다(그림 90B)

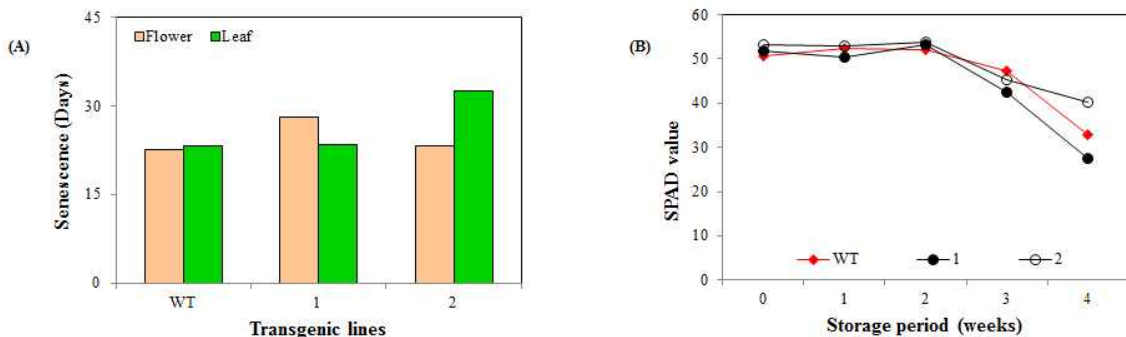


그림 90. *ATPG3* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 생리 검정. (A) 절화 수명, (B) 절화 잎의 SPAD value

ATPG3 유전자 과발현 애기장대와 다르게 국화 형질전환 계통의 경우 생산성 증대 효과는 보이지 않았지만 수명연장 효과를 나타내는 계통을 얻을 수 있었다. 애기장대처럼 생산성 증대 및 수명연장 효과를 갖는 우량 형질전환 계통을 개발하기 위해서는 추가적인 형질전환 실험을 통하여 다수의 형질전환 계통을 생산한 후, 기능검정을 수행해야 할 것으로 생각된다.

다. *ATPG4* 유전자 도입 국화 형질전환체 : 고생장성 농업형질 발현

(1) *ATPG4* 형질전환체의 유전자 발현 및 발현 분석

(가) PCR과 RT-PCR 검정 : *ATPG4* 유전자 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체를 확보하기 위해 형질 전환을 실시하였다. 선발 및 재생 과정을 통하여 선발배지에서 신장 및 발근이 성공적으로 이루어진 형질전환 식물체 4 계통을 확보하였다. 이 계통을 대상으로 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 목적 유전자 *ATPG4*와 선발마커유전자 *bar*에 대한 PCR을 실시하였다.

ATPG4 도입 4개 형질전환 계통의 PCR 결과, 목적 유전자 *ATPG3*와 선발마커 유전자인 *bar* 에서 각각 920bp, 314bp에 해당되는 band가 나타났다. PCR을 통해 유전자 도입 여부가 확인된 *ATPG4* 형질전환 계통의 유전자 발현량을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 형질전환 식물체 4계통 모두 유전자 발현이 확인되었으며, 계통간의 차이는 나타나지 않았다(그림 91).

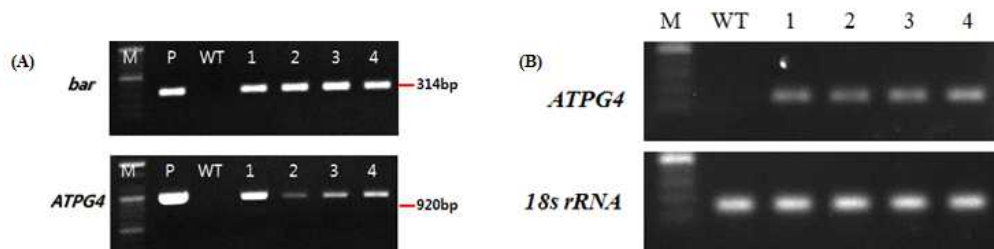


그림 91. *ATPG4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 (A) PCR과 (B) RT-PCR을 통한 유전자 도입 및 발현 검정

(2) *ATPG4* 형질전환체의 일차 표현형 분석

(가) 온실 재배를 통한 성장 및 개화특성 검정 : PCR과 RT-PCR을 통해 유전자의 도입 및 발현이 확인된 *ATPG4* 유전자 도입 국화 형질전환 식물체 4계통을 온실에서 재배하여 개화를 유도한 후 표현형 검정을 실시하였다(그림 92).

초장의 경우 형질전환 계통이 대조구에 비해 7.0-24.2% 증가하였으며 초장이 24.2%로 가장 많이 증가한 4번 형질전환 계통은 대조구에 비해 설상화 수가 27.5%, 생체중이 36.6% 증가하여 생산성 증대 효과가 나타났다(그림 93, 94).

ATPG4 도입 국화 형질전환 계통은 계통간의 차이는 나타났으나, 초장과 생체중이 증가된 형질전환 계통(4번)을 확보할 수 있었다. 이 선발 계통은 애기장대에서 확인된 바와 같은 유사한 표현형을 나타내었으며, 고성장성 농업 형질을 가진 우량 형질전환 계통으로 판단된다.



WT 1 2 3 4

그림 92. *ATPG4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 표현형

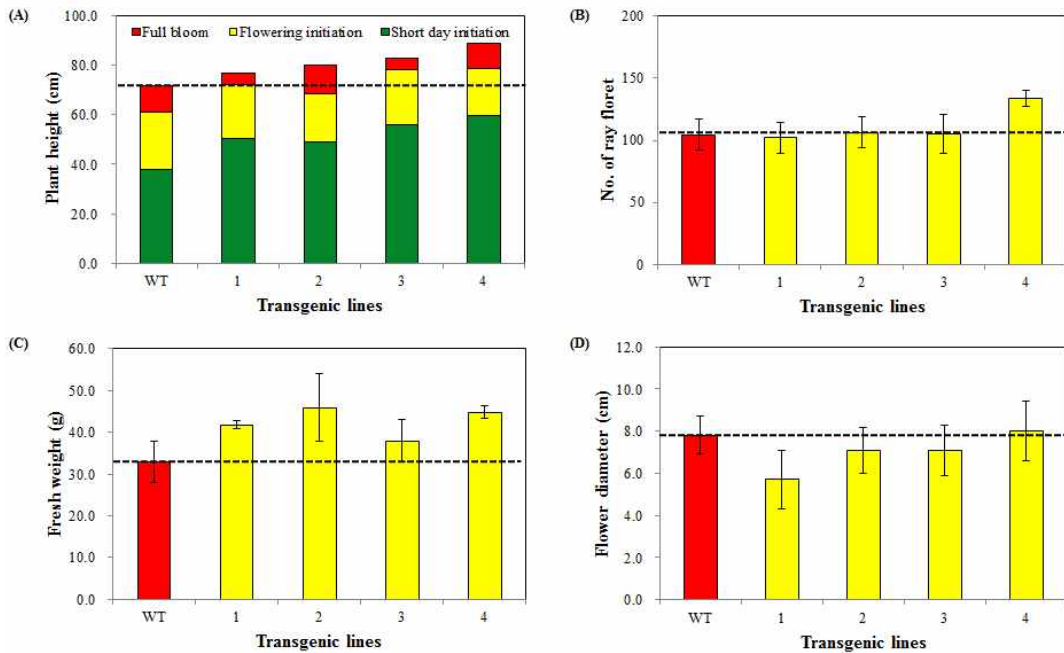


그림 93. *ATPG4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 설상화수, (C) 지상부 생체중, (D) 화경



그림 94. *ATPG4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 만개기 꽃의 모습

(3) *ATPG4* 형질전환체의 이차 기능 분석

(가) 생리 특성 검정 : *ATPG4* 유전자의 목표형질 중 하나인 노화 지연 특성을 검정하기 위해

온실에서 재배된 *ATPG4* 도입 국화 형질전환체를 개화시기에 줄기 30cm 부분을 비스듬하게 절단한 후 증류수가 채워진 시험관에 삽화하고 절화 수명과 엽록소 함량 변화를 관찰하기 위해 꽃 냉장고에 저장하였다. 절화의 저장은 온도 12°C, 습도 70%, 광도 22 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 하에서 12시간 광 처리 조건의 꽃 냉장고에서 실시하였다. 대조구의 꽃과 잎의 절화 수명은 22-23일 유지되었고 형질전환 계통은 계통간의 차이가 나타났다. 생산성 증대 효과가 나타난 4번 형질전환 계통은 절화 꽃의 수명은 대조구와 차이를 나타내지 않았지만 절화 잎의 경우 대조구에 비해 절화 수명이 다소 연장된 것으로 나타났다(그림 95A).

절화의 잎 노화를 검정하기 위해 꽃냉장고에 저장된 절화를 총 4주간 일주일 간격으로 엽록소 간이 측정기(SPAD-502, Minolta)를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 측정위치는 증류수가 채워진 시험관에서부터 3장의 잎을 선택하여 잎의 주맥을 중심으로 엽맥이 포함되지 않도록 좌, 우 부분을 측정하였다. 대조구의 경우 절화 저장 2주 후부터 엽록소 함량이 현저히 감소하였으며 3번 형질전환 계통을 제외한 나머지 형질전환 계통은 3주 후부터 엽록소 함량이 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 절화 잎의 노화가 가장 많이 지연된 4번 형질전환 계통의 경우 엽록소 함량이 대조구와 다소의 차이를 나타내었으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다(그림 95B).

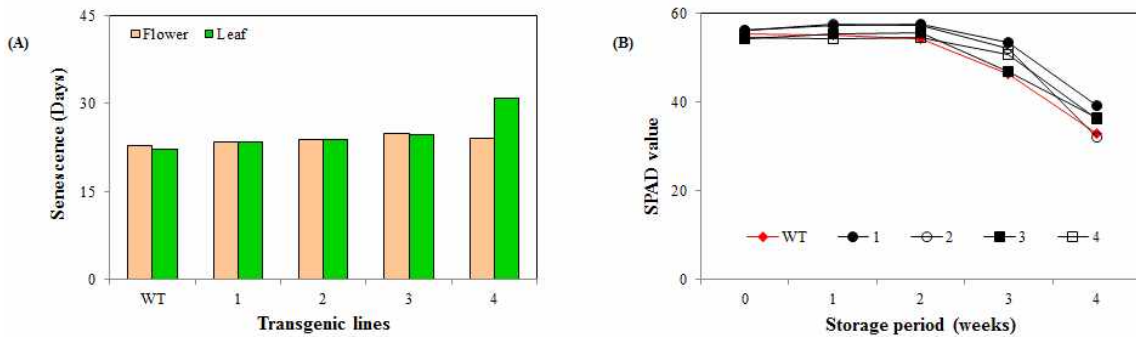


그림 95. *ATPG4* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 생리 검정. (A) 절화 수명, (B) 절화 잎의 SPAD value

이를 통해 *ATPG4* 도입 애기장대와 유사한 표현형을 나타내는 국화 4번 형질전환 계통은 생산성 증대에 효과가 있는 것으로 나타나 우량 형질전환체로서의 가치가 높을 것으로 판단된다.

라. *ATPG7* 유전자 도입 국화 형질전환체 : 고생장성 및 수명연장 농업형질 발현

(1) *ATPG7* 형질전환체의 유전자 및 발현 분석

(가) PCR과 RT-PCR 검정 : 국화 스탠다드 품종 ‘신마’를 공시 재료로 사용하여 *ATPG7* 유전자 도입 국화 형질전환을 실시하였다. 형질전환을 통해 재생된 신초 중 항생제가 포함된 신장배지에서 발근 및 신장이 성공적으로 이루어진 식물체 7계통을 확보하였다. 이 계통을 대상으로 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 목적 유전자 *ATPG7*과 선발마커 유전자 *bar*에 대한 PCR을 실시하였다.

ATPG7 유전자 도입 형질전환 식물체 7계통의 PCR 분석을 실시한 결과, 목적 유전자 *ATPG7*과 선발마커유전자 *bar*에서 각각 957bp와 314bp에 해당되는 band가 나타나 유전자가 안정적으로 도입되어 있음을 확인할 수 있었다. PCR을 통해 유전자 도입 여부가 확인된 7개 형질전환 계통의 유전자 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. *ATPG7* 유전자 도입 형질전환 계통간의 유전자 발현량 차이는 다양하게 나타났으며 그 중 5, 7번 형질전환 계통에서 유전자의 발현량이 다른 계통에 비해 높게 나타났다(그림 96).

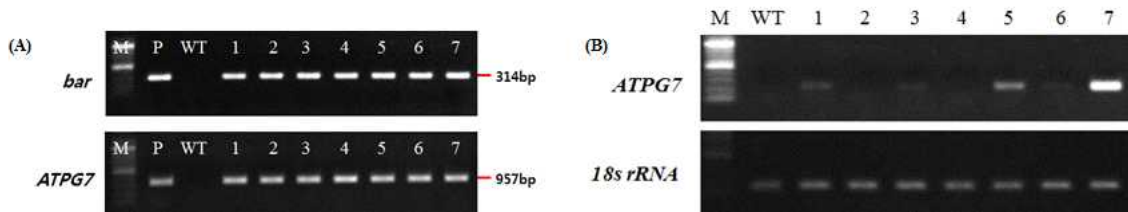


그림 96. *ATPG7* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 (A) PCR과 (B) RT-PCR을 통한 유전자 도입 및 발현 검정

(2) *ATPG7* 형질전환체의 일차 표현형 분석

(가) 온실 재배를 통한 성장 및 개화특성 검정 : PCR과 RT-PCR을 통해 유전자의 도입 및 발현이 확인된 *ATPG7* 유전자 도입 국화 형질전환 식물체 7계통의 표현형적 특성을 알아보기 위해 대조구와 함께 온실에서 재배를 실시하였다(그림 97).

ATPG7 도입 국화 형질전환 식물체 7계통의 초장의 경우 계통간의 차이가 다양하게 나타났다. 대조구에 비해 초장이 15.8%, 29.6%로 증가한 5, 7번 형질전환체의 경우 설상화 수는 20.8%, 18.5%, 생체중은 50.0%, 58.3% 그리고 화경이 21.8%, 16.7%로 증가하여 모든 표현형에서 생산성 증대 효과가 인정되었다(그림 98, 99).

ATPG7 유전자가 도입된 애기장대와 유사한 표현형을 갖는 5, 7번 국화 형질전환 계통은 생산성 증대에 대한 효과가 나타나 고성장성 농업 형질을 가진 우량 형질전환 계통으로 육성할 가치가 있다고 판단된다.



그림 97. *ATPG7* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 표현형

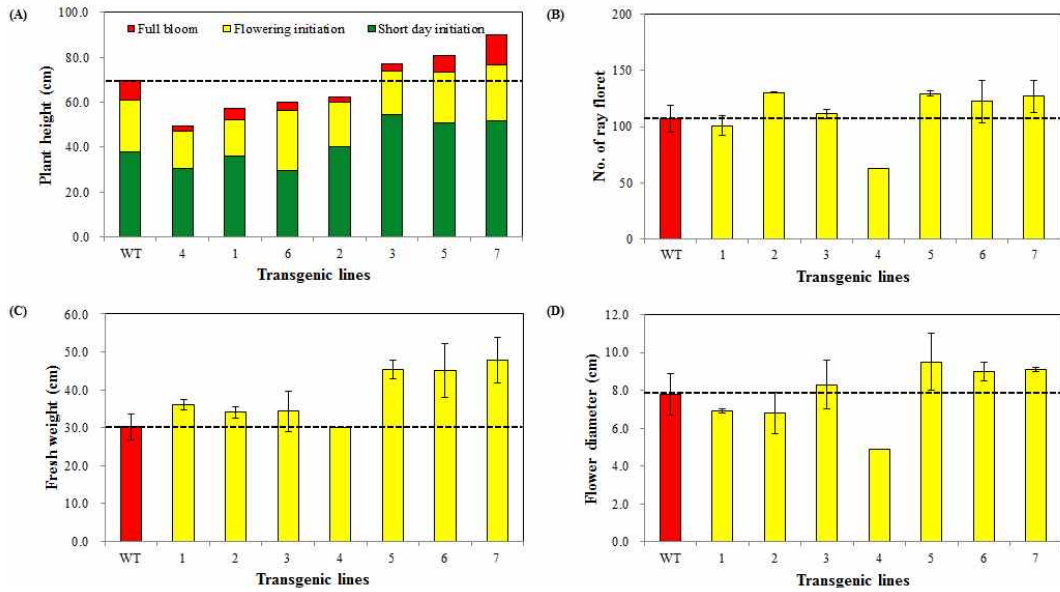


그림 98. *ATPG7* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 설상화수, (C) 지상부 생체중, (D) 화경



그림 99. *ATPG7* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 만개기 꽃의 모습

(3) *ATPG7* 형질전환체의 이차 기능 분석

(가) 생리 특성 검정 : *ATPG7* 유전자의 목표형질 중 하나인 노화 지연 특성을 검정하기 위해 온실에서 재배된 *ATPG7* 도입 국화 형질전환체를 개화시기에 줄기 30cm 부분을 비스듬하게 절단한 후 증류수가 채워진 시험관에 삽화하고 절화 수명과 엽록소 함량 변화를 관찰하기 위해 꽃 냉장고에 저장하였다. 절화의 저장은 온도 12℃, 습도 70%, 광도 $22\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 하에서 12시간 광 처리 조건의 꽃 냉장고에서 실시하였다. 대조구에서 꽃과 잎의 절화 수명은 22-23일 유지되었다. *ATPG7* 유전자 도입 형질전환 계통 5번은 절화 꽃과 잎의 수명이 29-30일로 대조구에 비해 절화 수명이 상당히 연장되었다. 형질전환 계통 2번과 3번에서는 절화의 꽃과 잎의 수명이 다소 연장되었으나 대조구와의 차이가 크게 나타나지는 않았다(그림 100A).

절화의 잎 노화를 검정하기 위해 꽃 냉장고에 저장된 절화를 총 4주간 일주일 간격으로 엽록

소 간이 측정기(SPAD-502, Minolta)를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 측정위치는 증류수가 채워진 시험관에서부터 3장의 잎을 선택하여 잎의 주맥을 중심으로 엽맥이 포함되지 않도록 좌, 우 부분을 측정하였다. 대조구의 경우 엽록소 측정 2주차 이후부터 엽록소 함량이 급격히 감소하였고 절화 채취초기로부터 4주차까지의 엽록소 함량 감소율이 39.3%로 나타났다. 절화 잎 노화지연에 효과가 나타난 5번 형질전환 계통은 4주차의 엽록소 함량 감소율이 18.6%로 대조구 보다 확연히 낮은 감소율이 나타나 노화지연 효과가 인정되었다(그림 100B).

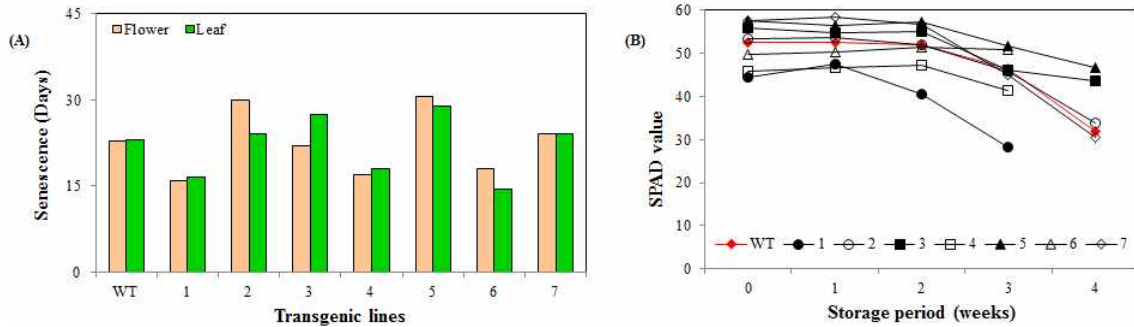


그림 100. *ATPG7* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 생리 검정. (A) 절화 수명, (B) 절화 잎의 SPAD value

이를 통해 *ATPG7* 도입 애기장대와 유사한 표현형을 나타내는 국화 형질전환 계통(5번)은 생산성 증대 및 수명연장 효과가 있는 것으로 나타나 우량 국화 형질전환체로서의 가치가 높을 것으로 판단된다.

마. *ATPG8* 유전자 도입 국화 형질전환체 : 고생장성 및 수명연장 농업형질 발현

(1) *ATPG8* 형질전환체의 유전자 및 발현 분석

(가) PCR과 RT-PCR 검정 : *ATPG8* 도입 국화 형질전환체를 확보하기 위해 형질전환을 실시하였다. 선발 및 재생 과정을 통하여 선발배지에서 신장 및 발근이 성공적으로 이루어진 형질전환 식물체 4계통을 확보하였다. 이 계통을 대상으로 유전자 도입여부를 확인하기 위해 목적 유전자 *ATPG8*과 선발마커유전자 *bar*에 대한 PCR을 실시하였다.

형질전환을 통해 재생된 4계통의 형질전환 식물체는 PCR을 통하여 목적 유전자 *ATPG8*과 선발마커유전자 *bar*에서 각 770bp와 314bp에 해당되는 band를 확인하였다. PCR을 통해 유전자 도입이 확인된 *ATPG8* 도입 형질전환식물체 4계통의 도입유전자 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 4개 형질전환 계통 모두에서 목적 유전자의 발현이 확인되었고, 특히 2, 3번 형질전환 계통이 다른 계통에 비해 유전자 발현양이 높은 것으로 나타났다(그림 101).

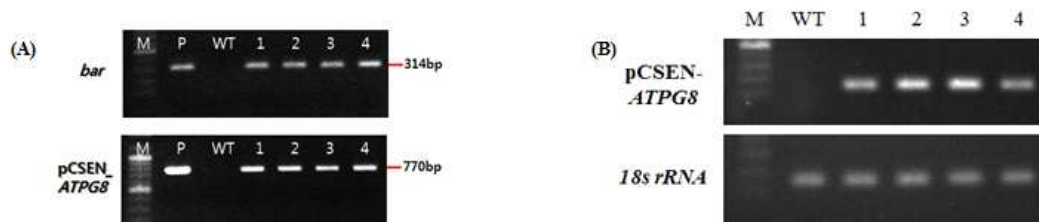


그림 101. *ATPG8* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 (A) PCR과 (B) RT-PCR을 통한 유전자 도입 및 발현 검정

(2) *ATPG8* 형질전환체의 일차 표현형 분석

(가) 온실 재배를 통한 성장 및 개화특성 검정 : PCR과 RT-PCR을 통해 유전자 도입 및 발현이 확인된 수명연장 및 생산성 증대 *ATPG8* 유전자 도입 국화 형질전환식물체 4계통을 온실에서 재배하여 표현형 검정을 실시하였다(그림 102).

ATPG8 유전자가 도입된 2, 3번 형질전환 계통은 생체중이 대조구 대비 10.1%, 31.3% 증가하였으나 다른 표현형에서는 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았다. 반면에 1, 4번 형질전환 계통은 대조구에 비해 초장은 49.9%, 33.6% 감소하였고 생체중은 47.8%, 44.6% 감소하였으나, 설상화의 수와 화경은 큰 차이를 나타내지 않았다(그림 103, 104).

ATPG8 유전자 도입 애기장대의 경우 생체중 증대 효과가 나타났으며, 개발된 국화 형질전환 계통에서도 생체중의 증가와 같은 생산성 증대 효과가 인정되었다.



WT 1 2 3 4

그림 102. *ATPG8* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 표현형

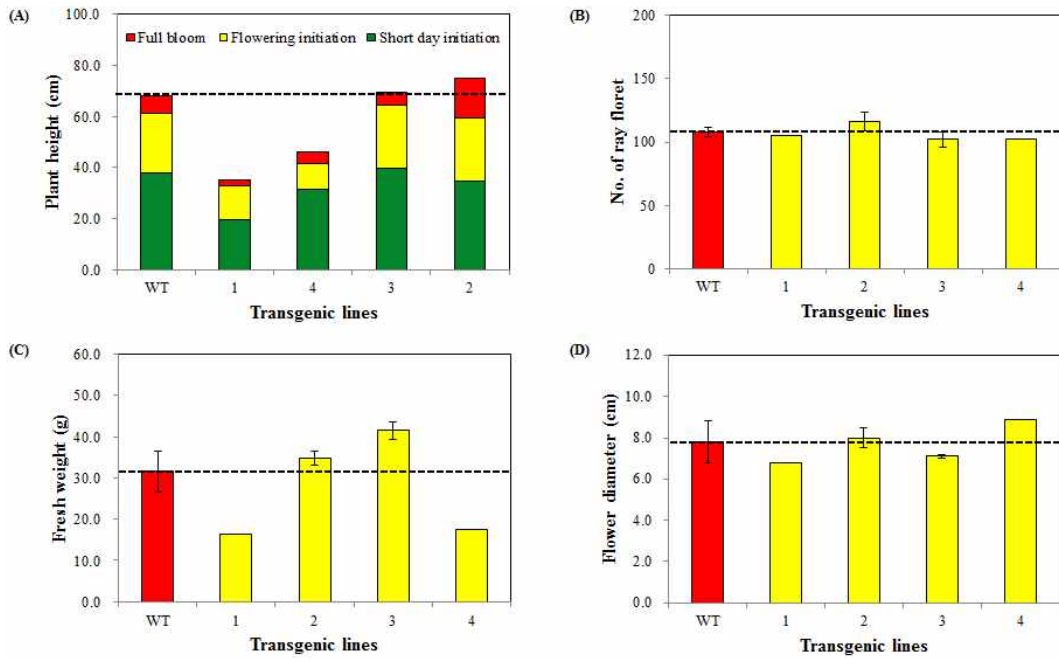


그림 103. *ATPG8* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 설상화수, (C) 생체중, (D) 화경



그림 104. *ATPG8* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 만개기 꽃의 모습

(3) *ATPG8* 형질전환체의 이차 기능 분석

(가) 생리 특성 검정 : 수명연장 유전자 도입 *ATPG8* 형질전환 계통의 수명연장 특성을 검정하기 위해 온실에서 재배된 *ATPG8* 도입 국화 형질전환체를 개화시기에 줄기 30cm 부분을 비스듬하게 절단한 후 증류수가 채워진 시험관에 삽화하고 절화 수명과 엽록소 함량 변화를 관찰하기 위해 꽃 냉장고에 저장하였다. 절화의 저장은 온도 12℃, 습도 70%, 광도 $22\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 하에서 12시간 광 처리 조건의 꽃 냉장고에서 실시하였다. 대조구의 꽃과 잎의 절화 수명은 22-23일 동안 유지되었고 초장이 감소한 1, 4번 형질전환 계통은 절화 잎의 수명은 대조구에 비해 연장되지 않았지만 절화 꽃의 수명은 대조구에 비해 5일과 17일 연장되는 효과를 얻을 수 있었다. 반대로 초장은 대조구와 차이가 없으나 생체중이 증가한 2, 3번 형질전환 계통은 절화 꽃의 수명은 대조구에 비해 감소하였지만 절화 잎의 수명은 대조구에 비해 5일과 8일 연장되었다(그림 105A).

절화의 잎 노화를 검정하기 위해 꽃 냉장고에 저장된 절화를 총 4주간 일주일 간격으로 엽록소 간이 측정기(SPAD-502, Minolta)를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 측정위치는 증류수

가 채워진 시험관에서부터 3장의 잎을 선택하여 잎의 주맥을 중심으로 엽맥이 포함되지 않도록 좌, 우 부분을 측정하였다. 2, 3번 계통은 절화 채취 시기에 대조구에 비해 11.8%, 15.4% 높은 엽록소 함량이 측정되었으며, 4주간의 저장시 엽록소 함량 감소율이 대조구에서는 32.5%인 반면 2번 형질전환 계통은 17.2%로 낮은 감소율을 보여주었다. 이와 같이 대조구에 비해 절화 잎의 수명이 연장된 2, 3번 형질전환 계통은 절화 채취 시기부터 저장 4주차에 이르기까지 대조구에 비해 높은 엽록소 함량을 지속적으로 유지하였음을 알 수 있었다(그림 105B).

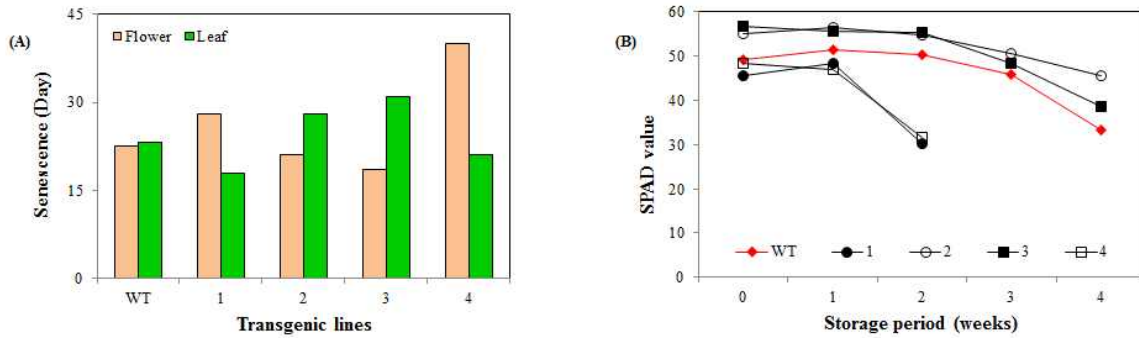


그림 105. *ATPG8* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 생리 검정. (A) 절화 수명, (B) 절화 잎의 SPAD value

ATPG8 도입 애기장대의 경우 생산성 증대 및 수명연장의 효과가 나타났는데, 개발된 *ATPG8* 도입 국화 형질전환체에서도 생산성 증대와 수명연장 효과가 모두 인정되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)	
1차 연도 (2011)	식물 수명연장 유전자 발굴	· 기확보 수명연장 유전자의 기능 재검 정 (4종)	· 기확보 수명연장 유전자의 기능 재검 정 (4종): <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> , <i>ATHG1</i> <i>AtGA2ox4</i>	100	
		· 기능성 유전체 연구를 통한 변이체군 으로부터 수명연장 표현형질 변이체 선별 · 변이체로부터 신규 유전자 발굴 및 기능검정 (1종)	· 기능성 유전체 연구를 통한 변이체군 으로부터 수명연장 표현형질 변이체 선별 · 변이체로부터 신규 유전자 2종 발굴 및 기능 검정: <i>ATPG7</i> , <i>ATPG10</i>	200	
		· 기확보 수명연장 유전자의 국화 형질 전환용 vector 제작	· 기확보 수명연장 유전자 4종의 국화 형질전환용 vector 제작: <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> , <i>AtGA2ox4</i> , <i>ATHG1</i>	100	
	식물 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체 육성	· 국내 육성된 국화 우량 품종의 선발	· 국내 육성 국화 스탠다드 우량 품종 '백마'의 재생시스템 확립	100	
		· 국화 우량 품종의 <i>Agrobacterium</i> 매개 형질전환 기술 최적화	· 국화 스탠다드 우량 품종 '신마'의 선발마커 <i>bar</i> 를 이용한 효율적인 형 질전환 시스템 확립	100	
		· 보고 유전자 도입 국화 형질전환 및 형질전환체 생산 · 보고 유전자 도입 국화 형질전환 계 통의 발현 분석	· 보고유전자 <i>GFP</i> 도입 국화 형질전환 체 생산 · 형광현미경을 통한 형질전환 계통의 <i>GFP</i> 발현 검정	100	
		· 기확보 수명연장 유전자 (4종) 도입 국화 형질전환 및 기능 분석	· 형질전환 국화 식물체의 선발을 위한 적정 PPT 농도 검정 · 기확보 수명연장 유전자 도입 형질전 환체 생산 (<i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> , <i>ATHG1</i> <i>AtGA2ox4</i>) · PCR을 이용한 수명연장 유전자 도입 검정	110	
	2차 연도 (2012)	식물 수명연장 유전자 발굴	· 기능성 유전체 연구를 통한 변이체군 으로부터 수명연장 표현형질 변이체 선별 · 변이체로부터 신규 유전자 발굴 및 기능검정 (2종)	· 기능성 유전체 연구를 통한 변이체군 으로부터 수명연장 표현형질 변이체 선별 · 변이체로부터 신규 유전자 4종 발굴 및 기능 검정: <i>ATPG3</i> , <i>ATPG6</i>	100
			· 유용 1, 2 유전자의 국화 형질전환용 vector 제작	· 유용 유전자 4종 국화 형질전환용 vector 제작: <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i>	200

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
2차 년도 (2012)	식물 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체 육성	· 유용 1, 2 유전자 도입 국화 형질전환 (2종) · 기확보 유전자 도입 국화 형질전환체 선별 및 생산 (4건)	· 유용 유전자 4종 (<i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i>) 도입 국화 형질전환체 선별 및 생산 · 기확보 유전자 4종 도입 국화 형질전환체 선별 및 생산	150
		· 형질전환 국화의 기능 분석 (1차 표현형 분석)	· 기확보 유전자 4종 도입 국화 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석 · 유용 유전자 4종 도입 국화 형질전환체의 유전자 도입 분석 · 기확보 유전자 도입 국화 형질전환체의 1차 표현형 분석 및 2차 기능분석 (생리학적 분석)	150
최종 평가 (3차 년도, 2013)	식물 수명연장 유전자 발굴	· 기확보 수명연장 유전자의 기능 재검정 (4종)	· 기확보 수명연장 유전자의 기능 재검정 (4종): <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> , <i>ATHG1</i> , <i>AtGA2ox4</i>	100
		· 기능성 유전체 연구를 통한 변이체군으로부터 수명연장 표현형질 변이체 선별 · 변이체로부터 신규 유용 유전자 발굴 및 기능검정 (3종)	· 기능성 유전체 연구를 통한 변이체군으로부터 수명연장 표현형질 변이체 선별 · 변이체로부터 신규 유전자 4종 발굴 및 기능 검정: <i>ATPG3</i> , <i>ATPG6</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG10</i>	130
		· 기확보 및 유용 유전자의 국화 형질전환용 vector 제작 (7종)	· 기확보 수명연장 유전자 4종 및 유용 유전자 4종의 국화 형질전환용 vector 제작 완료: <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> , <i>AtGA2ox4</i> , <i>ATHG1</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i>	110
	식물 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체 육성	· 국내 육성된 국화 우량 품종의 선발	· 국내 육성 국화 스탠다드 우량 품종 ‘백마’의 재생시스템 확립	100
· 국화 우량 품종의 <i>Agrobacterium</i> 매개 형질전환 기술 최적화		· 국화 스탠다드 우량 품종 ‘신마’의 선발마커 <i>bar</i> 를 이용한 효율적인 형질전환 시스템 확립	100	
· 보고 유전자 도입 국화 형질전환 및 형질전환체 생산 · 보고 유전자 도입 국화 형질전환 계통의 발현 분석		· 보고유전자 <i>GFP</i> 도입 국화 형질전환체 생산 · 형광현미경을 통한 형질전환 계통의 <i>GFP</i> 발현 검정	100	

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
최종 평가 (3차 연도, 2013)	식물 수명연장 유전자 도입 국화 형질전환체 육성	<ul style="list-style-type: none"> · 유용 유전자 도입 국화 형질전환체 선별 및 생산 (3건) · 기확보 유전자 도입 국화 형질전환체 선별 및 생산 (4건) 	<ul style="list-style-type: none"> · 유용 유전자 4종 (<i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>) 도입 국화 형질전환체 선별 및 생산 · 기확보 유전자 4종 도입 국화 형질전환체 선별 및 생산 	110
		<ul style="list-style-type: none"> · 생산된 국화 형질전환체의 기능 분석 (4건 이상) · 우량 형질전환체 개발 (1종 이상) 	<ul style="list-style-type: none"> · 기확보 3종 및 유용 4종 유전자 도입 국화 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석 (PCR, qPCR, Southern blot, RT-PCR 등) · 기확보 3종 및 유용 4종 유전자 도입 국화 형질전환체에 대한 일차 표현형 분석 · 기확보 3종 및 유용 4종 유전자 도입 국화 형질전환체 이차 기능 분석 · 기확보 3종 및 유용 4종 유전자 도입 국화 형질전환체 온실 검정 · 우량 국화 형질전환체 개발 (최종 5종 : <i>ORE15</i>, <i>AtGA2ox4</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i> and <i>ATPG8</i>) 및 우량계통 이벤티화 진행 (4건 : <i>ORE15</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>) 	200
	지적소유권 확보 (6건)	<ul style="list-style-type: none"> · 특허 출원 혹은 등록: 3건 · 논문: 3건 (SCI 학술지 2건, 기타 1건) 	<ul style="list-style-type: none"> · 국내외 특허 출원: 6건 · 논문: 3건 (SCI 학술지 2건, 기타 1건 게재 예정) 	100

제 2 절. 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 결과의 활용방안 및 기대성과

[기술적 측면]

본 연구는 식물의 수명연장, 절화 식물의 수명연장을 위한 노화 조절 관련 유용 유전자를 발굴하고 이를 화훼산업의 경제적 가치가 높은 국화에 적용함으로써, 식물의 수명이 연장된 고부가가치의 국화 신품종을 개발할 수 있으며 이를 바탕으로 다양한 유전자를 도입한 신품종 개발이 가능할 것으로 보인다. 이렇게 개발된 국화 신품종은 수명연장 관련 유용 유전자의 잠재 가치를 보다 높여 이에 대한 지적 소유권의 잠재 시장성이 높아질 것으로 판단되며, 향후 국가별 생명공학 산업화의 경쟁력을 가지는데 기여할 수 있을 것이다. 형질전환 기술을 바탕으로 개발된 신품종은 교배 모본으로 활용이 가능하므로 교배를 통한 다양한 신품종 개발에 사용될 수 있을 것이다. 또한 형질전환 기술을 이용한 화훼류 신품종 개발은 다른 화훼작물의 신품종 개발에 대한 초석이 될 것이며, 식물의 노화 조절기작에 대한 분자적 해명의 전기를 만들 수 있을 것이다.

[경제·산업적 측면]

최근 20년간의 형질전환 기술에 있어서 유전자 재조합 및 형질전환 식물체 개발에 대한 특허출원 현황을 조사해보면, 우리나라는 미국의 약 10%에도 미치지 못하는 실정이다. 또한 화훼류에 적용 가능한 유전자가 다수 개발되었음에도 새로운 형질의 신품종 상업화는 매우 더디게 진행되는 것을 알 수 있다. 따라서 본 과제의 기 확보된 식물 수명연장 관련 유용 유전자와 국화 형질전환체 개발 기술을 바탕으로 국내의 생명공학기술과 전통육종 기술을 연계하여 연구를 수행한다면 조기에 세계적 수준의 화훼 신품종을 개발할 수 있을 것으로 사료된다. 이는 연간 32.4억 (2003~2007년 통계, 농진청 국정감사자료)에 이르는 국화의 로열티 지급액을 줄여 농가소득 증대는 물론 국외 수출을 통한 로열티 수입 또한 기대된다.

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 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표									
	달성	1								
2차년도	목표	1						1		
	달성	3								
3차년도	목표	2					2			
	달성	2					2 (투고예정)	1 (투고예정)		
계	목표	3					2	1		
	달성	6								

2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
투고예정	국화 ‘백마’의 잎 절편으로부터 신초 기관형성을 통한 식물체 재생 체계 확립	김지현	형남인	김윤아 유민영	농업생명 과학연구	-	국내	-
투고예정	Plant growth enhanced in <i>ORE15</i> transgenic chrysanthemum	김지현	형남인	유민영	Plant Cell Tissue & Organ Culture	-	국외	○
투고예정	Characterization of transgenic chrysanthemum harboring <i>AtGA2ox4</i> gene	김지현	형남인	유민영	In Vitro - Plant	-	국외	○

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	10-2011-0038929					
2012년 2월	식물의 ^{b)}	제노마인(주)	대한민국	10-2012-0016951					
2012년 4월	식물의 ^{c)}	제노마인(주)	대한민국	10-2012-0039093					
2012년 4월	ATPG7 ^{d)}	제노마인(주)	국제(PCT)	PCT/KR2012/002966					
2013년 6월	식물의 ^{e)}	제노마인(주)	대한민국	10-2013-0075018					
2013년 6월	식물의 ^{f)}	제노마인(주)	대한민국	10-2013-0075022					

^{a)}식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{b)}식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{c)}식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{d)}ATPG7 Protein Providing Yield Increase and Delaying Senescence and Stress Tolerance of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use

^{e)}식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG6 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

^{f)}식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG10 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

4. 학술대회 발표

5. 인력활용/양성 성과

[인력지원 성과]

지원 총인원	지원 대상 (학위별)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
16	9	4	2	1	-	16	-	-	16

제 2 절. 성과활용 계획

1. 연구성과 활용목표

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1					
	달성						

2. 연구성과 활용계획

식물 형질전환 시장은 고도의 기술과 특허로 인한 지적소유권에 대한 독점으로 고부가의 산업적 가치를 지니고 있으며, 국내에서는 2010년을 전후로 형질전환 작물의 품종화 내지는 상업화가 가능하다고 추정되므로 유용 유전자를 통한 우량 형질전환체의 개발은 미래 농업 생명공학에 있어 고부가 창출과 국가 경쟁력을 제공할 것이다.

본 과제의 목표는 수명연장 관련 유용 유전자 삽입이 가능한 국화 형질전환 기법을 적용하여 고품질, 그리고 고생장성 우량 신품종 개발에 있으며, 세부적 산업화 방안으로는 수명연장/생산성 증대의 표현형적 특징을 가지는 유용 유전자와 이를 통한 고품질, 그리고 고생장성 우량 국화 형질전환체를 개발하여 우량 신품종에 대한 지적소유권을 확보하는 것이다.

이러한 연구 산물의 산업화는 2 가지 산업화 방안으로 진행될 것이다. 첫 번째는 단기 전략으로 유전자 및 형질전환체에 대한 지적소유권의 기술이전이다. 기술이전 대상은 국내 종자 회사 등이 우선될 것이며, 이 후 국외로 BASF, Monsanto, Syngenta 등이 될 것이다. 주관기관인 제노마인(주)는 다국적 기업과 유용 유전자에 대한 기술이전을 실시하여 유전자 기술사업화에 대한 노하우를 가지고 있는 상태이다. 이러한 기술사업화에 대한 선례는 본 사업에서 확보하는 우량 형질의 유전자 혹은 형질전환체에 대한 기술이전의 가능성을 보다 높여줄 것으로 판단된다.

산업화 방안의 두 번째는 확보한 유용 유전자 및 형질전환체에 대한 공동 사업화를 통해서 우량 형질전환체를 자체 사업화 하는 것이다. 대상은 화훼 육종 전문 국내 기관, 연구소 혹은 기업이 될 것이며, 형태는 개발한 우량 형질전환체에 대하여 대상 기관과의 공동연구를 통한 우량 신품종 개발과 이를 통한 산업화이다. 이러한 산업화 방안은 보다 장기간의 연구 기간을 요하지만 최종적으로 산업화가 가능한 우량 품종 개발을 통한 산업화라는 점에서 보다 고부가 가치 창출이 가능하고, 국내 품종 적용이란 측면에서 개발된 신품종은 국내 재배는 물론 수출에 적극 활용함으로써 농가의 소득 증대에 기여할 것이다.

고품질, 그리고 고생장성 우량 국화 품종의 사업화에 있어서 사업 타당성 분석 결과 고부가 가치 창출이 가능하며, 국가의 농업생명공학의 경쟁력을 제공한다는 점에서 매우 매력적인 사업이 될 것이다. 사업 타당성 분석은 다음과 같다.

① 고품질 농업형질을 가진 국화 형질전환체에 대한 사업 타당성 분석

고품질 & 고생산성 농업형질을 가진 국화 형질전환체에 대한 사업화 타당성 (I)

국화 스탠다드 신종 개발 로열티 수입

전세계 국화 스탠다드 품종 시장 : 1,525백만본, 7,730백만\$
 일본 985백만본, 573백만\$, 0.6\$/본 (60엔/본) Source: MAFF (Japan), 2009
 한국 240백만본, 100백만\$, 0.4\$/본 (433원/본) Source: MAFRA (Korea), 2011
 기타(중국, 대만 등) 300백만본, 100백만\$ (추정) Source: Kim (2011)

국화의 국내 로열티
 본당 15-33원(평균 20원) = 0.02\$ Source: Economy Chosun (Korea), 2010

로열티 대상 본수 150백만본일 경우(전세계 시장의 약10%)
 년 로열티: 0.02\$ X 150백만본 X year = 3백만\$/year
 총 로열티: 3백만\$ X 20 = 60백만\$ (품종 로열티 20년 기준)

개발된 형질전환 신종 국화가 전세계 시장의 약 10% 확보
 20년간 매년 3백만\$, 20년간 총 60백만\$ 로열티 확보

GENOMINE 010-2600-0101

② 고품질/고생산성 농업형질을 가진 국화 형질전환체에 대한 사업 타당성 분석

고품질 & 고생산성 농업형질을 가진 국화 형질전환체에 대한 사업화 타당성 (II)

전세계 국화 스탠다드 품종 시장 : 1,525백만본, 7,730백만\$
 일본 985백만본, 573백만\$, 0.6\$/본 (60엔/본) Source: MAFF (Japan), 2009
 한국 240백만본, 100백만\$, 0.4\$/본 (433원/본) Source: MAFRA (Korea), 2011
 기타(중국, 대만 등) 300백만본, 100백만\$ (추정) Source: Kim (2011)

국화 스탠다드 기존 품종의 형질전환을 통한 고생산성 효과
 년중 3기작에서 4기작으로의 전환을 통한 생산량 증가

국화 4기작 가능 고생산성 스탠다드 품종의 가치
 단위면적당 생산량의 증가 : 현재 생산량의 약 30% 증수 효과

현재 생산량이 150백만본일 경우(전세계 시장의 약10%)
 생산량 증가분 : 150백만본/year X 30% = 45백만본/year
 생산 가치 증가분 : 45백만본/year X 0.4\$ = 18백만\$/year
 국화 수익률: 18.5% (2008년 기준) Source: Kim (2011)

순이익: (150백만본+45백만본)/year / X 0.4\$/본 X 18.5% = 14.43백만\$/year

개발된 형질전환 신종 국화가 전세계 시장의 약 10% 확보
 순이익 14.43백만\$/year 확보 가능

GENOMINE 010-2600-0101

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

[기술개발 현황]

국화 절화 수명연장 연구: 대부분 국화 품종의 절화 수명은 꽃보다 잎의 황화나 시들음에 의하여 장단을 지배하는 것으로 알려져 있어 다른 화훼류에 비하여 잎의 노화 지연에 대한 연구가 재배와 육종에 있어서 중요한 일이다. 그럼에도 불구하고 재배와 육종 연구에 있어서 절화 수명에 있어서 잎의 역할에 대한 고려가 부족했다고 판단된다.

최근 들어 절화수명 연장을 위하여 다양한 연구가 수행되고 있는데, 메탄올, 에탄올, benzyladenine (BA)과 paclobutrazol 등이 국화 절화의 수명을 연장시키고 생체중 감소를 줄여주고, 엽록소 함량을 증가시키는 것으로 알려졌다. 특히 BA는 꽃잎에서의 안토시안 형성을 다소 방지하여 천연의 색을 유지함으로써 절화 수명도 연장하는 효과를 보이기도 하였다. 국내에서도 에틸렌 생합성 억제제인 STS, sucrose, 그리고 열탕처리 등으로 처리하여 절화 수명을 연장하는데 효과를 얻었다. 이러한 다양한 처리를 통한 수명연장 기술과 함께 식물 생명공학 기술을 통하여 노화가 지연되어 절화 수명이 연장된 신품종 개발이 병행되는 것이 최고의 효율을 얻게 될 것이라 생각된다.

생명공학기술을 이용한 국화 절화수명 연장 연구: 국화의 형질전환은 여러 연구 그룹에 의해 성공되었는데, 대부분 *Agrobacterium tumefaciens*를 사용되었으며(Lemieux et al., 1990; Ledger et al., 1991; Boase et al., 1998; Petty et al., 2003), 일부 biolistics가 이용되기도 하였다 (Yepes et al., 1995). 국화의 형질전환 효율은 절편체 출처, 재생 과정, binary vector의 사용, 선발제의 선택 또는 유전자 도입 방법에 따라 차이를 보이며, 페놀화합물로서 T-DNA의 유도인자인 acetosyringone은 목적 유전자의 도입을 촉진시켰다(Boase et al. 1998; Bush and Pueppke 1991; Lowe et al. 1993).

국화에서 형질전환을 통한 유용 유전자 도입은 바이러스 저항성(Urban et al., 1994), 병저항성(Takatsu et al., 1998; Toguri et al., 2003), 해충 저항성(Dolgov et al., 1997; Shinoyama et al., 1997)에 대한 1세대 유전자 변형 국화 개발에 많은 연구가 집중되었으며, 화색 변화(Courtney-Gutterson et al. 1994), 생장형 변화(Petty et al. 2003), 벼의 OsMADS1 유전자 도입(Jeong et al. 2002) 등과 같은 2세대 유전자 변형 작물 개발은 아직 제한적으로 연구가 되고 있는 실정이다.

국화는 재생 및 형질전환에 관하여 다양한 연구가 이루어졌음에도 불구하고 현재까지 개발된 국화의 형질전환 protocol이 낮은 형질전환 효율과 품종 특이성으로 인하여 일반적으로 사용되지 못하고 있다. 국화의 성공적인 형질전환을 위해서는 (1) *Agrobacterium*에 대한 반응성이 높으며, (2) 도입 유전자의 발현이 효율적으로 이루어지는 품종의 선택과 함께 (3) 선택된 품종에 적합한 재생 시스템의 확보가 필요하다.

현재까지 원예작물에서 생명공학 기술을 이용한 노화지연을 목적으로 개발된 사례를 보면, 과실류인 토마토, 멜론 및 화훼류인 카네이션에서 식물 노화를 야기하는 호르몬인 에틸렌 생합성을 조절하여 과실이나 꽃의 노화가 지연된 신품종이 개발되었다.

이들은 에틸렌 생합성 대사과정에 관여하는 효소의 작용을 저해하여 최종적으로 에틸렌 생합성을 감소시키는 기작을 사용하고 있다. 구체적으로 s-adenosylmethionine (SAM) hydrolase 유전자를 이용하여 SAM의 축적을 감소시켜 에틸렌 생합성을 감소시키는 방법, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase를 도입하여 내생 ACC synthase를 조절함으로써 에틸렌 축적을 감소시키는 방법 등이 있다.

[특허 현황]

생명공학 연구의 중요한 부분을 차지하고 있는 생명의 노화는 생물 발달 단계의 마지막으로 노화의 원인과 작용기작 규명을 통해 노화를 지연하고자 하는 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 식물에서도 마찬가지로 노화에 관련된 유전자의 조절기작을 밝히기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 고등 식물에서의 노화는 세포 사멸(Programmed Cell Death) 과정에 포함되어 있고, 세포사멸은 식물 내의 ethylene, abscisic acid 또는 cytokinin 등의 호르몬 작용과 당의 농도변화에 의해 조절된다고 알려져 있다. 이러한 식물 노화에 대한 연구는 생명공학적 중요성 뿐만 아니라 상업화 되어있는 작물의 생산성과 수확 후 저장효율에 관여하여 경제학적 가치에도 영향을 미치기 때문에 이를 조절하기 위한 생리학적 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 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. 그런 반면 노화조절에 대한 특허 출원은 스트레스 저항성에 비하여 출원건수가 현저히 적다가 최근 작물의 생산성과 맞물려 급속히 증가하는 추세이다.

이러한 유전자 수준의 분자생물학적 연구에는 노화관련 유전자 탐색 및 분리와 기능분석, 해당 식물의 형질전환 기술 확립이 선행되어야 한다. 국화의 형질전환 기술은 1990년대에 활발히 보고되어 이미 기술 확립이 완료된 상태이며, 최근에는 이를 이용한 신품종 개발에 대한 보고가 이루어지기 시작하고 있다.

[국외 제품생산 및 시장 현황]

세계의 화훼산업은 WTO 협상과 관련한 세계 무역 자유화로 인하여 급속한 변화를 맞이하고 있다. 세계적으로 화훼 소비량은 증가할 것으로 추정되며, 동시에 화훼 생산국간의 경쟁도 치열해지고 있다.

화훼 산업가운데 절화와 분화의 재배는 전 세계에 걸쳐 이루어지고 있는데, 절화 재배면적과 생산 가치는 증가하는 추세를 보이고 있으며 17개 주요 화훼 생산국들의 재배면적은 현재 약 60,000ha로 추정되고 있다. 또한 절화의 세계 시장에서의 소비는 매년 6%의 비율로 증가하고 있다. 1985년 총 소비액은 약 125억 달러였으며 1990년의 소비액은 약 250억 달러까지 상승하였고 이후 지속적인 성장이 이루어졌다. 1995년까지 총 세계 시장의 가치는 약 300억 달러였고, 앞으로 절화의 소비는 450억 달러 이상으로 증가할 것으로 예상된다.

국제관계에서 절화의 소비는 유럽, 북미와 아시아, 세 지역으로 집중된다. 가장 높은 비율의 성

장이 기대되는 곳이 동유럽과 미국이다. 서유럽 시장은 포화징조를 보이기 시작했고 그 결과로써 세계 시장에서 차지했던 절화 소비량이 감소하고 있다. 아시아에서는 증가하는 자국 내 수요와 일본의 고품질 시장이 주요 시장이 될 것이다.

한편, 화훼 작물 가운데 국화는 세계 3대 절화 작물의 하나인 주요 작물의 위치를 확보하고 있는데, 전 세계 재배 현황은 아래 그림과 같다. 주요 국가를 보면 네덜란드가 15억본 절화를 생산하여 최대 생산 국가이며, 콜롬비아가 9억본의 절화를 생산하여 그 뒤를 잇고 있다.



그림 106. 국화의 2006년 전세계 생산량 (Berkum, 2007)
<http://blog.maripositas.org/horticulture/world-chrysanthemum-production>

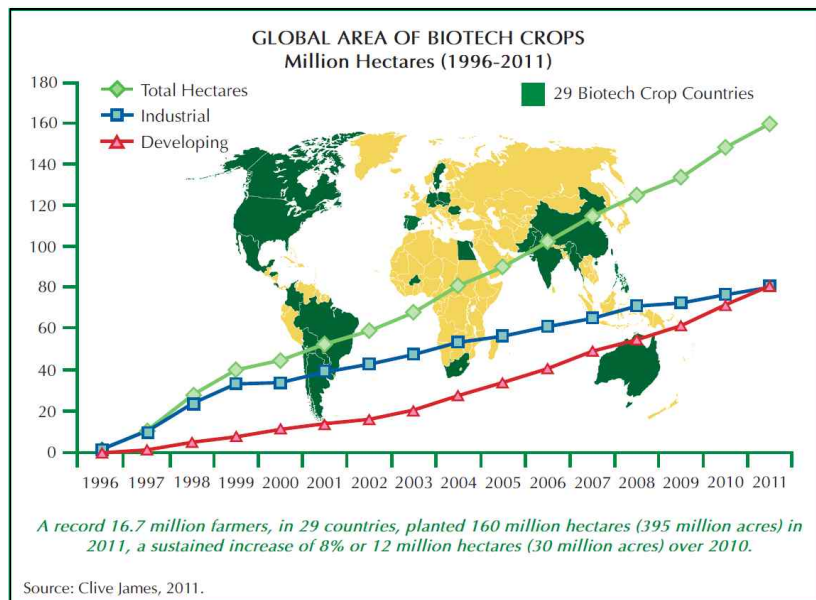


그림 107. Global Area of Biotech Crops (Clive James, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011, ISAAA)

[유전자 변형 작물 개발]

유전자 변형 작물 재배규모가 1996년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있고 최근의 바이오에너지 작물 개발이 지속적으로 진행된다면 그 시장 규모는 기하급수적으로 증가할 것으로 추정된다(그림 참조).

제 7 장 참고문헌

- Aharoni N and Richmond AE (1978) Endogenous gibberellin and abscisic acid content as related to senescence of detached lettuce leaves. *Plant Physiol* **62**, 224-228.
- Anderson NO, Ascher PD, Widmer RE and Ludy JJ (1990) Rapid regeneration cycling of chrysanthemum using laboratory seed development and embryo rescue technique. *J Am Soc Hort Sci* **115**, 329-336.
- Aravind L and Landsman D (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **19**, 4413-4421.
- Ashman TL and Schoen DJ (1994) How long should flowers live. *Nature* **371**, 788-791.
- Bate NJ, Rothstein SJ and Thompson JE (1990) Expression of nuclear and chloroplast photosynthesis-specific genes during leaf senescence. *J Exp Bot* **239**, 801-811.
- Beevers L and Guernsey FS (1967) Interaction of growth regulators in the senescence of *Nasturtium* leaf discs. *Nature* **214**, 941-942.
- Bleecker AB and Patterson SE (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 1169-1179.
- Broertjes C, Koene P and van Heen JWH (1980) A mutant of a mutant of a mutant of an irradiation of progressive radiation induced mutants in a mutation breeding programme with *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Euphytica* **29**, 525-530.
- Boase MR, Bradley JM and Borst NK (1998) Genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* of florists' chrysanthemum (*Dendranthema X grandiflorum*) cultivar 'Peach Margaret'. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* **34**, 46-51.
- 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)**, 1539-1546.
- Chen H, Nelson RS and Sherwood JL (1994) Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotechniques* **16**, 664-669.
- Chen YT, Fang QS, Chiang CH, Yeh SD, Wu HW and Yu TA (2010) Transgenic *Eustoma grandiflorum* expressing the bar gene are resistant to the herbicide Basta. *Plant Cell Tiss Org Cult* **10**, 347-356.
- Chin TU and Beevers L (1970) Changes in endogenous growth regulators in *Nasturtium* leaves during senescence. *Planta* **92**, 178-188.
- Colbert KA and Beever JE (1981) Effect of disbudding on root cytokinin export and leaf senescence in tomato and tobacco. *J Exp Bot* **32**, 121-127.
- Coles JP, Phillips AL, Croker SJ, Garcia-Lepe R, Lewis MJ and Hedden P (1999) Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J* **17**, 547-556.
- Courtney-Gutterson N, Napoli C, Lemieux C, Morgan A, Firoozabady E and Robinson K (1994) Modification of flower color in Florist's chrysanthemum: Production of a white-flowering variety through molecular

- genetics. *Biotechnology* **12**, 268-271.
- De Jong J, Rademaker W and Wordragen MF** (1993) Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult* **32**, 263-270.
- De Jong J, Rademaker W and Ohishi K** (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Tiss Cult Biotechnol* **1**, 38-42.
- Dolgov SV, Mitiouchkina TY and Skryabin KG** (1997) Agrobacterial transformation of chrysanthemum. *Acta Hort* **447**, 329-333.
- Gan, S and Amasino and RM** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.
- Guame't JJ, Teeri JA and Noode'n LD** (1990) Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean. *Plant Cell Physiol* **31**, 1123-1130.
- Han BH, Lee SY and Choi SY** (2009) *MdMADS2*-transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) showing the reduction of the days to flowering. *J Plant Biotechnol* **36**, 366-372.
- Hensel LL, Grbic V, Baumgarten DA and Bleecker AB** (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**, 553-564.
- Heong JH, Chakrabart D, Kim SJ and Paek KY** (2002) Transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) cv. Cheonsu by constitutive expression of rice *OsMADS1* gene. *J Kor Soc Hort Sci* **43**, 382-386.
- Hudo S, Shibata N, Kanno Y and Suzuki M** (2002) Transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) via *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Hort* **572**, 139-147.
- Kanda T, Sullivan KF and Wahl GM** (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol* **8**, 377-385.
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG and Hwang I** (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 814-819.
- Ledger SE, Deroles SC and Given NK** (1991) Regeneration and *Agrobacterium-mediated* transformation of chrysanthemum. *Plant Cell Rep* **10**, 195-199.
- Li G, Hall TC and Holmes-Davis R** (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. *Biochem Soc Transac* **603**, 591-593.
- Lim PO, Woo HR and Nam HG** (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **8**, 272-278.
- Lim PO and Nam HG** (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Curr Top Dev Biol* **67**, 49-53.

- 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. *Plant J* **52**, 1140-1153.
- Lohman KN, Gan S, John MC and Amasino RM** (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **92**, 322-328.
- 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.
- Nam HG** (1997) Molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 200-207.
- 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 Mol Biol* **30**, 739-753.
- 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.
- Petty LM, Harberd NP, Carré IA, Thomas B and Jackson SD** (2003) Expression of the *Arabidopsis gai* gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response. *Plant Sci* **164**, 175-182.
- Robinson KEP and Firoozabady E** (1993) Transformation of floriculture crops. *Sci Hort* **55**, 83-99.
- Ronen M and Mayak S** (1981) Interrelationship between abscisic acid and ethylene in the control of senescence processes in carnation flowers. *J Exp Bot* **32**, 759-765.
- Sauvadet MA, Brochard P and Boccou-Gibo J** (1990) A protoplast-to-plant system in chrysanthemum: differential responses among several commercial clones. *Plant Cell Rep* **8**, 692-695.
- Seo SY, Choi DC, Kim JM, Lim HC, Kim HJ, Choi JS and Choi YG** (2003) Plant regeneration from leaf explants and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *Acta Hort* **620**, 333-338.
- Sgarra R, Lee J, Tessari MA, Altamura S, Spolaore B, Giancotti 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.
- Shibata, M** (2008) Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding. *Plant Biotechnol* **25**, 3-8.
- Soh HS, Han YH, Lee GY, Lim JW, Yi BY, Lee YH, Choi GW and Park YD** (2009) Transformation of *Chrysanthemum morifolium* with insecticidal gene (*CryIAc*) to develop pest resistance. *Hort Environ Biotechnol* **50**, 57-62.
- 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.
- Strick R and Laemmli UK** (1995) SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell* **83**, 1137-1148.

- 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.
- Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, Laliberte C, Brandt R, Kaplan D and Unsicker K (2005) Insulin-Like Growth Factor 1 Inhibits Extracellular Signal-Regulated Kinase to Promote Neuronal Survival via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase A/c-Raf Pathway. *J Neurosci* **25**, 2838-2852.
- Sun L, Zhou L, Lu M, Cal M, Jing XW and Zhang QX (2009) Marker-free transgenic chrysanthemum obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation with Twin T-DNA binary vectors. *Plant Mol Biol Rep* **27**, 102-108.
- Takatsu Y, Tomotsune H, Kasumi M and Sakuma F (1998) Differences in adventitious shoot regeneration capacity among Japanese chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) cultivars and the improved protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *J Jap Soc Hortic Sci* **67**, 958-964.
- Tanaka K, Kanno Y, Kudo S and Suzuki M (2000) Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Ramat. Kitamura) *Plant Cell Rep* **19**, 946-953.
- Teixeira da Silva JA and Fukai S (2002) Change in transgene expression following transformation of chrysanthemum by four gene introduction methods. *Prop Ornament Plants* **2**, 28-37.
- Teixeira da Silva JA (2003) Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnol Adv* **21**, 715-766.
- Teixeira da Silva JA (2004) Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. *Plant Cell Tiss Org Cult* **79**, 1-18.
- Toguri T, Ogawa T, Kakitani M, Tukahara M and Yoshioka M (2003) *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) plants with a disease resistant gene (*pac1*). *Plant Biotechnol* **20**, 121-127.
- Urban LA, Sherman JM, Moyer JW and Daub ME (1994) High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Sci* **98**, 69-79.
- Van Staden J (1995) Hormonal control of carnation flower senescence. *Acta Hort* **405**, 232-237.
- Voleti SR, Singh VP, Ajay A, Narendra S, Kushwaha SR, Arora A, Singh N and Hemantaranjan A (2000) Physiology of flower senescence in floricultural crops. *Adv Plant Physiol* **3**, 423-439.
- 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**, 1148-1158.
- 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 단백

질과 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))

이동희, 이인철, 김국진, 김동수 (2013) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG10 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2013-0075022 (출원인; 제노마인(주))

[부록 1] 특허출원 (10-2012-0016951)

【명세서】

【발명의 명칭】

식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도{ATPG3 Protein Delaying Senescence and Providing Yield Increase and Stress Tolerance in Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Uses}

【기술분야】

본 발명은 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

식물의 노화(plant senescence)는 식물의 발달 과정 중 수명을 결정짓는 마지막 단계로 유전적으로 계획되어 있어 세포, 조직, 기관 및 개체 수준에서 매우 정교하고 능동적으로 진행되는 생명 현상이다. 노화 개시를 기점으로 잎 단백질의 70%를 구성하는 엽록체가 분해되면서 점차적으로 합성 능력이 저하되고, 단백질, 막 지질, RNA 등과 세포 구조물이나 거대 분자들이 순차적으로 분해되어 세포의 항상성을 잃음으로써 결국 죽음에 이르게 된다. 노화가 진행되는 동안 생성된 세포 분해 산물들은 새로이 성장하는 기관이나 종자 등의 저장기관으로 대량 이동되어 식물의 영양분으로 재이용된다. 따라서 식물의 노화는 진화 과정에서 능동적으로 획득한 환경 적응 전략이라고 보고 있다(Buchanan-Wollaston et al., *Plant Biotechnology Journal* 2003, 1:3-22.; Lim and Nam, *Curr. Top. Dev. Biol.* 2005, 67:49-83).

식물의 노화에 대한 연구는 생물학적인 측면에서 생명 현상의 이해를 위해서뿐만 아니라, 식물의 노화 조절을 통하여 작물의 생산성, 저장성, 수송성 등의 증진이 가능하기 때문에 농업 경제적 측면에서도 매우 중요하다. 이러한 학문적, 산업적 측면에서의 중요성 때문에 식물의 노화 조절에 대한 연구가 활발하게 이루어져 왔다. 노화 특이적인 *SAG12* 유전자의 promoter에 *IPT* 유전자를 재조합하거나 *AG12* promoter에 옥수수의 homeobox gene(*knotted1*)를 재조합하여 노화 지연 호르몬인 cytokinin level을 증가시킴으로써 담배의 생산성을 증대시킨 예가 있으며(McCabe et al., *Plant Physiol.* 2001, 127(2):505-16; Naomi et al., *Plant Cell*, 1999, 11:1073-1080), 세포벽

분해와 관련된 polygalacturonase 유전자의 발현을 억제시켜 토마토의 운송성과 저장성을 증가시킨 예가 있다(Giovannoni et al., *Plant Cell* 1(1):53-63, 1989). 또한 노화 진행시 과발현되는 유전자로서 *WRKY53* 유전자(Miao et al., *Plant Mol. Biol.* 2004, 55:853-867), *AtNAP* 유전자, *GmSARK* 유전자 등의 보고되어 있다(Miao et al., *Plant Mol. Biol.* 2004, 55:853-867; Guo and Gan et al., *Plant J.* 2006, 46(4):601-12; Li et al., *Plant Mol Biol.* 2006, 61:829-844). 이들 유전자의 발현 억제는 노화를 지연시켜 결과적으로 작물의 생산성 등의 향상을 가져올 수 있다.

본 발명도 작물의 생산성 등의 향상을 가져올 수 있는 노화 지연 등의 기능을 가지는 유전자 등을 개시한다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명의 목적은 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 노화 지연 기능을 가지며 스트레스 내성 기능을 가지는 ATPG3 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 생산성 증대 기능을 가지고 노화 지연 기능을 가지며 스트레스 내성 기능을 가지는 ATPG3 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, 개체의 생체량 증가 및/또는 종자 생산성 증가라는 생산성 증대 특성이 뚜렷하게 나타나고, 식물의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타나며 이와 더불어 가뭄 스트레스 또는 산화적 스트레스에 대한 내성 특성도 뚜렷하게 나타남을 확인하였다.

이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이

식물체의 노화를 지연시키고 식물의 생산성을 증대시키는데 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 본 발명자들은 상기 유전자를 *ATPG3*(AT-hook protein of Genomine 3) 유전자 및 *ATPG3* 단백질로 명명하였으며, 이들 염기 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 및 2에 개시되어 있다.

본 발명의 *ATPG3* 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 확인한 실시예를 개시하고 있기 때문에, 본 발명의 "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 당업자에게 용이하게 실시 가능한 것이 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, 또한 스위치그라스, 억새, 갈대 등과 같은 바이오에너지 작물과(추가) 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

콜리플라워모자이크 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 벤젠설포아미드에 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 충격 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, 벼 α -아밀라아제 RAmy1 A 유전자의 전사 종결 서열, 아그로박테리움 투메파시엔스의 옥토판인(Octopine) 유전자의 전사 종결 서열, 밀 열 쇼크 단백질 17의 전사 종결 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, 포스핀노-트리신 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, 프로랄 딥(floral dip)을 이용한 *in planta* 형질전환 방법, 화분 매개 형질전환 방법, 원형질체의 형질전환 방법, 바이러스 매개 형질전환 방법, 리포좀 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 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 목화에는 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 발현벡터를 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 노화 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 ATPG3 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 ATPG3 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG3*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 ATPG3 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG3*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 게놈이 변형된 식물체, 식물 종자, 식물 세포를 포함한다.

【발명의 효과】

전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 또한 노화 지연과 스트레스 내성 기능을 가지는 *ATPG3* 단백질과 그 유전자를 제공할 수 있다. 상기 유전자는 식물의 생산성 증대 기능 및 노화 지연과 스트레스 내성 기능을 제공하므로, 이 유전자로 식물체를 형질전환시킬 경우, 생산성을 증가시킬 뿐만 아니라 식물의 노화 지연과 스트레스 내성 기능을 가지는 식물체를 제작할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 또한 노화 지연과 스트레스 내성 기능을 가지는 *ATPG3* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 2는 상기 도 1의 pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 발아 후 50일과 70일 동안 생육시킨 애기장대의 사진이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

ATPG3 ox-1: pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG3 ox-2: pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG3 ox-8: pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 3은 상기 도 1의 pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 자엽 생성 후 20일 동안 생육시킨 애기장대의 *ATPG3* 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

Wt: 애기장대 야생형

ATPG3 ox-1: pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG3 ox-2: pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG3 ox-8: pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 4는 애기장대 야생형의 다양한 식물 기관에서 *ATPG3* 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 3의 애기장대 라인의 생산성 증대에 대한 그림이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

ATPG3 ox-1: pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG3 ox-2: pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG3 ox-8: pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

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

도 6은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*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 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*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 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*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 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*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 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*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 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*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 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*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 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*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 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*을 14일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어난 식물의 표현형적 변화를 도시한 그림이다.

Col: 애기장대 야생형

Con: 애기장대 대조구

ATPG3 ox-1: pCSEN-ATPG3 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG3 ox-2: pCSEN-ATPG3 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG3 ox-8: pCSEN-ATPG3 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 15는 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*을 14일 동안 가뭄을 처리하고, 7일과 14일 동안에 일어난 식물 잎의 무게 변화를 도시한 그림이다.

도 16는 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 표현형 변화를 도시한 그림이다.

Col: 애기장대 야생형

Con: 애기장대 대조구

ATPG3 ox-1: pCSEN-ATPG3 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG3 ox-2: pCSEN-ATPG3 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG3 ox-8: pCSEN-ATPG3 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 20은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*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 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*, 그리고 *ATPG3 ox-8*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 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 애기장대로부터 식물의 생산성 증대와 노화 지연을 조절하고 또한 스트레스 내성을 제공하는 ATPG3 유전자의 분리

식물의 생산성 증대 기능을 가지고 또한 노화 지연과 스트레스 내성 기능을 가지는 ATPG3 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다.

<실시예 1-1> 애기장대의 재배 및 배양

애기장대는 토양을 담은 화분에서 재배하거나, 2% 슈크로즈(sucrose, pH 5.7)와 0.8% 아가(agar)가 포함된 MS(Murashige and Skoogsalts, 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 생산성 증대 기능을 가지고 또한 노화 지연과 스트레스 내성을 제공하는 ATPG3 유전자 분리

애기장대의AT-HOOK MOTIF NUCLEAR-LOCALIZED

PROTEIN (GeneBank accession number NP_567432.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머 (*PacI*/At4g14465 SOE-F, 5'- TTA ATT AAA TGG CAA ACC CTT GGT GGA CG -3')와 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머 (*XbaI*/At4g14465 SOE-R, 5'-TCT AGA TCA GTA AGG TGG TCT TGC GTG G-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 29.5 kDa의 분자량을 갖는 281개의 아미노산을 암호화하는 846bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG3*(AT-hook protein of Genomine 3)으로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 *ATPG3* 단백질의 등전점(isoelectric point)은 6.65로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "*ATPG3*" 혹은 "*ATPG3* 유전자"라 하고, 단백질은 "ATPG3" 혹은 "ATPG3 단백질"이라고 한다).

<실시예 2> *ATPG3* 유전자에 대한 센스 구성체 (construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 노화에 대한 특성 분석

<실시예 2-1> *ATPG3* 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

상기 유전자가 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 또한 노화 지연과 스트레스 내성을 제공하는지를 확인하기 위하여 *ATPG3* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG3* 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 *ATPG3* 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 *ATPG3* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG3* 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을

갖는다.

한편, 도 1은 pCSEN 벡터에 *ATPG3* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG3* 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 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.

상기 pCSEN-*ATPG3* 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 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 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 *ATPG3* 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-*ATPG3* 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조군(*ATPG3* 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 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(도 2).

pCSEN-ATPG3 구성체를 가지고 있는 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 흥미로운 점은 이들 변이체들은 발아 후 50일 동안 생육했을 때는 노화 지연 표현형을 가지나 개체 크기에 있어서는 야생형에 비하여 비슷하거나 혹은 약간 작았으나, 발아 후 70일 동안 생육했을 때는 노화 지연 표현형질뿐만 아니라 개체 크기와 종자 생산량에서도 애기장대 야생형에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다. 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 *ATPG3* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8* 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 *ATPG3* 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 도 3에 도시되었다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8* 변이체의 *ATPG3* 유전자의 발현이 전체적으로 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG3* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

ATPG3 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8* 변이체들은 모두 대조구에 비하여 개체 크기, 종자 수확량 등의 생산성 증대 형질이 높은 것으로 나타났다. 그런데 흥미로운 사실은 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 *ATPG3 ox-8* 변이체는 *ATPG3 ox-1*과 *ATPG3 ox-2* 변이체에 비하여 노화 지연에 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. 특히 유전자의 발현 조절을 통하여 애기장대 야생형과 같은 수확시기를 가지고 생산성이 증대되는 식물의 제작이 용이함에 따라 *ATPG3*은 우량 생산성 증대 작물 개발에 있어 훌륭한 유전자원으로 활용할 수 있을 것이다.

【표 1】

ATPG3 유전자와 *ACT2* 유전자 발현을 위한 프라이머 서열 및 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	<i>ATPG3</i>	CACCGCCAGAAATCGGTAGTA(서열번호 5)/ GATGCGGCGGCATATTGTAG(서열번호 6)
2	<i>ACT</i>	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAAACCAGCCTTC (서열번호 8)

한편 애기장대 야생형의 *ATPG3* 유전자의 식물체 기관별 발현 양상을 분석하기 위하여 애기장대 야생형의 다양한 발달 단계에서 기관별 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 이를 주형으로 하여 *ATPG3* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과는 도 4에서 도시된 바와 같이, *ATPG3* 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 에서 주로 기능을 가져 식물의 노화 조절에 관여할 것으로 판단되는 반면, 뿌리와 발달 초기의 유식물 등 식물의 발달 초기에는 기능을 거의 가지지 않은 것으로 판단된다.

<실시예 3> *ATPG3* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석

ATPG3 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 ATPG3 ox-1, ATPG3 ox-2와 ATPG3 ox-8의 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.

ATPG3 ox-1, ATPG3 ox-2와 ATPG3 ox-8 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 2배 이상 종자 무게에 있어서 증가하는 것으로 나타났으며, 또한 변이체의 장각과 수의 증가 양상은 총 종자 무게의 양상과 유사하였다. 한편 종자 1,000개의 무게에는 변이체 전체는 대조구에 비하여 큰 변이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자의 발현은 종자의 개체 크기가 아닌 전체 무게의 증가에 영향을 미치는 것으로 판단되며, 이러한 형질은 본 유전자가 화기 형성을 촉진하여 전체 장각과 형성의 증가를 유도하여 결과적으로 전체 종자 무게의 증가를 유발하는 것으로 판단된다. 그리고 생체량과 생체 건량에 있어서도 과발현 변이체는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상을 가졌다. 이러한 사실은 ATPG3 유전자가 노화 지연과 더불어 개체 크기, 종자 크기 및 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하고(도 5), 그리고 과발현 변이체의 라인별 생산성 증대의 차이는 라인별 ATPG3 유전자의 발현 정도의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 효용 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

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 있다는 것이다.

이러한 결과를 종합해보면, ATPG3 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 4> ATPG3 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석

ATPG3 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T₂ 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

<실시예 4-1> ATPG3 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 36일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 ATPG3 ox-1, ATPG3 ox-2와 ATPG3 ox-8의 경우 잎의 황화 현상이 32일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일 이후부터 일어남을 확인할 수 있었다(도 6). 이러한 사실로 미루어보아, ATPG3 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라 판단된다.

<실시예 4-2> ATPG3 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 최저치로 떨어졌으나, ATPG3 ox-1, ATPG3 ox-2와 ATPG3 ox-8의 경우 자엽 생성 후 28일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 이상의 엽록소 함량을 보이며, 그 후 엽록소 함량의 감소가 천천히 일어남을 확인할 수 있었다.

<실시예 4-3> ATPG3 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; Fm)에 대한 최대 변형 형광도(maximum variable fluorescence; Fv)의 비율(Fv/Fm)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 36일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8*의 경우 자엽 생성 후 40일에도 광합성 효율이 초기의 80%를 유지하고 있었다. 상기 결과로부터, *ATPG3* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG3* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

<실시예 4-4> *ATPG3* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 노화 관련 유전자의 발현 변화

야생종과 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8* 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence-associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG3* 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-IITM Reverse Transcription System (Promega)을 이용해 first cDNA를 합성하였다.

ATPG3 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 대조구조로는 *ACT2* 유전자를 사용하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 2에서 제시하였다.

【표 2】

노화 관련 유전자의 발현을 위한 프라이머 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	<i>CAB2</i>	CCGAGGACTTGCTTACCCC (서열번호 9)/

		AACTCAGCGAAGGCCTCTGG (서열번호 10)
2	<i>SEN4</i>	CGTCGATGACACACCCATTAGAG(서열번호11)/ CATCGGCTTGTCTTTGGAAAC(서열번호12)
3	<i>SAG12</i>	ACGATTTTGGCTGCGAAGG (서열번호 13)/ TCAGTTGTCAAGCCGCCAG (서열번호 14)
4	<i>ACT2</i>	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAACCAGCCTTC (서열번호 8)
5	<i>ATPG3</i>	CACCGCCCAGAATCGGTAGTA(서열번호 5)/ GATGCGGCGCATATTGTAG(서열번호 6)

야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였으나, *ATPG3* 과발현 변이체들은 *CAB2*의 발현 감소가 지연되는 것으로 나타났다. 노화의 signal로 사용되는 *SAG12* 발현의 경우, 야생종은 28일과 32일째 최대 발현을 나타내는 반면, *ATPG3* 과발현 변이체들은 40일까지 증가 현상이 거의 나타나지 않았으며, 식물의 노화 동안 점진적으로 발현이 증가되는 것으로 알려진 *SEN4*의 발현은 야생종에서는 28일째 발현이 최대로 증가하는 반면, *ATPG3* 과발현 변이체들은 노화 초기 과정에서는 *SEN4*의 발현 증가가 크게 나타나지 않다가 36일 이후부터 발현 증가 현상을 나타냈다. 하지만 이러한 변이체의 *SEN4* 발현 정도는 야생형의 노화 동안의 발현 정도에 비하여 현저히 낮음을 알 수 있었다. 한편 *ATPG3* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 전체적으로 *ATPG3* 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 노화 전 과정 동안 발현 수준이 현저히 높으며 일부 구간에서 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(도 9). 따라서 과발현 변이체들의 노화 지연 현상은 *ATPG3* 유전자의 과발현에 의해 유도되는 것으로 생각된다. 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG3* 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> *ATPG3* 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG3* 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 상기 <실시에 4-1 내지 4-4>와 동일한 방법으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 6일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG3 ox-1*, *ATPG3 ox-2*와 *ATPG3 ox-8*의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 보여지며(도 10), 암처리에 의한 노화 동안 엽록소 함량과 광합성 효율 변화에 있어서도 야생종에 비하여 *ATPG3* 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 <실시에 4-4>와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 도 13에 도시된 바와 같이, 야생형에 비하여 *ATPG3* 변이체들은 *CAB2*의 발현 감소는 유사하였으나 *SAG12*의 발현은 지연되고, *SEN4*의 발현율은 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 보아 *ATPG3* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

<실시에 5> *ATPG3* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석

<실시에 5-1> *ATPG3* 과발현 변이체의 가뭄 스트레스에 대한 특성 분석

ATPG3 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 가뭄에 의하여 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그에 비하여 *ATPG3* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG3*이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

<실시에 5-2> *ATPG3* 과발현 변이체의 H₂O₂ 스트레스에 대한 특성 분석

ATPG3 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H₂O₂을 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 *ATPG3* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소, 특히 광합성 효율의 감소가 지연됨을 확인할 수 있었다(도 16, 17과 18). 이러한 사실은 *ATPG3*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

따라서 *ATPG3* 유전자는 식물의 생산성 증대와 노화 지연뿐만 아니라 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성도 제공하여 스트레스 저항성을 가진 생산성 증대 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 *ATPG3* 단백질.

【청구항 2】

제1항의 단백질을 암호화하는 *ATPG3* 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 1의 염기 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 1의 염기 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 1의 염기 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】

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

【청구항 16】

제6항 기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체.

【청구항 17】

제9항 기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성 특성을 갖는 형질전환 식물체.

【요약서】

【요약】

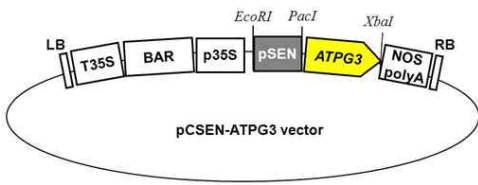
본 발명은 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도를 개시한다. 상기 형질전환되어 과발현된 식물체는 생산성이 증대되는 특성을 보일 뿐만 아니라 노화 지연 특성과 스트레스 내성 특성도 보인다.

【대표도】

도 1

【도면】

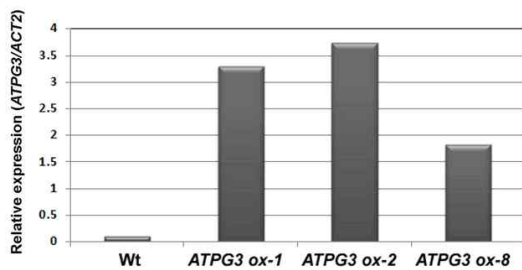
【도 1】



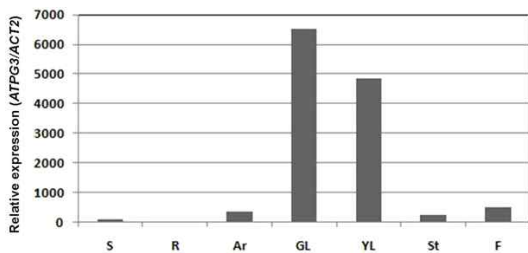
【도 2】



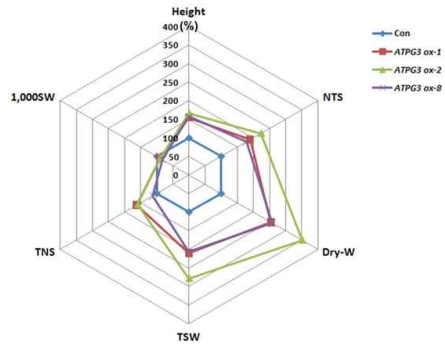
【도 3】



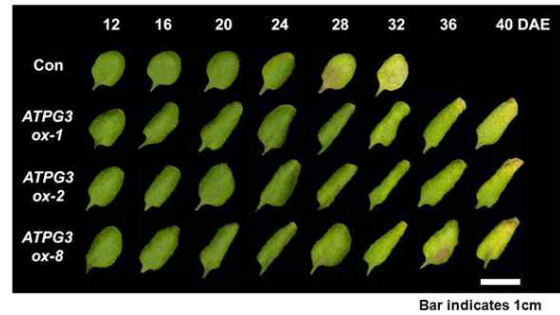
【도 4】



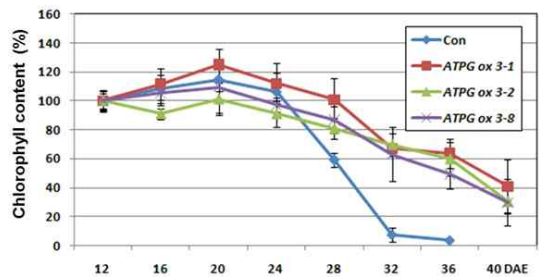
【도 5】



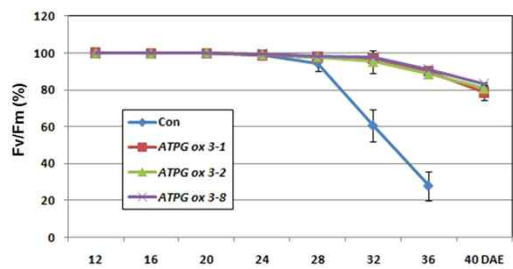
【도 6】



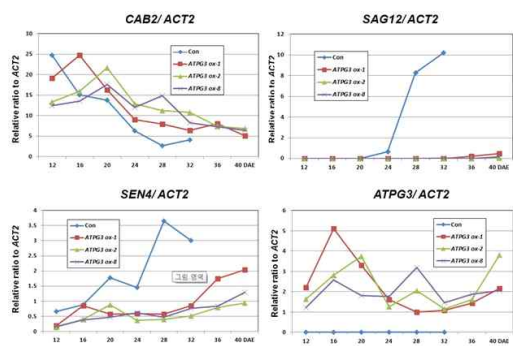
【도 7】



【도 8】



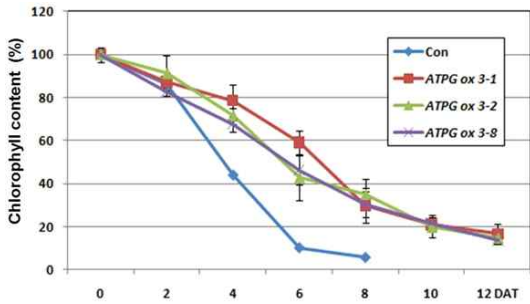
【도 9】



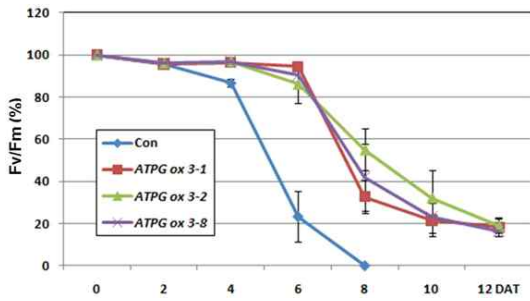
【도 10】



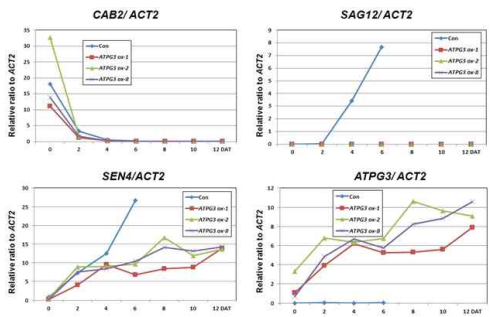
【도 11】



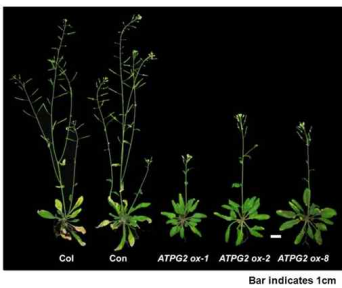
【도 12】



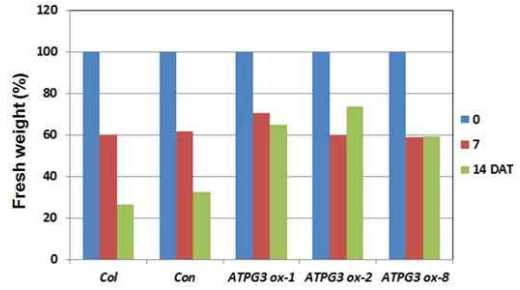
【도 13】



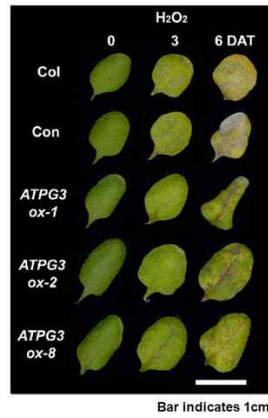
【도 14】



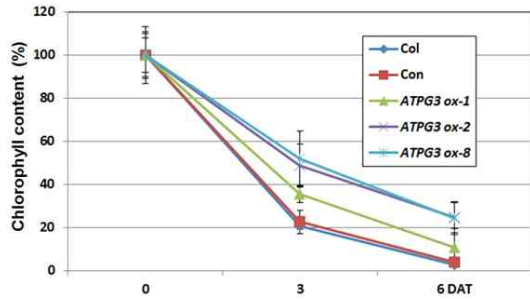
【도 15】



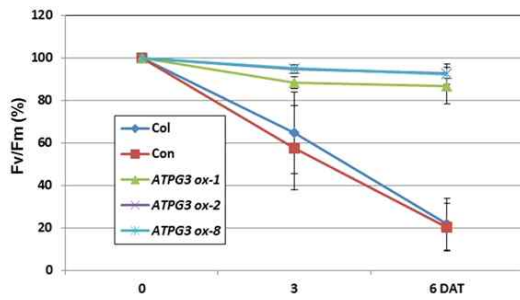
【도 16】



【도 17】



【도 18】



[부록 2] 특허출원 (10-2013-0075018)

【명세서】

【발명의 명칭】

식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG6 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도{ATPG6 Protein Providing Yield Increase and Stress Tolerance as well as Delaying Senescence in Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Uses}

【기술분야】

본 발명은 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG6 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

식물의 노화(plant senescence)는 식물의 생애 주기(life cycle) 중 주요한 단계로 여겨지며, 유전적으로 조절된 반응들을 통하여 세포, 조직, 기관 및 개체 수준에서 매우 정교하게 연계되어 진행된다. 노화 과정의 진행은 식물체의 여러 기관에서 다르게 일어날 수 있는데 잎의 경우 엽록체의 분해에 이어서 지질, 단백질, 핵산의 분해가 순차적으로 일어난다. 세포막과 세포 내 구획 등의 세포 구조물은 마지막까지 유지되며 분해된 산물인 질소와 영양분의 재배치가 일어난 후 죽음에 이르게 된다(Lohman et al., *Physiologia Plantarum*, 1994, 92:322-8.; Smart, *New Phytologist*, 1994, 126:419-48; Pruzinska et al., *Plant Physiology*, 2005, 139:52-63). 식물체가 노화를 결정하는 시기는 영양분의 보유상태나 재배치와 연관이 있기 때문에 개화나 종자의 생산은 종종 노화를 촉진하는 요인이 된다. 또한 식물체는 계절적인 변화나 예측하지 못했던 외부 환경 변화에 대한 종 전체의 생존 전략으로도 노화 과정을 진행시킨다.

식물에서 유용물질을 얻기 위하여 재배를 할 경우, 유용물질 생산에 사용 가능한 식물의 양과 시기가 한정적이며 기후 풍토 등의 외부 인자에 의한 영향에 민감하게 반응하여 식물이 노화 및 죽음에 이르는 문제점이 있기 때문에 식물의 노화에 대한 연구는 생물학적인 측면에서 생명 현상의 이해를 위해서뿐만 아니라 생산성, 저장성, 수송성 등의 증진을 통한 경제적 이윤 창출 측면에서도 매우 중요하다.

노화 과정은 여러 유전자의 발현 변화에 따라 진

행되는데 광합성과 기초 대사 관련 유전자의 발현은 감소하며 세포사멸, 스트레스 반응 유전자, 가수분해 효소 관련 유전자의 발현은 증가하게 된다(Hopkins et al., *New Phytologist*, 2007, 175:201-14; Lim et al., *Annual Review of Plant Biology*, 2007, 58:115-136). 이러한 식물의 노화 관련 유전자(Senescence Associated Genes, SAGs)에 대한 연구는 학문적, 산업적 측면에서의 중요성 때문에 활발히 이루어지고 있다.

아실-가수분해효소 활성(acyl hydrolase activity)을 지니는 *SAG101* 유전자의 antisense 서열을 식물체에 도입시켜 노화를 지연시키는 기술(He and Gan, *Plant Cell*, 2002, 14(4):805-15)과 같이 직접적으로 노화 촉진 유전자의 발현을 저해하는 방법이 개발되었으며 노화 진행 시기 동안 노화를 저해하는 유전자를 과발현하는 방법도 개발되었다. 미국 등록특허 제 5689042호에는 *SAG12* 나 *SAG13* 유전자의 promoter에 cytokinin 합성 관련 유전자를 결합시켜 노화를 지연시키는 방법이 개시되어 있는데 *SAG12* 유전자의 promoter에 *IPT* 유전자를 재조합 할 경우 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., *Plant Physiol.* 2001, 127(2): 505-16). 또한 *SAG12* promoter에 옥수수의 homeobox gene(knotted1)을 발현시킨 담배에서 cytokinin의 level이 증가하고 잎의 노화도 지연되었다는 보고가 있었다(Naomi et al., *Plant Cell*, 1999, 11:1073-1080).

토마토의 경우 ethylene 합성과정을 저해하여 과일의 숙성을 조절한 사례가 보고되어 있으며(Oeller et al., *Science*. 1991, 254(5030):437-9) 또한 세포벽 분해와 관련된 polygalacturonase 유전자의 발현을 억제시켜 토마토의 운송성과 저장성을 증가시킨 Flav-O-Savor의 경우가 대표적으로 상업화된 예가 될 수 있다(Giovannoni et al., 1989, *Plant Cell* 1(1):53-63).

또한 노화 진행시 과발현되는 유전자로서 *GmSARK* 유전자와 NAC family에 속하는 *WRKY53*, *WRKY6* 및 *AtNAP* 유전자 등이 보고되었으며(Miao et al., *Plant Mol. Biol.* 2004, 55:853-867; Guo and Gan et al., *Plant J.* 2006, 46(4):601-12; Li et al., *Plant Mol Biol.* 2006, 61:829-844; Besseau et

al., J Exp Bot 2012, 63(7):2667-79) *CBF2*, *CBF3*와 같은 유전자들은 노화를 억제시키는 것으로 알려졌다(Sobieszczuk-Nowicka et al., Physiol Plant 2007;130:590-600). 이들 유전자의 발현 조절은 노화를 지연시켜 결과적으로 작물의 생산성 등의 향상을 가져올 수 있다. 미국등록특허 제 8420890호에는 *AtNAP* 유전자의 발현 억제를 통한 노화의 지연 방법이 개시되어 있는데 최근에는 *AtNAP*를 과발현시켜 목화 등의 수확을 용이하게 하거나 과실의 빠른 성숙을 돕는데 이용하기 위한 연구도 진행되고 있다(Kou et al., J Exp Bot. 2012, 63(17):6139-47).

최근 담배의 생애 주기에 따른 유전자 발현 조사(Edwards et al., BMC Genomics. 2010, 11:142)를 통하여 Tobacco Expression Atlas (TobEA) 데이터베이스가 확보되었으며 식물의 노화와 성장 조절에 대한 유전자 연구는 더욱 가속화 되고 있다. 본 발명도 작물의 생산성 등의 향상을 가져올 수 있는 노화 지연 등의 기능을 가지는 유전자 등을 개시한다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명의 목적은 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 스트레스 내성 기능을 가지며 노화 지연 기능을 가지는 ATPG6 단백질을 제공하는 데 있다.

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

본 발명의 기타의 목적은 이하에서 제시될 것이다.

【과제의 해결 수단】

본 발명은 일 측면에 있어, 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 스트레스 내성 기능을 가지며 노화 지연 기능을 가지는 ATPG6 단백질에 관한 것이다.

본 발명자(들)는 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, 애기장대의 AHL22 (AT-hook motif

nuclear-localized protein 22, GeneBank accession number NP_182067.1) 염기서열을 기초로 상기 단백질의 유전자를 분리하고 상기 유전자를 애기장대에 형질전환시켜 과발현시켰을 때, 개체의 생체량 증가 및/또는 종자 생산성 증가라는 생산성 증대 특성이 뚜렷하게 나타나고, 가뭄 스트레스 또는 산화적 스트레스에 대한 내성 특성도 뚜렷하게 나타나며 이와 더불어 식물의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타남을 확인하였다.

이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이 식물의 생산성을 증대시키고 스트레스에 대한 내성을 제공하며, 또한 식물체의 노화를 지연시키는데 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

본 발명자들은 상기 유전자를 *ATPG6*(*AT-hook protein of Genomine 6*) 유전자 및 ATPG6 단백질로 명명하였으며, 이들 염기 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 및 2에 개시되어 있다.

본 발명의 ATPG6 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 보유하기에 충분한 정도의 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로서 정의된다. 여전히 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스

내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 가지는 폴리펩티드라면 그 길이야 어떻든 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"에 포함된다는 것이다. 당업자라면, 즉 본 출원서를 기준으로 공지된 관련 선행 기술을 숙지하고 있는 자라면, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 일부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 여전히 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 상

기 "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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 보유하는 폴리펩티드를 말한다. 여기서도 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 식물의 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 보유하기만 한다면 본 발명에 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 지니는 것을 확인한 실시예를 개시하고 있기 때문에, 본 발명의 "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 당업자에게 용이하게 실시 가능한 것이 분명하다. 그러므로 "상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도 여전히 식물의 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 적용되어 진다.

본 발명은 다른 측면에 있어서, 전술한 바의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 대한 것이다. 여기서 "전술한 바의 폴리펩티드"란 식물의 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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, 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 1 개체 당 종자의 수 및/또는 질량)이 야생형 식물체에 비하여 증가한 특성을 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 생산성 증대 특성 등이 인간에게 유용한 결과를 줄 수 있는 모든 식물을 포함한다. 따라서 상기 식물의 의미에는 작물(구체적으로 식용작물, 사료작물, 공예작물 등의 농작물과 원예작물을 포함함), 임목, 관상식물을 포함된다. 구체적으로는 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, 양다

래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나 등이 포함될 것이고, 또한 스위치그라스, 억새, 갈대 등과 같은 바이오에너지 작물과 기타 라이그라스, 레드 클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레 니얼라이그라스, 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 생산성 증대 특성 등을 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 생산성 증대 식물체의 제조 방법에 있어서, 상기 단계 (a)는 유전공학적인 방법으로 수행될 수 있다.

유전공학적인 방법은 (i) 상기 서열번호 1의 유전

자 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, 전사 종결 서열(polyadenylation signal), 복제 개시점을 포함한다.

또한 본 명세서에서, "프로모터"는 당업계에 알려진 통상의 의미를 따르는데, 구체적으로는 어떤 유전자의 전사 개시점을 기준으로 상위(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 상위에 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; Comejo 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 벤젠설포아미드에 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, 옥토피인 신타제(OCS) 프로모터, 열 충격 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, 벼 α -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, 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 마커 유전자의 예로는 아데노신 데아미나제의 유전자, 디히드로폴레이트 리덕타제의 유전자, 하이그로마이신-B-포스포트랜스퍼라제의 유전자, 티미딘 키나제

의 유전자, 크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제의 유전자, 포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자, 바스타 제초제 저항성 *bar* 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, 플로랄 딥(*floral dip*)을 이용한 *in planta* 형질전환 방법, 화분 매개 형질전환 방법, 원형질체의 형질전환 방법, 바이러스 매개 형질전환 방법, 리포좀 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 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 이용하는 데, 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 삽입된 유전자의 특성을 통해 선별하거나, 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있다. 삽입된 유전자의 특성으로는 식물체의 생체량 및/또는 종자의 생산성을 들 수 있다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 스트레스 내성 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 스트레스 내성을 갖는 식물체의 제조 방법은 (a) 식물체에서 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 과발현시키는 단계 및 (b) 스트레스 내성을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.

본 발명의 스트레스 내성을 갖는 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 상기 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조

방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

상기 (b) 단계는 삽입된 유전자의 특성인 식물체의 스트레스 내성을 비교하여 선별하거나(예컨대 잎의 황화 현상이나 괴사 현상의 진행 정도, 엽록소 함량, 광합성 효율 등을 이용하여 선별하는 방법임) 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 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 노화 지연 특성을 갖는 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.

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

상기 (b) 선별 단계는 형질전환된 식물체를 발육·성장시켜 삽입된 유전자의 특성인 노화 지연 특성을 이용하여 선별하거나(잎의 황화 현상이나 괴사 현상의 진행 정도, 엽록소 함량, 광합성 효율 등을 측정하는 방법, 상기 방법들을 혼합한 방법 등을 통해 선별하는 방법임), 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있다.

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.

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 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.

상기 방법들에서 상기 (a) 및 (b) 단계는 상기 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

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 ATPG6 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG6*이 식물체로 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 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG6 단백질을

암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG6*이 식물체로 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체이다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 노화 지연 특성을 갖는 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 *ATPG6* 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자로 식물체로 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

본 명세서에서, 상기 "형질전환 식물체"는 성숙한 식물로 발육·성장할 수 있는 상기 유전자가 도입되어 형질전환된 식물 세포, 식물 조직, 또는 식물 종자뿐만 아니라 상기 유전자가 도입되어 형질전환된 식물로부터 유래한 식물 세포, 식물 조직 또는 식물 종자를 포함한다.

【발명의 효과】

전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물의 생산성 증대 기능과 스트레스 내성 기능을 가지고 또한 노화 지연 기능을 가지는 *ATPG6* 단백질과 그 유전자를 제공할 수 있다. 상기 유전자는 식물의 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능과 노화 지연 기능을 제공하므로, 이 유전자로 식물체를 형질전환시킬 경우, 생산성을 증가시킬 뿐만 아니라 식물의 스트레스 내성 기능과 노화 지연 기능을 가지는 식물체를 제작할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 또한 노화 지연과 스트레스 내성 기능을 가지는 *ATPG6* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 2는 상기 도 1의 pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 발아 후 50일과 70일 동안 생육시킨 애기장대의 사진이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

ATPG6 ox-4: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질

전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG6 ox-5: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG6 ox-7: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대 T₂ 라인

도 3은 상기 도 2의 애기장대 변이체 라인 및 야생형의 생산성 지표 분석을 통한 생산성 증대에 대한 그림이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

ATPG6 ox-4: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG6 ox-5: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG6 ox-7: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대 T₂ 라인

Height: 키, NTS: 장각과 수, FW: 생체량, DW: 생체 건량, TSW: 총 종자 무게, TNS: 총 종자 수, 1,000SW: 1,000개의 종자 무게

도 4는 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*, 그리고 *ATPG6 ox-7*을 12일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어난 식물의 표현형적 변화를 도시한 그림이다.

Col: 애기장대 야생형

Con: 애기장대 대조구

ATPG6 ox-4: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG6 ox-5: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG6 ox-7: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대 T₂ 라인

도 5는 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*, 그리고 *ATPG6 ox-7*을 12일 동안 가뭄을 처리하고, 6일과 12일 동안에 일어난 식물 잎의 무게 변화를 도시한 그림이다.

도 6은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*, 그리고 *ATPG6 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 표현형 변화를 도시한 그림이다.

Col: 애기장대 야생형

Con: 애기장대 대조구

ATPG6 ox-4: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG6 ox-5: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG6 ox-7: pCSEN-*ATPG6* 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대 T₂ 라인

도 7은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*, 그리고 *ATPG6 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 엽록소 함량 변화를 도시한 그림이다.

도 8은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*, 그리고 *ATPG6 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 광합성 효율 변화를 Fv/Fm로 도시한 그림이다.

도 9는 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형 (Con)과 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*, 그리고 *ATPG6 ox-7*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 10은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형 (Con)과 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*, 그리고 *ATPG6 ox-7*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 11는 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형 (Con)과 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*, 그리고 *ATPG6 ox-7*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

도 12는 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con)과 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*, 그리고 *ATPG6 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 10일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 13은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con)과 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*, 그리고 *ATPG6 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 10일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 14는 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con)과 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*, 그리고 *ATPG6 ox-7*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하

여 매 2일마다 10일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

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

<실시예 1> 애기장대로부터 식물의 생산성 증대와 스트레스 내성을 제공하고 또한 노화 지연을 조절하는 *ATPG6* 유전자의 분리

식물의 생산성 증대와 스트레스 내성 기능을 가지고 노화 지연 기능을 가지는 *ATPG6* 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 펠트리 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 생산성 증대와 스트레스 내성 기능을 가지고 또한 노화 지연 기능을 가지는 *ATPG6* 유전자 분리

애기장대의 AHL22 (AT-hook motif nuclear-localized protein 22, GeneBank accession number NP_182067.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머(*PacI*/2g45430 SOE-F, 5'-TTA ATT AAA TGG ATC AGG TCT CTC GCT CTC-3')와 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머

(XbaI/At2g45430 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA GAA AGA TGG TCT CGG AGT 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 33.5 kDa의 분자량을 갖는 317개의 아미노산을 암호화하는 954bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG6*(AT-hook protein of Genome 6)으로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 ATPG6 단백질의 등전점(isoelectric point)은 6.97로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "*ATPG6*" 혹은 "*ATPG6* 유전자"라 하고, 단백질은 "ATPG6" 혹은 "ATPG6 단백질"이라고 한다).

<실시예 2> *ATPG6* 유전자에 대한 센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 특성 분석

<실시예 2-1> *ATPG6* 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

상기 유전자가 식물의 생산성 증대와 스트레스 내성 기능을 가지고 또한 노화 지연 기능을 가지는지를 확인하기 위하여, 먼저 *ATPG6* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG6* 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 *ATPG6* 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 *ATPG6* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-ATPG6 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

한편, 도 1은 pCSEN 벡터에 *ATPG6* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-ATPG6 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 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.

상기 pCSEN-ATPG6 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션(electroporation) 방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28°C에서 O.D.600 값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25°C에서 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 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 *ATPG6* 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-ATPG6 벡터로 형질전환된 T1 애기장대는 대조군(*ATPG6* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 변이체들은 뚜렷한 개체 크기 및 종자 수확량 증가와 같은 생산성 증대와 노화 지연 특성을 보였다.

이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T1 형질전환 애기장대로부터 T2 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현

형을 조사하였다. 우선, 3일 동안 저온 처리(4℃)한 T2 형질전환 종자를 화분에서 재배한 후 바스타 제초제 처리를 통하여 T2 형질전환 애기장대를 선별하였다.

선별된 애기장대 T2 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(도 2).

pCSEN-ATPG6 구성체를 가지고 있는 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 생산성 증대 현상이 뚜렷하게 나타났으며 흥미로운 점은 이들 변이체들은 야생형에 비하여 50일째와 70일째 모두 개체 크기 증가 및 장각과 형성과 종자 생산량 증가 등의 생산성 증대에 대한 뚜렷한 표현형적 특징을 나타내었다. 한편 이들 변이체 모두 노화 지연의 표현형적 특징이 70일째 명확하게 나타났으며, 이러한 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특징은 라인마다 조금의 차이를 가지고 있었다. 이러한 차이는 아마 변이체 라인별로 유전자의 과발현 정도 차이에 기인하는 것으로 추측되며, 이러한 유전자 발현 정도의 차이에 의한 표현형적 특징은 앞서 출원한 AT-hook 도메인을 가지는 *ATPG4* 유전자의 특성과 같을 것으로 추측된다(이동희 등, PCT 특허출원 PCT/KR2012/008798, 2012).

<실시예 3> *ATPG6* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석

ATPG6 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체의 생산성 증대에 대한 특성을 확인하기 위하여 변이체 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 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.

ATPG6 ox-4, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 종자 생산이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5* 변이체 라인들은 종자 생산량이 200% 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 종

자 생산의 증가는 조금은 차이가 있으나 변이체의 장각과 생산 증가와 비례하는 것으로 보아 본 유전자가 장각과 형성을 촉진함으로써 종자 생산량 증가를 제공하는 것으로 사료된다. 한편 종자 1,000개의 무게에서 변이체 전체는 대조구에 비하여 큰 변이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자의 발현은 종자의 개체 크기가 아닌 전체 무게의 증가에 영향을 미치는 것으로 판단되며, 이러한 형질은 본 유전자가 화기 형성을 촉진하여 전체 장각과 형성의 증가를 유도하여 결과적으로 전체 종자 무게의 증가를 유발하는 것으로 판단된다. 그리고 생체량과 생체 건량에 있어서도 과발현 변이체는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상을 가졌다. 흥미로운 사실은 이들 변이체 모두 생체량에 비하여 생체건량에 있어서 엄청난 증가 현상은 가진다는 것이다. 이러한 사실로 미루어 보아 본 유전자 발현은 생체건량 증가와 같은 바이오매스 증대에 효과가 있음을 시사한다. 상기의 내용을 종합해보면 *ATPG6* 유전자가 종자 생산량 증가와 더불어 생체량/생체건량 증가와 같은 바이오매스 증가와 같은 작물의 생산성 증대를 유발하며(도 3), 한편 이러한 과발현 변이체의 라인별 생산성 증대에 대한 차이는 라인별로 *ATPG6* 유전자의 발현 정도의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 타 작물에 대한 적용은 생산성 증대라는 측면에서 효용 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

또한 흥미로운 사실은 생산성 증대 특정 형질을 가지는 변이체 라인들의 수확 시기는 애기장대 대조구와 큰 차이가 없다는 것이다. 이러한 사실은 본 유전자의 과발현 조절로 인한 생산성 증대는 대조구의 수확시기가 비슷하여 작물의 수확시기에 대한 문제점을 최소화할 수 있다는 것이다. 이러한 결과를 종합해보면, *ATPG6* 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. 이러한 유전자 발현 정도의 차이에 의한 생산성 증대의 농

업 형질 특징은 앞서 발표한 AT-hook 도메인을 가지는 *ATPG4* 유전자의 특성과 같을 것으로 추측된다(이동희 등, PCT 특허출원 PCT/KR2012/008798, 2012).

<실시예 4> *ATPG6* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석

<실시예 5-1> *ATPG6* 과발현 변이체의 가뭄 스트레스에 대한 특성 분석

ATPG6 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일 된 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 도 4와 5에 도시되었으며, 제시된 값은 라인별로 각 6개체 이상의 평균값±표준편차이다. 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 *ATPG6* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 특히 *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7* 변이체 라인들은 *ATPG6 ox-2* 변이체 라인에 비하여 훨씬 높은 가뭄 스트레스 저항성을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 *ATPG6* 유전자의 높은 발현은 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 유도한다는 것을 의미한다.

<실시예 5-2> *ATPG6* 과발현 변이체의 H₂O₂ 스트레스에 대한 특성 분석

ATPG6 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H₂O₂를 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 라인별로 각 6개체 이상을 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 측정

은 오 등의 방법(Plant Mol. Biol. 30:939, 1996)에 따랐다.

구체적으로 각 DAE(day after emersion)의 잎을 15분간 암 처리한 후, 식물 효율 분석기(Plant Efficiency Analyzer)(Hansatech)를 이용하여 엽록소의 형광을 측정하였고, 광합성 효율은 엽록소의 형광도 특성을 이용한 PS II (photosystem II)의 광화학적 효율(photochemical efficiency)로 나타내었는데, 형광도 최대치(maximum value of fluorescence; Fm)에 대한 최대 변형 형광도(maximum variable fluorescence; Fv)의 비율(Fv/Fm)로 나타내었다. 상기 수치가 높을수록 광합성 효율이 우수함을 나타낸다.

그 결과 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG6* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소, 특히 엽록소 함량의 감소가 지연됨을 확인할 수 있었다(도 6, 7과 8). 이러한 사실은 *ATPG6*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

따라서 *ATPG6* 유전자는 식물의 생산성 증대뿐만 아니라 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성도 제공하여 스트레스 저항성을 가진 생산성 증대 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

<실시예 5> *ATPG6* 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석

<실시예 5-1> *ATPG6* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 잎의 표현형적 변화

ATPG6 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, 잎 엽록소 함량, 광합성 활성, 그리고 노화 관련 유전자의 발현율을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 라인별로 각 6개체 이상에서 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 24일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후

부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일 이후부터 일어남을 확인할 수 있었다(도 9). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG6* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 그리고 *ATPG6 ox-7* 변이체는 *ATPG6 ox-4*와 *ATPG6 ox-5* 변이체에 비하여 노화지연의 표현형질이 좀 더 뚜렷함을 알 수 있었다. 이러한 사실은 약간의 차이점이 있지만 본 유전자의 발현이 높으면 높을수록 노화 지연의 표현 형질이 강력해짐을 시사한다고 할 수 있다.

<실시에 5-2> *ATPG6* 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 전술한 바와 같이 663.2 nm와 664.8 nm의 흡광 계수를 이용하여 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(Biochemical Society Transduction 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였다. 그 결과도 10에 도시되었으며, 제시된 값은 라인별로 각 6개체 이상의 평균값±표준편차이다. 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 20일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 최저치로 떨어졌으나, *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7*의 경우 자엽 생성 후 32일이 되었을 때도 측정 초기의 60% 이상의 엽록소 함량을 보이며, 그 후 엽록소 함량의 감소가 급격히 일어남을 확인할 수 있었다. 또한 변이체 라인들의 엽록소 함량 변화를 비교해 보았을 때, 앞의 표현형 분석에서와 마찬가지로 *ATPG6 ox-4*와 *ATPG6 ox-7* 변이체들은 *ATPG6 ox-5* 변이체에 비하여 엽록소 함량 감소의 지연에 대한 표현형질이 약간 뚜렷함을 알 수 있었다. 그러나 전체적인 경향을 보면 모든 변이체들은 야생형에 비하여 엽록소 함량 감소의 지연 효과가 강력했으며, 변이체간의 지연 효과는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

<실시에 5-3> *ATPG6* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 광합성 효율 변화

광합성 효율의 측정은 전술한 바의 오 등의 방법(Plant Mol. Biol. 30:939, 1996)을 이용하여 측정하였다.

결과를 도 11에 도시하였으며, 제시된 값은 라인별로 각 6개체 이상의 평균값±표준편차이다. 야생종은 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격히 감소하

기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7*의 경우 자엽 생성 후 36일에도 광합성 효율이 초기의 90%를 유지하고 있었다. 이러한 광합성 효율의 감소 지연도 앞선 엽록소 함량에서와 마찬가지로 *ATPG6 ox-4*와 *ATPG6 ox-7* 변이체들은 *ATPG6 ox-5* 변이체에 비하여 보다 뚜렷한 표현형을 보였다. 그러나 전체적인 경향을 보면 모든 변이체들은 야생형에 비하여 광합성 효율 감소의 지연 효과가 강력했으며, 변이체간의 지연 효과는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 상기 결과로부터, *ATPG6* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG6* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

<실시에 5-4> *ATPG6* 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG6* 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 유지하며 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량 및 광합성 효율을 상기 <실시에 5-1 내지 5-3>와 동일한 방법으로 각 변이체 라인별로 6개체 이상을 대상으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 6일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG6 ox-4*, *ATPG6 ox-5*와 *ATPG6 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 보여지며(도 12), 암 처리에 의한 노화 동안 엽록소 함량과 광합성 효율 변화에 있어서도 야생종에 비하여 *ATPG6* 변이체들은 정도의 차이는 있지만 함량 및 활성 감소가 지연됨을 알 수 있었다(도 13과 14).

상기의 실시예를 종합해보면 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다. *ATPG6* 유전자의 과발현은 식물의 개체 크기 증가, 생체량/생체건량 증가, 종자 수확

량과 같은 생산성 증대라는 농업 형질을 제공하며, 또한 가뭄 혹은 산화 스트레스에 대한 저항성 제공과 더불어 노화 지연이라는 형질을 제공한다. 이러한 형질 제공은 *ATPG6* 유전자의 과발현 정도에 따라 기인하는 것으로 추측된다. *ATPG6* 유전자의 적정 수준에서의 과발현은 개체 크기 증가, 생체량/생체건량 증가, 종자 수확량과 같은 생산성 증대라는 농업형질 제공에 보다 효과적일 것이다. 따라서 본 유전자의 발현을 조절할 수 있는 프로모터(비교적 발현이 낮은 프로모터, 유도성 프로모터, 기관 혹은 화합물 특이적 프로모터 등)를 적용하면 야생형과 동일한 시기의 수확량 증가를 가지는 생산성 증대 작물 개발에 많은 장점을 제공하리라 판단된다. 한편 *ATPG6* 유전자는 노화 지연 및 스트레스 저항성에 대한 형질도 강력하게 나타나는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 적절한 발현 조절은 작물의 생산성 증대와 더불어 스트레스 저항성을 제공하여 다수안정성 작물 개발에 많은 장점을 제공할 뿐만 아니라 작물의 노화 지연 기능을 제공하여 생산성 증대 및 녹기 연장 형질을 요구하는 작물의 개발에도 많은 장점을 제공하리라 판단된다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 2에 개시된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 갖고, 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 *ATPG6* 단백질.

【청구항 2】

제1항의 단백질을 암호화하는 *ATPG6* 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) 생산성 증대 특성을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하

는 유전자인 것을 특징으로 하는 생산성 증대 특성을 갖는 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) 스트레스 내성 특성을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 스트레스 내성 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 스트레스 내성 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 7】

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

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 9】

- (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 10】

- (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 11】

(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 12】

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

【청구항 13】

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

【청구항 14】

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

【요약서】

【요약】

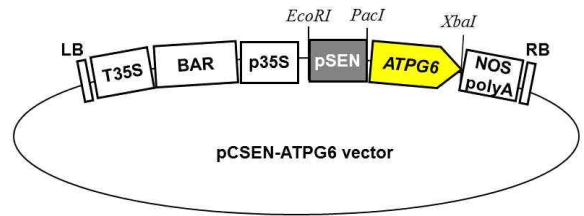
본 발명은 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG6 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도를 개시한다. 상기 유전자가 도입되어 과발현된 식물체는 생산성이 증대되는 특성을 가질 뿐만 아니라 스트레스 내성 특성과 노화 지연 특성도 가진다.

【대표도】

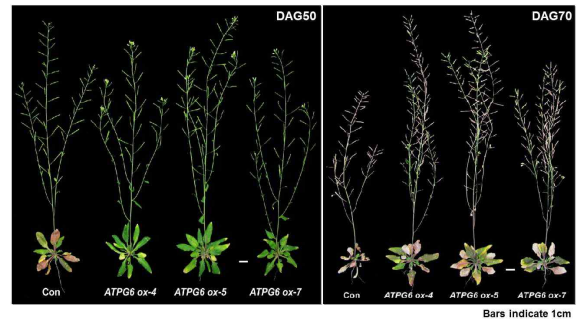
도 2

【도면】

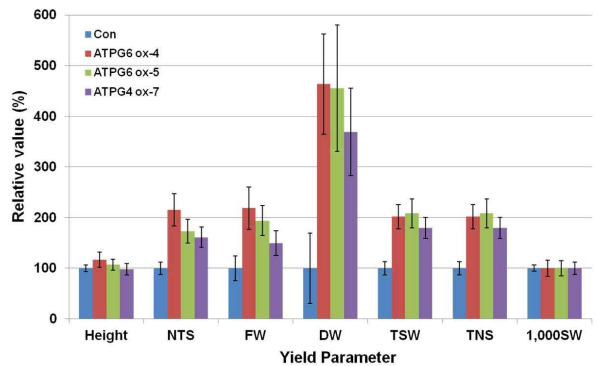
【도 1】



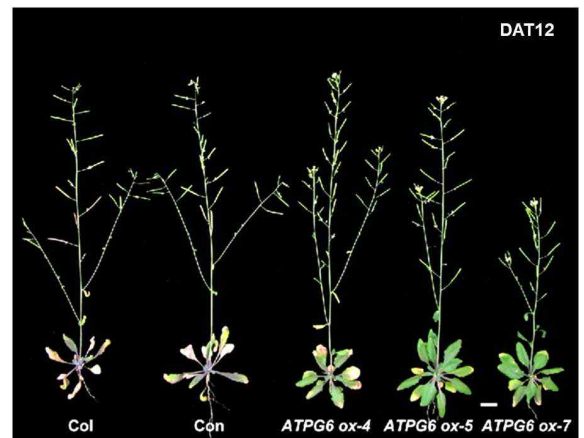
【도 2】



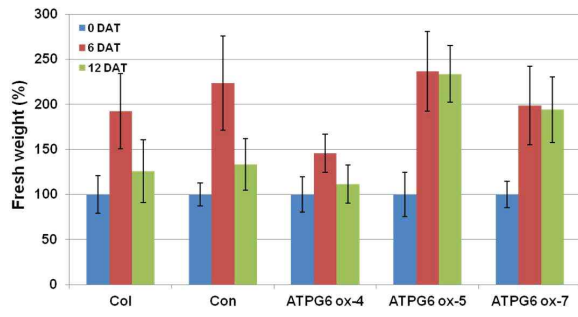
【도 3】



【도 4】



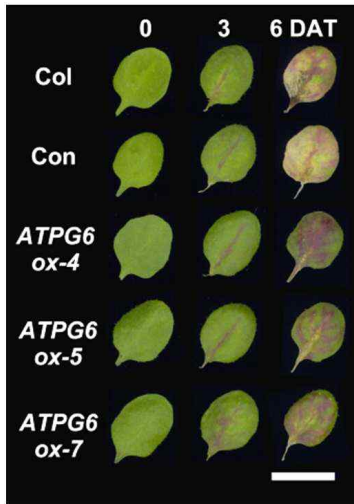
【도 5】



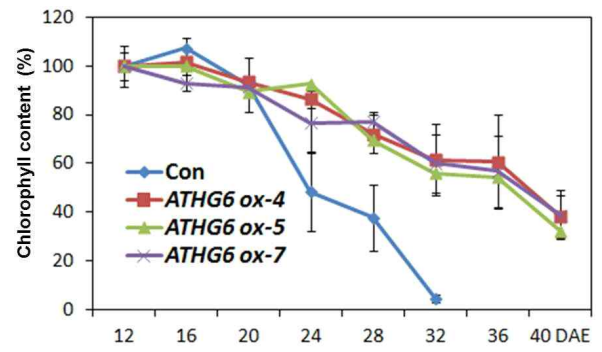
【도 9】



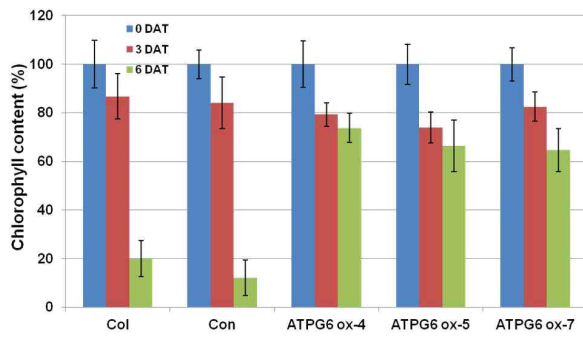
【도 6】



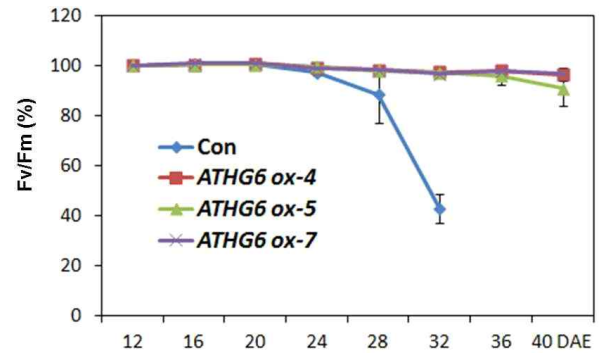
【도 10】



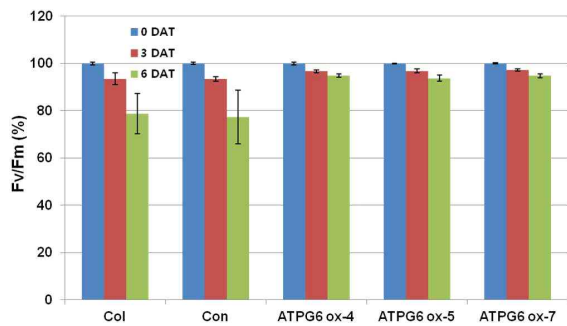
【도 7】



【도 11】



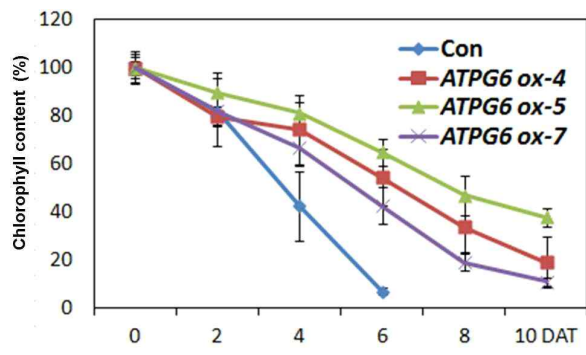
【도 8】



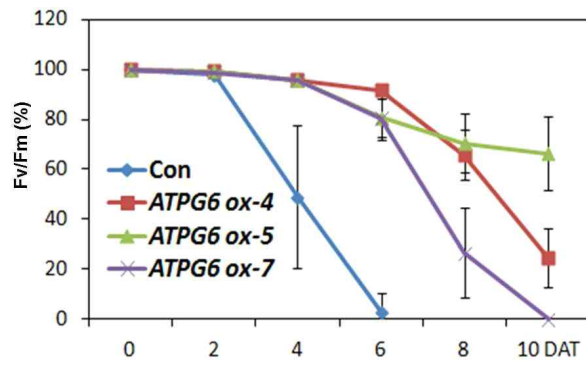
【도 12】



【도 13】



【도 14】



[부록 3] 특허출원 (PCT/KR2012/002966)

【명세서】

【발명의 명칭】

식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도{ATPG7 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 ATPG7 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, 생장 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 생장 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 보고 되고 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 GmSARK의 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 증가시킬 수 있었으며, 또한 콩(Guamett 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 ATPG7 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 ATPG7 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 194012.1)의 염기서열을 기초로 상기 단백질의 유전자를 분리하고 상기 유전자를 애기장대에 형질전환시켜 과발현시켰을 때, 식물의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타나고, 개체의 생체량 증가 및/또는 종자 생산성 증가라는 생산성 증대 특성도 뚜렷하게 나타나며, 이와 더불어 가뭄 스트레스 또는 산화적 스트레스에 대한 내성 특성도 뚜렷하게 나타남을 확인하였다.

이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이 식물체의 노화를 지연시키고 식물의 생산성을 증대시키며 스트레스에 대한 내성에 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

본 발명자들은 상기 유전자를 ATPG7(AT-hook protein of *Genomine 7*) 유전자 및 ATPG7 단백질로 명명하였으며, 이들 염기 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 및 2에 개시되어 있다.

본 발명의 ATPG7 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 포함된다라는 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 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 포함된다라는 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 것이 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·생장시킬 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 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 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, 옥토피 신타제(OCS) 프로모터, 열 충격 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, 벼 α -아밀라아제 RAmyl A 유전자의 전사 종결 서열, 아그로박테리움 투메파시엔스의 옥토파인(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, 포스핀노트리신 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(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 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 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 ATPG7 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 ATPG7 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG7*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 ATPG7 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG7*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 계승이 변형된 식물체, 식물 종자, 식물 세포를 포함한다.

【발명의 효과】

전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 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 *ATPG7* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 2는 상기 도 1의 pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₁ 식물을 발아 후 60일 동안 생육시킨 애기장대의 사진이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

AT7-4: pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₁ 식물

AT7-8: pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₁ 식물

도 3은 상기 도 1의 pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 자엽 생성 후 20일 동안생육시킨 애기장대의 *ATPG7* 유전자의 발현

양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

Wt: 애기장대 야생형

ATPG7 ox-4: pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG7 ox-5: pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG7 ox-6: pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 4는 애기장대 야생형의 다양한 식물 기관에서 *ATPG7* 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-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 발아 후 50일과 70일 동안 생육시킨 애기장대의 사진이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

ATPG7 ox-4: pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG7 ox-5: pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG7 ox-6: pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 6은 상기 도 4의 애기장대 라인의 생산성 증대에 대한 그림이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

ATPG7 ox-4: pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG7 ox-5: pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG7 ox-6: pCSEN-*ATPG7* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 7은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 8은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 9는 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con),

노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

도 10는 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, *ACT*을 PCR 양성 대조구로 사용하였다. *CAB2*은 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자이고, *SEN4* 및 *SAG12*는 노화 유전자로서, 노화 마커 유전자들이다.

도 11은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 12는 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 13은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

도 14는 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, *ACT*을 PCR 양성 대조구로 사용하였다. *CAB2*, *SEN4*, 그리고 *SAG12*는 노화 마커 유전자이다.

도 15는 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*을 12일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어난 식물의 표현형적 변화를 도시한 그림이다.

도 16은 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*을 12일 동안 가뭄을

처리하고, 그 동안에 일어난 식물의 잎 무게 변화를 도시한 그림이다.

도 17은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 표현형 변화를 도시한 그림이다.

도 18은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 엽록소 함량 변화를 도시한 그림이다.

도 19는 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6*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 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 애기장대로부터 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 유전자의 분리

식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG7* 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 생장 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 ATPG7 유전자분리

애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related, GeneBank accession number NP 194012.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머(*PacI*/AT4G22810 SOE-F, 5'-TTA ATT AAA TGG ATC CAG TAC AAT CTC ATG G -3')와, 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*XbaI*/AT4G22810 SOE-R, 5'-TCT AGA TCA ATA CGG TGG TCG TCC CGT -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 34.3 kDa의 분자량을 갖는 324개의 아미노산을 암호화하는 975bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG7*(AT-hook protein of *Genomine 7*)로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 *ATPG7* 단백질의 등전점(isoelectric point)은 6.8로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "*ATPG7*" 혹은 "*ATPG7* 유전자"라 하고, 단백질은 "*ATPG7*" 혹은 "*ATPG7* 단백질"이라고 한다).

<실시예 2> ATPG7 유전자에 대한 센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 노화에 대한 특성 분석

<실시예 2-1> ATPG7 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

상기 유전자가 식물의 노화 지연 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *ATPG7* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG7* 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 *ATPG7* 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 *ATPG7* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG7* 재조합

백터를 제작하였다. 상기 *SENI* 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

한편, 도 1은 pCSEN 백터에 *ATPG7* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG7* 재조합 백터를 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 *SENI* 프로모터, Nos-A는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를 가리킨다.

상기 pCSEN-*ATPG7* 재조합 백터를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*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 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. 대조군으로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *ATPG7* 유전자가 포함되지 않은 백터(pCSEN 백터)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-*ATPG7* 백터로 형질전환된 T₁ 애기장대 *AT7-4* 및 *AT7-8*은 대조군(*ATPG7* 유전자가 포함되지 않은 백터(pCSEN 백터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 발아 후 60째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 *AT7-4* 및 *AT7-8* 변이체들은 뚜렷한 노화 지연 특성을 보였으며, 형질전환 개체에서

이러한 노화 지연 특성의 정도 차이는 유전자의 과발현이 개체마다 다르게 나타남에 기인하는 것으로 판단된다(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°C)한 T₂ 형질전환 종자를 화분에서 재배한 후 바스타 제초제 처리를 통하여 형질전환 애기장대를 선별하였다.

선별된 노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 *ATPG7* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6* 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, 합성된cDNA를 주형으로 하고, 하기 *ATPG7* 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 반복수행한 다음, 72°C에서 15분간 최종 반응시켜 수행하였다. 이후, 1% 아가로스 겔 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였으며, 그 결과는 도 3에 도시되었다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6* 변이체의 *ATPG7* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG7* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

【표 1】

ATPG7 유전자와 *ACT* 유전자 발현을 위한 프라이머 서열 및 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	<i>ATPG7</i>	TGCAACATCAGCAACAAGCTATG (서열번호 5)/ GCTGCAACTGAACCGAACCA (서열번호 6)
2	<i>ACT</i>	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAACCAGCCTTC (서열번호 8)

한편 애기장대 야생형의 *ATPG7* 유전자의 식물체 기관별 발현 양상을 분석하기 위하여 애기장대

야생형의 다양한 발달 단계에서 기관별 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 이를 주형으로 하여 *ATPG7* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과는 도 4에서 도시된 바와 같이, *ATPG7* 유전자의 발현은 주로 줄기에서 이루어지는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 노화 과정이 진행되는 잎과 어린 잎에서도 발현이 이루어짐을 알 수 있었다. 그런 반면, 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-*ATPG7* 구성체를 가지고 있는 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6* 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 라인 마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 도 3에서 나타나듯이 유전자의 과발현이 라인 마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 흥미로운 사실은 노화 지연 형질이 강력한 *ATPG7 ox-5*는 생산성 증대에 있어서 큰 표현형적 차이를 못 가지는 반면, 노화 지연 형질이 강하지 않는 *ATPG7 ox-4*는 생산성 증대에 있어서 대조군에 비하여 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> *ATPG7* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석

ATPG7 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6*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(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.

ATPG7 ox-4, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 1.5배 이상 종자 무게 및 종자 수에 있어서 증가하는 것으로 나타났으며, 종자 1,000개의 무게에는 대조구와 큰 차이가 없었다. 그리고 생체량과 생체건량에 있어서는 과발현 변이체는 대조구에 비하여 약 2.8배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 사실은 *ATPG7* 유전자가 노화 지연과 더불어 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다(도 6). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

<실시예 4> *ATPG7* 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석

ATPG7 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 4-1> *ATPG7* 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 급격하게 나타났으며 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6*의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(도 7). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG7* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다.

<실시예 4-2> *ATPG7* 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 8에 도시된 바와 같이, 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 20일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6*의 경우 자엽 생성 후 36일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다.

<실시예 4-3> ATPG7 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; Fm)에 대한 최대 변형 형광도(maximum variable fluorescence; Fv)의 비율(Fv/Fm)로 나타내었다. 상기 수치가 높을수록 광합성 효율이 우수함을 나타낸다.

그 결과, 도 9에 도시된 바와 같이, 야생종은 자엽 생성 후 28일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6*의 경우 자엽 생성 후 36일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않다가 40일째 라인에 따라 정도의 차이는 있지만 약 20% 범위까지 활성 소실이 일어났다. 상기 결과로부터, *ATPG7* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG7* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

<실시예 4-4> ATPG7 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 노화 관련 유전자의 발현 변화

야생종과 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6* 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG7* 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.

ATPG7 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 대조구조로는 *ACT* 유전자를 사용하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 2에서 제시하였다.

【표 2】

노화관련 유전자의 발현을 위한 프라이머 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	CAB2	CCGAGGACTTGCTTTACCCC (서열번호 9)/ ACTCAGCGAAGGCCTCTGG (서열번호 10)
2	SEN4	CGTCGATGACACACCATTAGAG(서열번호 11)/ CATCGGCTTGTTCTTTGGAAAC(서열번호 12)
3	SAG12	ACGATTTTGCTGCGAAGG (서열번호 13)/ TCAGTTGTCAAGCCGCCAG (서열번호 14)
4	ACT	ATGGCCGATGGTGAGGATATC (서열번호 7)/ CACCAGCAAAACCAGCCTTC (서열번호 8)
5	ATPG7	TGCAACATCAGCAACAAGCTATG (서열번호 5)/ GCTGCAACTGAACCGAACCA (서열번호 6)

야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였다. 그러나 *ATPG7* 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, *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*, 그리고 *ATPG7 ox-6* 변이체 모두는 *SEN4*와 *SAG12*의 발현이 자엽 생성 후 36일째까지 변화가 없는 것으로 나타났다. 한편 *ATPG7* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 전체적으로 *ATPG7* 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 발현 수준이 현저히 높으며 노화 동안 라인별로 정도의 차이는 있지만 점진적으로 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(도 10). 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG7* 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> *ATPG7* 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG7* 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 상기 <실시예4-1 내지 4-4>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 *ATPG7* *ox-4*, *ATPG7* *ox-5*와 *ATPG7* *ox-6*의 경우 잎의 황화 현상이 12일 이후부터 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(도 11). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암 처리 6일 이후 급격한 감소를 보여 암 처리하지 않은 상태의 약 10% 정도의 수치를 나타냈으나, *ATPG7* *ox-5*, *ATPG7* *ox-5*와 *ATPG7* *ox-6*의 경우, 대부분 6일째에도 80% 정도의 엽록소 함량을 나타냈다(도 12). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 *ATPG7* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(도 13).

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 14에 도시된 바와 같이, 야생형이 암 처리 후 4일째 *SAG12*의 발현이 현저히 증가하고 8일째 *SEN4*의 발현이 현저히 증가하는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 전 기간 동안 *SAG12*의 발현이 나타나지 않았으며 *SEN4*의 발현은 6일째 잠시 증가하였으나 그 증가도가 야생형에 비하여 현저히 낮음을 알 수 있었다. 한편 *ATPG7* 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 *ATPG7* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를

지연시키는 것으로 판단된다.

<실시예 5> *ATPG7* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석

<실시예 5-1> *ATPG7* 과발현 변이체의 가뭄 스트레스에 대한 특성 분석

ATPG7 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 도 15와 16에 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 *ATPG7* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG7*이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

<실시예 5-2> *ATPG7* 과발현 변이체의 H₂O₂ 스트레스에 대한 특성 분석

ATPG7 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H₂O₂을 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 2일 간격으로 6일 동안 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG7* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소에 있어서도 지연됨을 확인할 수 있었다(도 17, 18과 19). 이러한 사실은 *ATPG7*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다. 따라서 *ATPG7* 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 ATPG7 단백질.

【청구항 2】

제1항의 단백질을 암호화하는 *ATPG7* 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 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 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 조절 서열에 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 조절 서열에 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 조절 서열에 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】

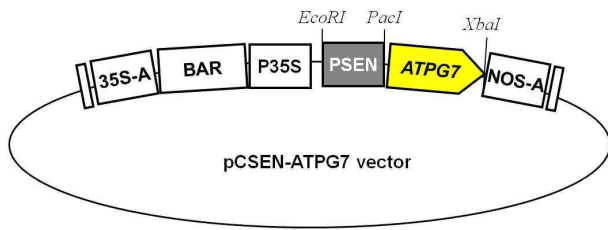
본 발명은 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도를 개시한다. 상기 형질전환되어 과별현된 식물체는 생산성이 증대되는 특성을 보일 뿐만 아니라 노화 지연 특성과 스트레스 내성 특성도 보인다.

【대표도】

도 1

【도면】

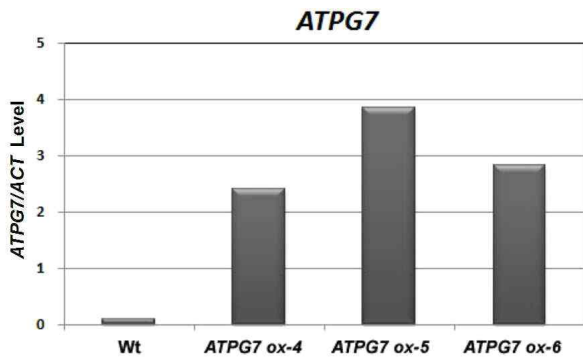
【도 1】



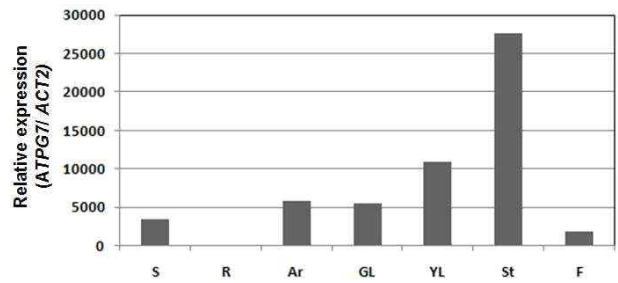
【도 2】



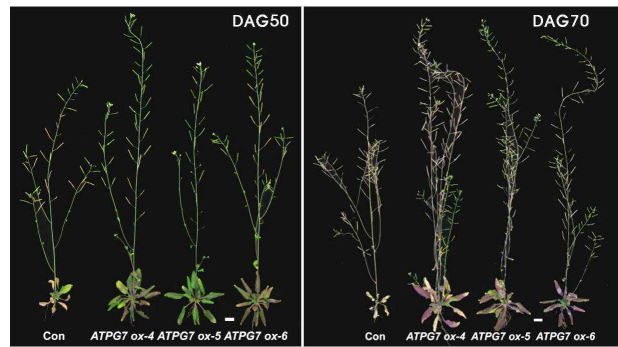
【도 3】



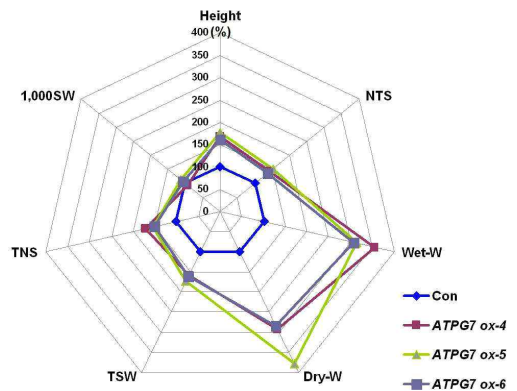
【도 4】



【도 5】



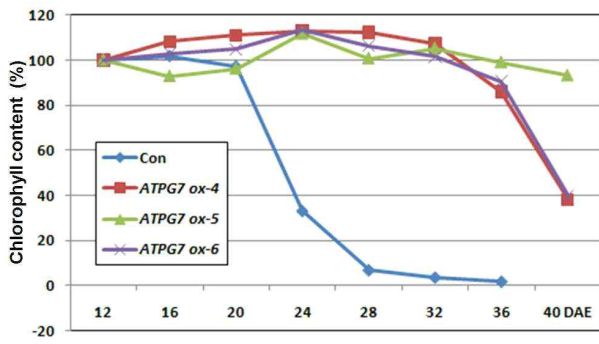
【도 6】



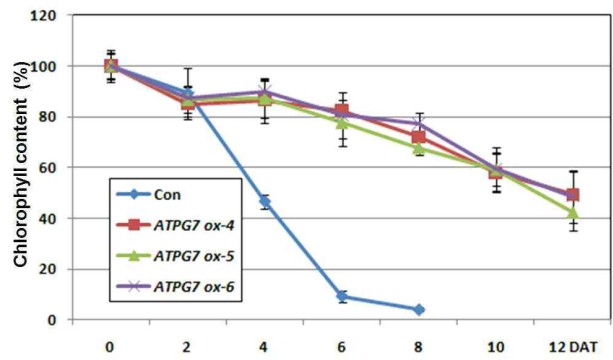
【도 7】



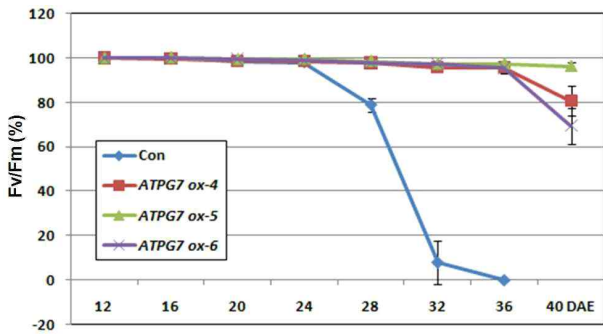
【도 8】



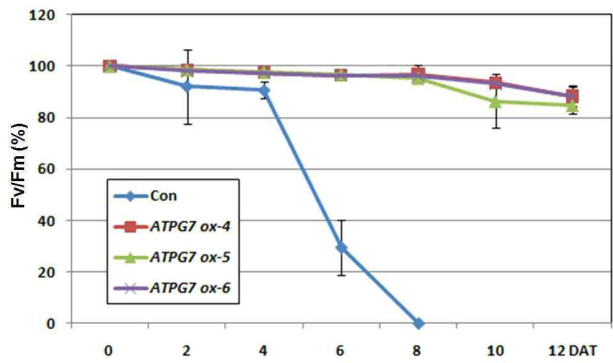
【도 12】



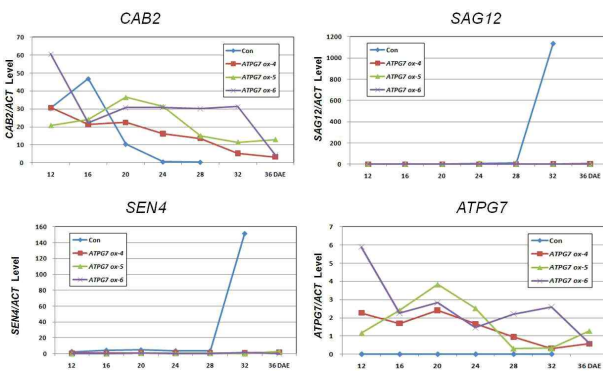
【도 9】



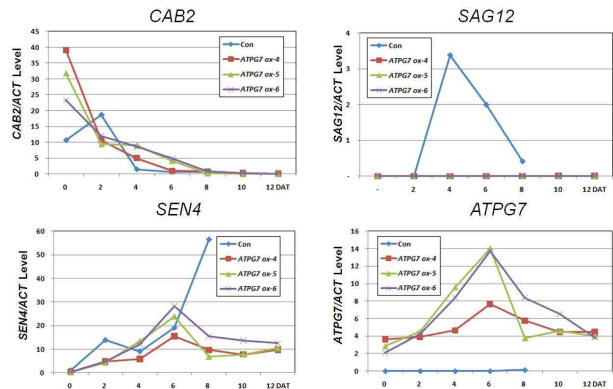
【도 13】



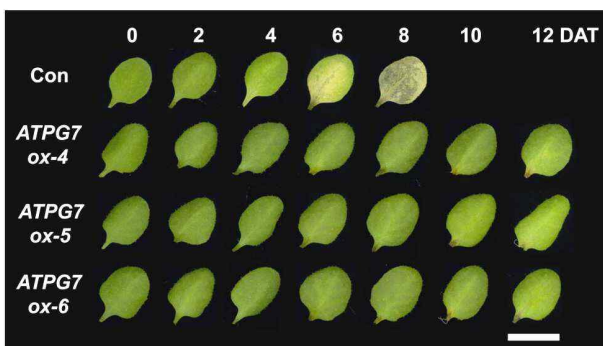
【도 10】



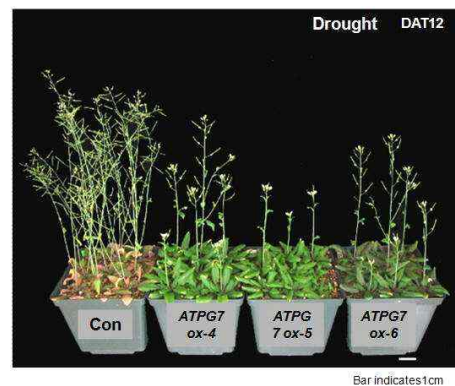
【도 14】



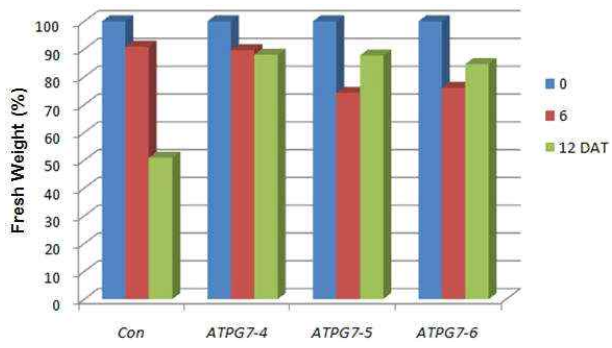
【도 11】



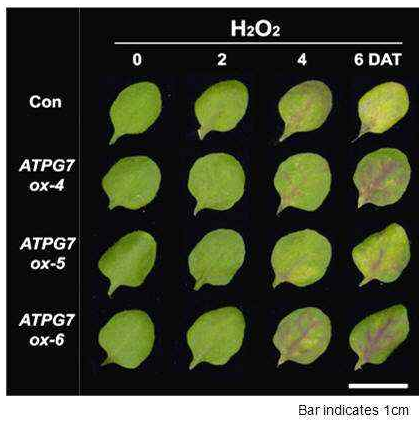
【도 15】



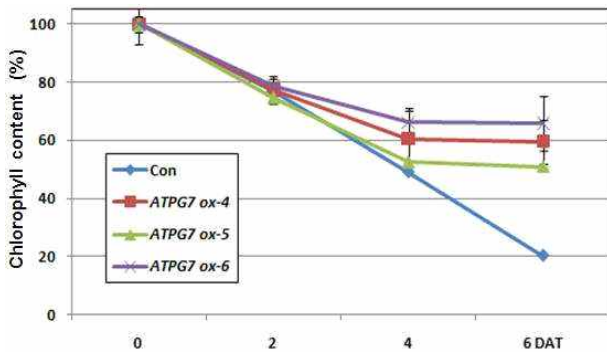
【도 16】



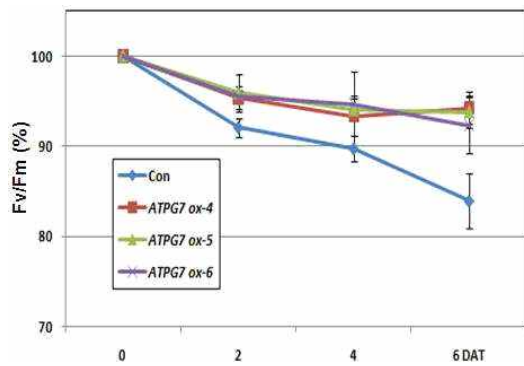
【도 17】



【도 18】



【도 19】



[부록 4] 특허출원 (10-2013-0075022)

【명세서】

【발명의 명칭】

식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG10 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도{ATPG10 Protein Providing Yield Increase and Stress Tolerance as well as Delaying Senescence in Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Uses}

【기술분야】

본 발명은 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG10 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

식물의 노화(plant senescence)는 식물의 생애 주기(lifecycle) 중 주요한 단계로 여겨지며, 유전적으로 조절된 반응들을 통하여 세포, 조직, 기관 및 개체 수준에서 매우 정교하게 연계되어 진행된다. 노화 과정의 진행은 식물체의 여러 기관에서 다르게 일어날 수 있는데 잎의 경우 엽록체의 분해에 이어서 지질, 단백질, 핵산의 분해가 순차적으로 일어난다. 세포막과 세포 내 구획 등의 세포 구조물은 마지막까지 유지되며 분해된 산물인 질소와 영양분의 재배치가 일어난 후 죽음에 이르게 된다(Lohman et al., *Physiologia Plantarum*, 1994, 92:322-8.; Smart, *New Phytologist*, 1994, 126:419-48; Pruzinska et al., *Plant Physiology*, 2005, 139:52-63). 식물체가 노화를 결정하는 시기는 영양분의 보유상태나 재배치와 연관이 있기 때문에 개화나 종자의 생산은 종종 노화를 촉진하는 요인이 된다. 또한 식물체는 계절적인 변화나 예측하지 못했던 외부 환경 변화에 대한 종 전체의 생존 전략으로도 노화 과정을 진행시킨다.

식물에서 유용물질을 얻기 위하여 재배를 할 경우, 유용물질 생산에 사용 가능한 식물의 양과 시기가 한정적이며 기후 풍토 등의 외부 인자에 의한 영향에 민감하게 반응하여 식물이 노화 및 죽음에 이르는 문제점이 있기 때문에 식물의 노화에 대한 연구는 생물학적인 측면에서 생명 현상의 이해를 위해서뿐만 아니라 생산성, 저장성, 수송성 등의 증진을 통한 경제적 이윤 창출 측면에서도 매우 중요하다.

노화 과정은 여러 유전자의 발현 변화에 따라 진행되는데 광합성과 기초 대사 관련 유전자의 발현은 감소하며 세포사멸, 스트레스 반응 유전자, 가수분해 효소 관련 유전자의 발현은 증가하게 된다(Hopkins et al.,

New Phytologist, 2007, 175:201-14; Lim et al., *Annual Review of Plant Biology*, 2007, 58:115-136). 이러한 식물의 노화 관련 유전자(Senescence Associated Genes, SAGs)에 대한 연구는 학문적, 산업적 측면에서의 중요성 때문에 활발히 이루어지고 있다.

아실-가수분해효소 활성(acyl hydrolase activity)을 지니는 *SAG101* 유전자의 antisense 서열을 식물체에 도입시켜 노화를 지연시키는 기술(He and Gan, *Plant Cell*, 2002, 14(4):805-15)과 같이 직접적으로 노화 촉진 유전자의 발현을 저해하는 방법이 개발되었으며 노화 진행 시기 동안 노화를 저해하는 유전자를 과발현하는 방법도 개발되었다. 미국 등록특허 제 5689042호에는 *SAG12* 나 *SAG13* 유전자의 promoter에 cytokinin 합성 관련 유전자를 결합시켜 노화를 지연시키는 방법이 개시되어 있는데 *SAG12* 유전자의 promoter에 *IPT* 유전자를 재조합 할 경우 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., *Plant Physiol.* 2001, 127(2):505-16). 또한 *SAG12* promoter에 옥수수의 homeobox gene(knotted1)을 발현시킨 담배에서 cytokinin의 level이 증가하고 잎의 노화도 지연되었다는 보고가 있었다(Naomi et al., *Plant Cell*, 1999, 11:1073-1080).

토마토의 경우 ethylene 합성과정을 저해하여 과일의 숙성을 조절한 사례가 보고되어 있으며(Oeller et al., *Science*. 1991, 254(5030):437-9) 또한 세포벽 분해와 관련된 polygalacturonase 유전자의 발현을 억제시켜 토마토의 운송성과 저장성을 증가시킨 Flav-O-Savor의 경우가 대표적으로 상업화된 예가 될 수 있다(Giovannoni et al., 1989, *Plant Cell* 1(1):53-63).

또한 노화 진행시 과발현되는 유전자로서 *GmSARK* 유전자와 NAC family에 속하는 *WRKY53*, *WRKY6* 및 *AtNAP* 유전자 등이 보고되었으며(Miao et al., *Plant Mol. Biol.* 2004, 55:853-867; Guo and Gan et al., *Plant J.* 2006, 46(4):601-12; Li et al., *Plant Mol Biol.* 2006, 61:829-844; Besseau et al., *J Exp Bot* 2012, 63(7):2667-79) *CBF2*, *CBF3*와 같은 유전자들은 노화를 억제시키는 것으로 알려졌다(Sobieszczuk-Nowicka et al., *Physiol Plant* 2007;130:590-600). 이들 유전자의 발현 조절은 노화를 지연시켜 결과적으로 작물의 생산성 등의 향상을 가져올 수 있다. 미국등록특허 제 8420890호에는 *AtNAP* 유전자의 발현 억제를 통한 노화의 지연 방법이 개시되어 있는데 최근에는 *AtNAP*를 과발현시켜

목화 등의 수확을 용이하게 하거나 과실의 빠른 성숙을 돕는데 이용하기 위한 연구도 진행되고 있다(Kou et al., J Exp Bot. 2012, 63(17):6139-47).

최근 담배의 생애 주기에 따른 유전자 발현 조사(Edwards et al., BMC Genomics. 2010, 11:142)를 통하여 Tobacco Expression Atlas (TobEA) 데이터베이스가 확보되었으며 식물의 노화와 생장 조절에 대한 유전자 연구는 더욱 가속화 되고 있다.

본 발명도 작물의 생산성 등의 향상을 가져올 수 있는 노화 지연 등의 기능을 가지는 유전자 등을 개시한다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명의 목적은 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 스트레스 내성 기능을 가지며 노화 지연 기능을 가지는 ATPG10 단백질을 제공하는 데 있다.

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

본 발명의 기타의 목적은 이하에서 제시될 것이다.

【과제의 해결 수단】

본 발명은 일 측면에 있어, 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 스트레스 내성 기능을 가지며 노화 지연 기능을 가지는 ATPG10 단백질에 관한 것이다.

본 발명자(들)는 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, 애기장대의 Predicted AT-hook DNA-binding family protein (GeneBank accession number NP_199781.1) 염기 서열을 기초로 상기 단백질의 유전자를 분리하고 상기 유전자를 애기장대에 형질전환시켜 과발현시켰을 때, 개체의 생체량 증가 및/또는 종자 생산성 증가라는 생산성 증대 특성이 뚜렷하게 나타나고, 가뭄 스트레스 또는 산화적 스트레스에 대한 내성 특성도 뚜렷하게 나타나며 이와 더불어 식물의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타남을 확인하였다.

이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이 식물의 생산성을 증대시키고 스트레스에 대한 내성을 제공하며, 또한 식물체의 노화를 지연시키는 데 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

본 발명자들은 상기 유전자를 *ATPG10*(AT-hook protein of *Genomine 10*) 유전자 및 ATPG10 단백질로 명명하였으며, 이들 염기 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 및 2에 개시되어 있다.

본 발명의 ATPG10 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 보유하기에 충분한 정도의 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로서 정의된다. 여전히 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 보유하기에 충분하면 되므로, 상기 폴리펩티드의 길이 그리고 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도는 문제 되지 않는다. 즉 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 활성이 낮더라도, 여전히 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 가지는 폴리펩티드라면 그 길이가 어떻게 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"에 포함된다는 것이다. 당업자라면, 즉 본 출원시를 기준으로 공지된 관련 선행기술을 숙지하고 있는 자라면, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 일부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 여전히 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 기

능을 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 보유하는 폴리펩티드를 말한다. 여기서도 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 식물의 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 보유하기만 한다면 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도나 아미노산이 치환된 정도는 문제되지 않는다. 바꿔 얘기해서, 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 서열번호 2의 아미

노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 그 활성이 아무리 낮더라도 또 많은 수의 치환된 아미노산을 포함하고 있다고 하더라도 그러한 폴리펩티드가 식물의 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 보유하기만 한다면 본 발명에 포함된다 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 기능을 지

니면서, 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 생산성 증대 및 스트레스 내성 기능, 그리고 식물 노화 지연 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, 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.

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 생산성 증대 특성 등

이 인간에게 유용한 결과를 줄 수 있는 모든 식물을 포함한다. 따라서 상기 식물의 의미에는 작물(구체적으로 식용작물, 사료작물, 공예작물 등의 농작물과 원예작물을 포함함), 임목, 관상식물을 포함된다. 구체적으로는 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, 과, 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 생산성 증대 특성 등을 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 생산성 증대 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 상위(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 상위에 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 카복실라제(ssRUBISCO)의 소 서브유니트에서 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, 옥토피 신타제(OCS) 프로모터, 열 충격 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, 벼 α -아밀라아제 RAmy1 A 유전자의 전사 종결 서열, 아그로박테리움 투메파시엔스의 옥토피인 (Octopine) 유전자의 전사 종결 서열, 밀 열 쇼크 단백질 17의 전사 종결 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, 포스핀노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자, 바스타 제초제 저항성 *bar* 유전자 등을 들 수 있다.

본 명세서에서, 상기 "형질전환"이란 왜래 유전자가 도

입됨에 의한 숙주 식물체의 유전자형의 변형을 의미하며, 그 형질전환에 사용된 방법과 상관없이 그 왜래 유전자가 숙주 식물체, 더 정확하게는 숙주 식물의 세포 내로 도입되어 세포의 계놈에 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, 프로라딕(floral dip)을 이용한 *in planta* 형질전환 방법, 화분 매개 형질전환 방법, 원형질체의 형질전환 방법, 바이러스 매개 형질전환 방법, 리포좀 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 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 삽입된 유전자의 특성을 통해 선별하거나, 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있다. 삽입된 유전자의 특성으로서는 식물체의 생체량 및/또는 종자의 생산성을 들 수 있다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 스트레스 내성 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

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

본 발명의 스트레스 내성을 갖는 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 상기 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

상기 (b) 단계는 삽입된 유전자의 특성인 식물체의 스트레스 내성을 비교하여 선별하거나(예컨대 잎의 황화 현상이나 괴사 현상의 진행 정도, 엽록소 함량, 광합성 효율 등을 이용하여 선별하는 방법임) 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 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 노화 지연 특성을 갖는 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.

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

상기 (b) 선별 단계는 형질전환된 식물체를 발육·성장시켜 삽입된 유전자의 특성인 노화 지연 특성을 이용하여 선별하거나(잎의 황화 현상이나 괴사 현상의 진행 정도, 엽록소 함량, 광합성 효율 등을 측정하는 방법, 상기 방법들을 혼합한 방법 등을 통해 선별하는 방법임), 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있다.

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.

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 연결

되도록 발현백터에 삽입시키고 (b) 그 발현백터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.

상기 방법들에서 상기 (a) 및 (b) 단계는 상기 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

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 ATPG10 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG10*이 식물체로 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 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG10 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG10*이 식물체로 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체이다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 노화 지연 특성을 갖는 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 ATPG10 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자로 식물체로 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

본 명세서에서, 상기 "형질전환 식물체"는 성숙한 식물로 발육·성장할 수 있는 상기 유전자가 도입되어 형질전환된 식물 세포, 식물 조직, 또는 식물 종자뿐만 아니라 상기 유전자가 도입되어 형질전환된 식물로부터 유래한 식물 세포, 식물 조직 또는 식물 종자를 포함한다.

【발명의 효과】

전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물의 생산성 증대 기능과 스트레스 내성 기능을 가지고 또한 노화 지연 기능을 가지는 ATPG10 단백질과 그 유전자를 제공할 수 있다. 상기 유전자는 식물의 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능과 노화 지연 기능을 제공하므로, 이 유전자로 식물체를 형질전환시킬 경우, 생산성을 증가시킬 뿐만 아니라 식물의 스트레스 내성 기능과 노화 지연 기능을 가지는 식물체를 제작할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 또한 노화 지연과 스트레스 내성 기능을 가지는 *ATPG10* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-ATPG10 재조합 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 2는 상기 도 1의 pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 발아 후 50일과 70일 동안 생육시킨 애기장대의 사진이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

ATPG10 ox-2: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG10 ox-4: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG10 ox-6: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 3은 상기 도 1의 pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 자엽 생성 후 24일 동안 생육시킨 애기장대의 *ATPG10* 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

Con: 애기장대 야생형

ATPG10 ox-2: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG10 ox-4: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG10 ox-6: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 4는 상기 도 3의 애기장대 라인의 생산성 증대에 대한 그림이다.

Con: 애기장대 야생형

ATPG10 ox-2: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG10 ox-4: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG10 ox-6: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

Height: 키, NTS: 장각과 수, FW: 생체량, DW: 생체 건량, TSW: 총 종자 무게, TNS: 총 종자 수, 1,000SW: 1,000개의 종자 무게

도 5는 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구 (Con)와 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*을 12일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어난 식물의 표현형적 변화를 도시한 그림이다.

Col: 애기장대 야생형

Con: 애기장대 대조구

ATPG10 ox-2: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG10 ox-4: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG10 ox-6: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 6은 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구 (Con)와 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*을 12일 동안 가뭄을 처리하고, 6일과 12일 동안에 일어난 식물 잎의 무게 변화를 도시한 그림이다.

도 7은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구 (Con)와 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 표현형 변화를 도시한 그림이다.

Col: 애기장대 야생형

Con: 애기장대 대조구

ATPG10 ox-2: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG10 ox-4: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATPG10 ox-6: pCSEN-ATPG10 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 8은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구 (Con)와 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 엽록소 함량 변화를 도시한 그림이다.

도 9는 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구 (Con)와 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 광합성 효율 변화를 Fv/Fm로 도시한 그림이다.

도 10은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con)과 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 11은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con)과 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 12는 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con)과 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

도 13은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con)과 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*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*는 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자이고, *SEN4* 및 *SAG12*는 노화 유전자로서, 노화 마커 유전자들이다.

도 14는 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con)과 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 14일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 15는 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con)과 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 14일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 16는 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con)과 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 14일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

도 17은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con)과 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*, 그리고 *ATPG10 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 14일까지 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.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하 본 발명의 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나

본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 애기장대로부터 식물의 생산성 증대와 스트레스 내성을 제공하고 또한 노화 지연을 조절하는 *ATPG10* 유전자의 분리

식물의 생산성 증대와 스트레스 내성 기능을 가지고 노화 지연 기능을 가지는 *ATPG10* 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 스트레스 내성 기능을 가지고 또한 노화 지연을 제공하는 *ATPG10* 유전자 분리

애기장대의 Predicted AT-hook DNA-binding family protein (GeneBank accession number NP_199781.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머 (*PacI*/5g49700 SOE-F, 5'-TTA ATT AA A TGA AAG GTG AAT ACA GAG AGC AA-3')와 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*XbaI*/At5g49700 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA GTA TGG CGG TGG AGC TCT G-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 29.4 kDa의 분자량을 갖는 276개의 아미노산을 암호화하는 831bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을

가지고 있어 이를 *ATPG10*(AT-hook protein of *Genomine 10*)으로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 *ATPG10* 단백질의 등전점(isoelectric point)은 8.34로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "*ATPG10*" 혹은 "*ATPG10* 유전자"라 하고, 단백질은 "*ATPG10*" 혹은 "*ATPG10* 단백질"이라고 한다).

<실시예 2> *ATPG10* 유전자에 대한 센스 구성체 (construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 특성 분석

<실시예 2-1> *ATPG10* 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

상기 유전자가 식물의 생산성 증대와 스트레스 내성 기능을 가지고 또한 노화 지연을 제공하는지를 확인하기 위하여 *ATPG10* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG10* 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 *ATPG10* 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 *ATPG10* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG10* 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

한편, 도 1은 pCSEN 벡터에 *ATPG10* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG10* 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 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.

상기 pCSEN-*ATPG10* 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션(electroporation) 방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28°C에서 O.D.600 값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25°C에서 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 진공 하에 두었다. 침지 후, 애기장대를 24시간 동안 폴리에틸렌 백(polyethylene bag)에 두었다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 생장시켜 종자(T1)를 수확하였다. 대조군으로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *ATPG10* 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-*ATPG10* 벡터로 형질전환된 T1 애기장대는 대조군(*ATPG10* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 변이체들은 뚜렷한 개체 크기 및 종자 수확량 증가와 같은 생산성 증대와 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 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(도 2).

pCSEN-*ATPG10* 구성체를 가지고 있는 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 생산성 증대 현상이 뚜렷하게 나타났으며 흥미로운 점은 이들 변이체 중 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인은 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났다. 생산성 증대 특성을 가지는 변이체들은 발아 후 50일 동안 생육했을 때는 개체 크기에 있어서 야생형에 비하여 비슷하거나 혹은 약간 작았으나, 발아 후 70일 동안 생육했을 때는 개체 크기 및 종자 생산량 증가와 같은 생산성 증대에

있어서 애기장대 야생형에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다. 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/생산성 증대 표현형을 가지는 변이체의 *ATPG10* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 24일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 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 *ATPG10* 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 도 3에 도시되었다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체의 *ATPG10* 유전자의 발현이 전체적으로 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG10* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

ATPG10 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인 모두는 대조구에 비하여 개체 크기, 종자 수확량 등의 생산성 증대 형질이 높은 것으로 나타났다. 그런데 흥미로운 사실은 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 *ATPG10 ox-2* 변이체는 *ATPG10 ox-4*과 *ATPG10 ox-6* 변이체에 비하여 노화 지연에 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. 특히 유전자의 발현 조절을 통하여 애기장대 야생형과 같은 수확시기를 가지고 생산성이 증대되는 식물의 제작이 용이함에 따라 *ATPG10*은 우량 생산성 증대 작물 개발에 있어 훌륭한 유전자원으로 활용할 수 있을 것이다.

【표 1】

ATPG10 유전자와 *ACT2* 유전자 발현을 위한 프라이머 서열 및 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	<i>ATPG10</i>	GCGGTGAAGAGTCAGGACAGA(서열번호 5)/ CACCCATGTGGCAACTGTACAT(서열번호 6)
2	<i>ACT</i>	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAAACCAGCCTTC (서열번호 8)

<실시예 3> *ATPG10* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석

ATPG10 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체의 생산성 증대에 대한 특성을 확인하기 위하여 변이체 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6*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 평균 값이다.

ATPG10 ox-2, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 종자 생산이 증가하는 것으로 나타났으며, 이러한 종자 생산의 증가는 변이체의 장각과 생산 증가에 기인하는 것으로 나타났다. 한편 종자 1,000개의 무게에서 변이체 전체는 대조구에 비하여 큰 변이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자의 발현은 종자의 개체 크기가 아닌 전체 무게의 증가에 영향을 미치는 것으로 판단되며, 이러한 형질은 본 유전자가 화기 형성을 촉진하여 전체 장각과 형성의 증가를 유도하여 결과적으로 전체 종자 무게의 증가를 유발하는 것으로 판단된다. 그리고 생체량과 생체 건량에 있어서도 과발현 변이체는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상을 보였다. 흥미로운 사실은 *ATPG10 ox-4* 변이체 라인은 *ATPG10 ox-2*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인들에 비하여 생체건량 증가에 있어서 뚜렷한 증가 현상은 가진다는 것이다. 이러한 사실로 미루어 보아 본 유전자 발현의 상대적 증가는 생체 건량과 같은 바이오매스 증가에 효과가 높음을 나타낸다. 상기의 내용을 종합해보면 *ATPG10* 유전자가 종자 생산량 증가와 더불어 생체량/생체건량 증가와 같은 바이오매스 증가와 같은 작물의 생산성 증대를 유발하며(도 4), 이러한 과발현 변이체의 라인별 생산성 증대의 차이는 라인별 *ATPG10* 유전자의 발현 정도의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 따

라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 효율 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

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 있다는 것이다.

이러한 결과를 종합해보면, *ATPG10* 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 4> *ATPG10* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석

<실시예 4-1> *ATPG10* 과발현 변이체의 가뭄 스트레스에 대한 특성 분석

ATPG10 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일 된 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 도 5와 6에 도시되었으며, 제시된 값은 라인별로 각 6개체 이상의 평균값±표준편차이다. 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 *ATPG10* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 특히 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인들은 *ATPG10 ox-2* 변이체 라인에 비하여 훨씬 높은 가뭄 스트레스 저항성을 가지는데 이는 본 변이체들의 상대적 유전자 발현 정도에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 *ATPG10* 유전자의 높은 발현은 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 유도한다는 것을 의미한다.

<실시예 4-2> *ATPG10* 과발현 변이체의 H₂O₂ 스트레스

에 대한 특성 분석

ATPG10 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 6개체 이상을 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.

구체적으로 각 DAE(day after emersion)의 잎을 15분간 암 처리한 후, 식물 효율 분석기(Plant Efficiency Analyzer)(Hansatech)를 이용하여 엽록소의 형광을 측정하였고, 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 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG10* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소, 특히 엽록소 함량의 감소가 지연됨을 확인할 수 있었다(도 7, 8과 9). 앞선 가뭄 스트레스 저항성과 마찬가지로 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체 라인들은 *ATPG10 ox-2* 변이체 라인에 비하여 훨씬 높은 H₂O₂ 스트레스 저항성을 가지는데 이는 본 변이체들의 상대적 유전자 발현 정도에 기인하는 것으로 판단된다. 이러한 사실은 *ATPG10*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

따라서 *ATPG10* 유전자는 식물의 생산성 증대뿐만 아니라 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성도 제공하여 스트레스 저항성을 가진 생산성 증대 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

<실시에 5> *ATPG10* 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석

<실시에 5-1> *ATPG10* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 잎의 표현형적 변화

ATPG10 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기

위하여, T2 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(roseette leaf)을 매 4일마다 40일까지 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 활성, 그리고 노화 관련 유전자의 발현율을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 라인별로 각 6개체 이상에서 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 24일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6*의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일 이후부터 일어남을 확인할 수 있었다(도 10). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG10* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 그리고 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체들은 *ATPG10 ox-2* 변이체에 비하여 노화지연의 표현형질이 보다 뚜렷함을 알 수 있었다. 이러한 사실은 본 유전자의 발현이 높으면 높을수록 노화 지연의 표현형질이 강력해짐을 제시할 수 있다.

<실시에 5-2> *ATPG10* 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 결과는 도 11에 도시되었으며, 제시된 값은 라인별로 각 6개체 이상의 평균값±표준편차이다. 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 20일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 최저치로 떨어졌으나, *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6*의 경우 자엽 생성 후 32일이 되었을 때도 측정 초기의 60% 이상의 엽록소 함량을 보이며, 그 후 엽록소 함량의 감소가 급격히 일어남을 확인할 수 있었다. 또한 변이체 라인들의 엽록소 함량 변화를 비교해 보았을 때, 앞의 표현형 분석에서와 마찬가지로 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체들은 *ATPG10 ox-2* 변이체에 비하여 엽록소 함량 감소의 지연에 대한 표현형질이 보다 뚜렷함을 알 수 있었다.

<실시에 5-3> *ATPG10* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 광합성 효율 변화

광합성 효율은 전술한 바의 오 등의 방법(Plant Mol.

Biol. 30:939, 1996)을 이용하여 측정하였다.

결과를 도 12에 도시하였으며, 제시된 값은 라인별로 각 6개체 이상의 평균값±표준편차이다. 야생종은 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6*의 경우 자엽 생성 후 36일에도 광합성 효율이 초기의 80%를 유지하고 있었다. 이러한 광합성 효율의 감소 지연도 앞선 엽록소 함량에서와 마찬가지로 *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체들이 *ATPG10 ox-2* 변이체에 비하여 보다 뚜렷한 표현형을 보였다. 그러나 전체적인 경향을 보면 모든 변이체들은 야생형에 비하여 광합성 효율 감소의 지연 효과가 강력했으며, 변이체간의 지연 효과는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 상기 결과로부터, *ATPG10* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG10* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

<실시예 5-4> *ATPG10* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 노화 관련 유전자의 발현 변화

야생종과 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6* 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence-associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG10* 유전자와 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다.

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

ATPG10 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 대조구조로는 *ACT2* 유전자를 사용하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 2에서 제시하였다.

【표 2】

노화 관련 유전자의 발현을 위한 프라이머 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	<i>CAB2</i>	CCGAGGACTTGCTTTACCCC (서열번호 9)/ AACTCAGCGAAGGCTCTGG (서열번호 10)
2	<i>SEN4</i>	CGTCGATGACACACCCATTAGAG(서열번호11)/ CATCGGCTTGTTCTTTGGAAAC(서열번호12)
3	<i>SAG12</i>	ACGATTTTGCTGCGAAGG (서열번호 13)/ TCAGTTGTC AAGCCGCCAG (서열번호 14)
4	<i>ACT2</i>	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAACCAGCCTTC (서열번호 8)
5	<i>ATPG10</i>	GCGGTGAAGAGTCAGGACAGA(서열번호 5)/ CACCCATGTGGCAACTGTACAT(서열번호 6)

야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였으나, *ATPG10* 과발현 변이체들은 *CAB2*의 발현 감소가 지연되는 것으로 나타났다. 노화의 signal로 사용되는 *SAG12* 발현의 경우, 야생종은 20일에 발현되어 32일째 최대 발현을 나타내는 반면, *ATPG10* 과발현 변이체들은 40일까지 증가 현상이 거의 나타나지 않았으며, 식물의 노화 동안 점진적으로 발현이 증가되는 것으로 알려진 *SEN4*의 발현은 야생종에서는 32일째 발현이 최대로 증가하는 반면, *ATPG10* 과발현 변이체들은 노화 과정 동안 *SEN4*의 발현 증가가 지속적으로 일어나 큰 증가폭을 나타내지 않았으며, 변이체의 *SEN4* 발현 정도는 야생형의 노화 동안의 발현 정도에 비하여 현저히 낮음을 알 수 있었다. 한편 *ATPG10* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 야생형의 경우 노화 동안 발현이 거의 나타나지 않는 반면 *ATPG10* 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 노화 전 과정 동안 발현 수준이 현저히 높으며 일부 구간에서 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(도 13). 따라서 과발현 변이체들의 노화 지연 현상은 *ATPG10* 유전자의 과발현에 의해 유도되는 것으로, 특히 본 유전자 발현의 정도가 높으면 높을수록 노화 지연의 표현형적 특징은 강력할 것으로 생각된다. 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG10* 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 5-5> *ATPG10* 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG10* 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, 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 상기 <실시에 5-1 내지 5-4>와 동일한 방법으로 각 변이체 라인별로 6개체 이상을 대상으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG10 ox-2*, *ATPG10 ox-4*와 *ATPG10 ox-6*의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 보여지며(도 14), 암처리에 의한 노화 동안 엽록소 함량과 광합성 효율 변화에 있어서도 야생종에 비하여 *ATPG10* 변이체들은 정도의 차이는 있지만 함량 및 활성 감소가 지연됨을 알 수 있었다(도 15과 16).

또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의 존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 상기 <실시에 5-4>와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 도 17에 도시된 바와 같이, 야생형에 비하여 *ATPG10* 변이체들은 *CAB2*의 발현 감소는 유사하였으나 *SAG12*의 발현은 지연되고, *SEN4*의 발현율은 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 보아 *ATPG10* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

상기의 실시예를 종합해보면 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다. *ATPG10* 유전자의 과발현은 식물의 개체 크기 증가, 생체량/생체건량 증가, 종자 수확량과 같은 생산성 증대라는 농업형질을 제공하며, 또한 가뭄 혹은 산화 스트레스에 대한 저항성 제공과 더불어 노화 지연이라는 형질을 제공한다. 이러한 형질 제공은 *ATPG10* 유전자의 과발현 정도에 따라 나타나는데, *ATPG10* 유전자의 적정 수준에서의 과발현은 개체크기 증가, 생체량/생체건량 증가, 종자 수확량과 같은 생산성 증대라는 농업형질 제공에 보다 효과적이다. 특히 본 유전자의 적정 수준에서의 발현 조절은 수확시기가 야생형과 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 제공할 수 있다. 한편 *ATPG10* 유전자의 발현 정도에 비례하여 식물의 노화 지연 및 스트레스 저항성에 대

한 형질이 강력하게 나타나는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 적절한 발현 조절은 작물의 생산성 증대와 더불어 스트레스 저항성을 제공하여 다수안정성 작물 개발에 많은 장점을 제공할 뿐만 아니라 작물의 노화지연 기능을 제공하여 생산성 증대 및 녹기연장 형질을 요구하는 작물의 개발에도 많은 장점을 제공할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 2에 개시된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 갖고, 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 *ATPG10* 단백질.

【청구항 2】

제1항의 단백질을 암호화하는 *ATPG10* 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) 생산성 증대 특성을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 4】

- 제3항에 있어서,
- 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 생산성 증대 특성을 갖는 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) 스트레스 내성 특성을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 스트레스 내성 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 6】

- 제5항에 있어서,
- 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 스트레스 내성 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 7】

- (a) 제2항의 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절

서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계,

- (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계, 및
- (c) 노화 지연 특성을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 8】

제7항에 있어서,
상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 9】

- (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 10】

- (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 11】

- (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 12】

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

【청구항 13】

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

【청구항 14】

제7항 기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 식물체

에 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체.

【요약서】

【요약】

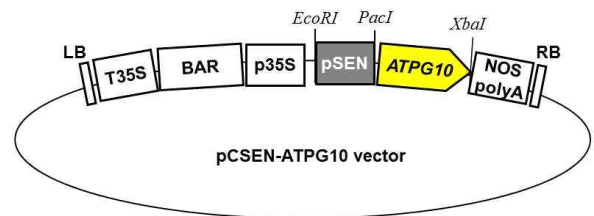
본 발명은 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG10 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도를 개시한다. 상기 유전자가 도입되어 과발현된 식물체는 생산성이 증대되는 특성을 가질 뿐만 아니라 스트레스 내성 특성과 노화 지연 특성도 가진다.

【대표도】

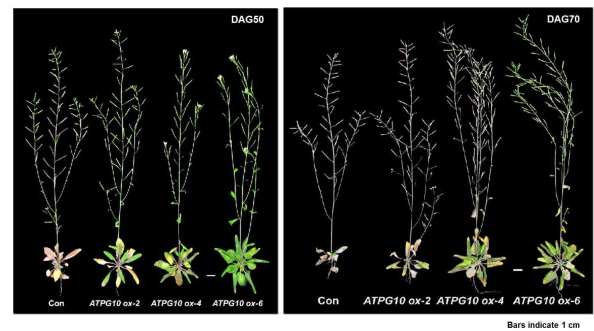
도 2

【도면】

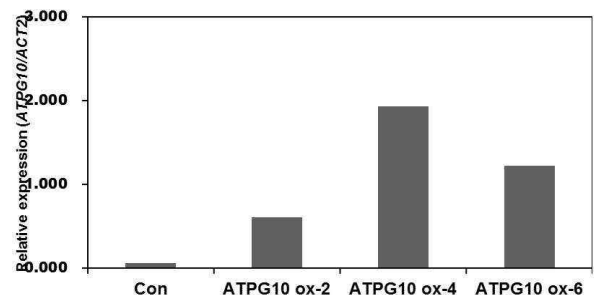
【도 1】



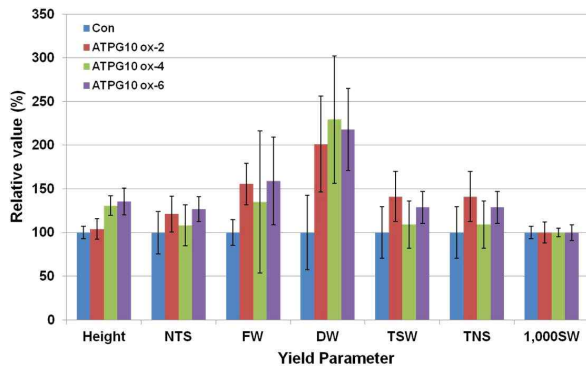
【도 2】



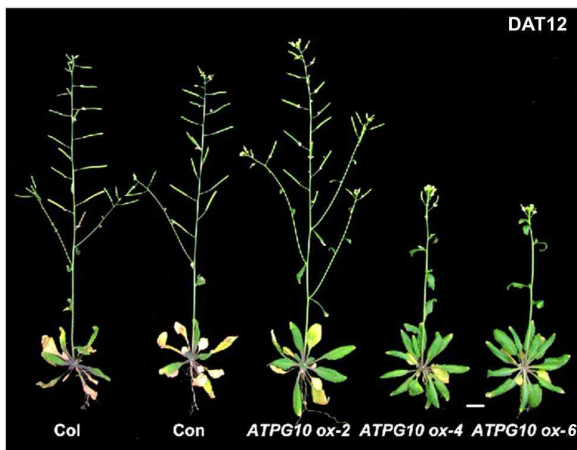
【도 3】



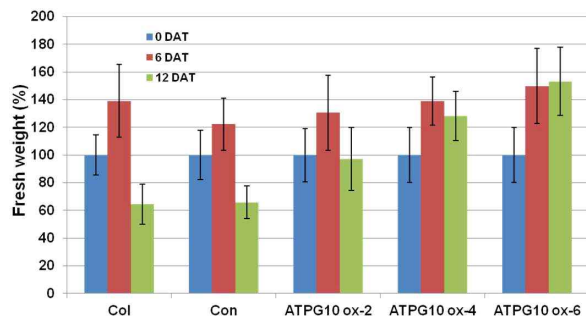
【도 4】



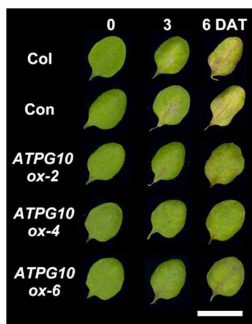
【도 5】



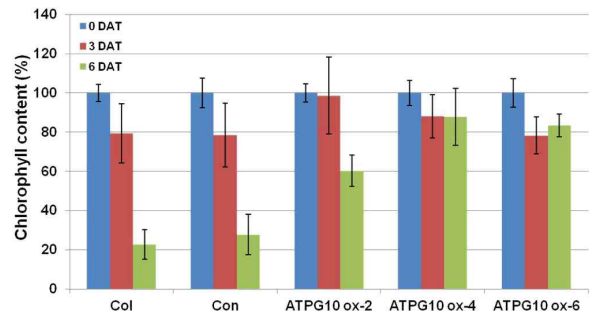
【도 6】



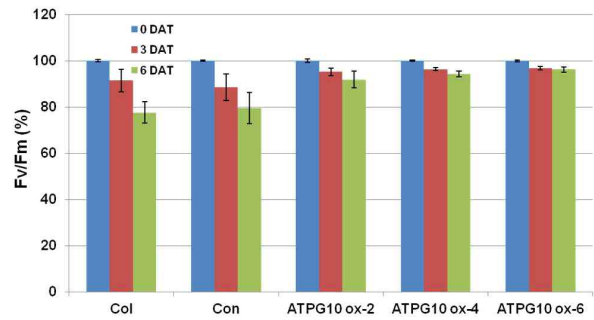
【도 7】



【도 8】



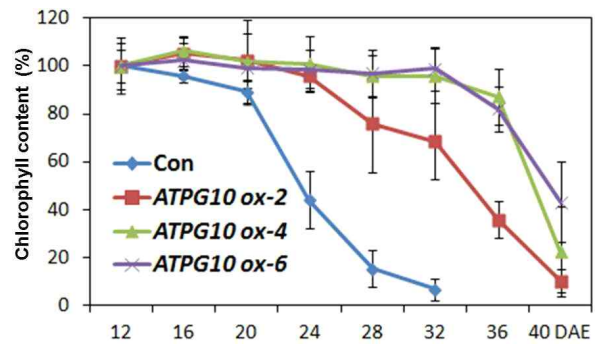
【도 9】



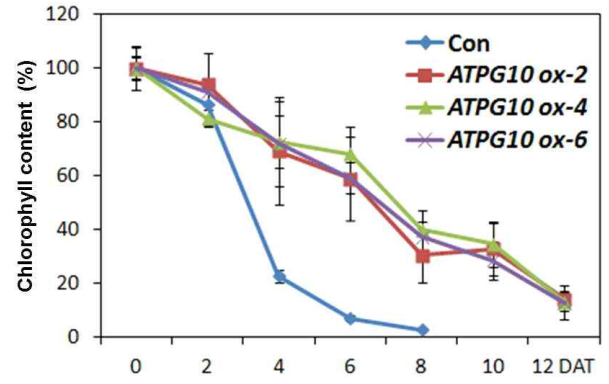
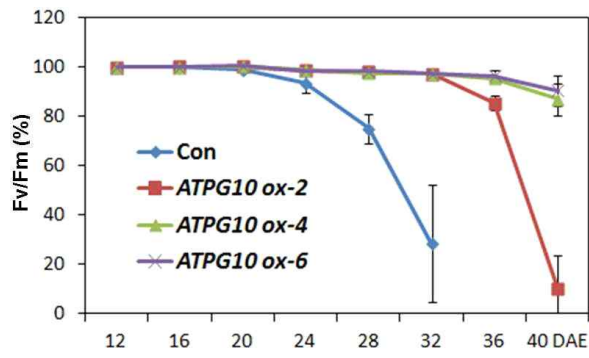
【도 10】



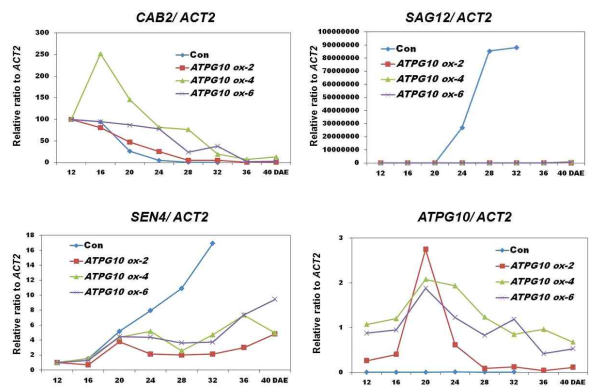
【도 11】



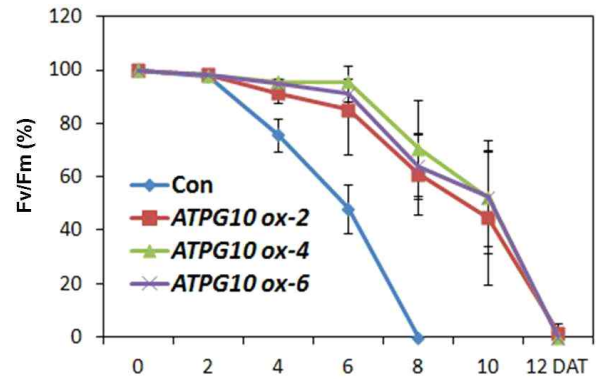
[도 12]



[도 13]



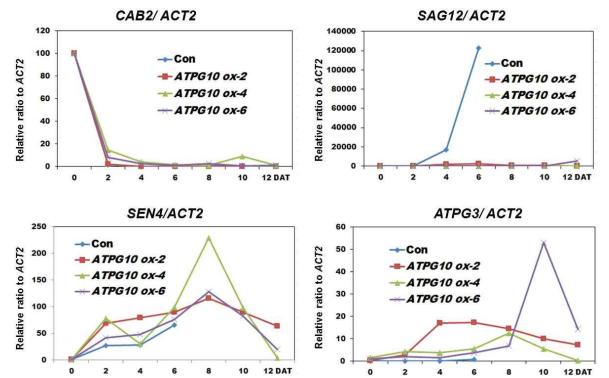
[도 16]



[도 14]



[도 17]



[도 15]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발 사업의 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.