

발간등록번호

11-1541000-001376-01

일반과제번호: 109166-3

생산성 증대를 통한 바이오디젤 생산용 콩과 유채  
형질전환체 개발

**(Development of transgenic soybean and rapeseed with yield increase  
for the production of biodiesel)**

제노마인(주) 첨단생명공학연구소

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생산성 증대를 통한 바이오디젤 생산용 콩과 유채 형질전환체 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 7월 23일

주관연구기관명 : 제노마인(주)

주관연구책임자 : 이 동 희

세부연구책임자 : 이 동 희

연 구 원 : 박 경 목

연 구 원 : 박 원 만

연 구 원 : 이 인 철

연 구 원 : 김 국 진

연 구 원 : 윤 혜 리

연 구 원 : 김 혜 경

연 구 원 : 장 현 숙

연 구 원 : 우 민 희

협동연구기관명 : 동아대학교

협동연구책임자 : 정 영 수

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 김 종 보

# 요 약 문

## I. 제 목

생산성 증대를 통한 바이오디젤 생산용 콩과 유채 형질전환체 개발

## II. 연구개발의 목적 및 목표

연구개발의 최종 목표는 바이오디젤 생산에 있어서 많은 장점을 가지는 콩과 유채 품종에 기능 검정된 유용 유전자를 도입하여 녹화 연장 및 다양한 환경 스트레스 저항성 등과 같은 우량 형질을 통하여 생산성 증대를 나타내는 형질전환체 개발에 있다. 이후 개발된 콩과 유채 형질전환체는 생산성 증대 바이오디젤 원료 우량 품종 개발에 적용할 것이다.

이를 위하여 본 연구팀은

- 1) 모델식물인 *Arabidopsis*에서 유용성이 검증된 유전자 4종(녹화연장, 외부 환경 스트레스 저항성, 생산성 증대)을 기 확립된 형질전환 기술을 이용하여 콩과 유채에 도입하고
- 2) 또한 신규 유용 유전자 3종 (녹화연장, 스트레스 저항성 등)을 새로이 발굴·분리하여 이중 2종을 콩과 유채에 도입하고자 한다. (총 12종의 형질전환체 개발: 콩 6종, 유채 6종)
- 3) 개발된 콩 혹은 유채 형질전환체 7종 이상을 대상으로 녹화 연장, 환경 스트레스 저항성 형질 등에 대한 기능분석을 실시하여 2종 이상의 생산성 증대 우량 콩 혹은 유채 형질전환체를 개발하여 차후 생산성 증대 바이오디젤 원료 우량 품종 개발에 적용하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 기능성 유전체 연구를 통한 녹화 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (7건)
  - 기 확보된 유용 유전자의 기능 재검정 (4건)
  - 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 변이체 pool로부터 녹화연장, 환경 스트레스 저항성 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (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 콩과 유채 형질전환체 개발 (12건)
  - 유용 유전자의 콩과 유채 도입 및 형질전환체 개발 (12건)
    - 유용 유전자의 콩과 유채 도입을 위한 vector construct 제작
    - 콩, 유채 형질전환 실시

- 형질전환 콩, 유채의 1차 기능 분석: 유전자 도입 및 발현 분석
- 형질전환체 개발 (콩 6건, 유채 6건)

### 3) 개발된 콩과 유채 형질전환체의 기능분석 (7건 이상)

- 기능 분석을 통하여 생산성 증대 우량 형질전환체 개발 (2건)
  - 형질전환 콩과 유채의 1차 표현형 분석
  - 형질전환 콩과 유채의 2차 기능 분석 (생리·생화학적 분석, 최종 7건 이상)
  - 형질전환 콩과 유채의 온실 및 포장 검정

### 4) 특허 및 논문 등 지적 소유권 확보 (11건)

- 특허출원/등록 5건
- 논문: 6건 (SCI 학술지 3건, 기타 3건)

## IV. 연구개발결과

본 연구의 최종 목표는 바이오디젤 생산에 있어서 많은 장점을 가지는 콩과 유채 품종에 기능 검정된 유용 유전자를 도입하여 녹화 연장 및 다양한 환경 스트레스 저항성 등과 같은 우량 형질을 통하여 생산성 증대를 나타내는 형질전환체 개발에 있다. 이후 개발된 콩과 유채 형질전환체는 생산성 증대 바이오디젤 원료 우량 품종 개발에 적용하고자 한다.

주관기관인 제노마인(주)에서 확보하고 있는 유용 유전자 중 노화 지연의 표현형적 특징을 가지는 *ORE7*, *ORE12*, 그리고 *ORE15*와 염 스트레스 저항성에 대한 표현형적 특징을 가지는 *AtSIZ*를 생산성 증대 우량 콩과 유채 형질전환체 개발에 적용하였으며, 또한 기능성 유전체 연구를 통하여 발굴된 신규 유용 유전자 7종도 콩과 유채 형질전환체 개발에 적용하였다.

Advanced RAM approach를 통한 노화관련 변이체로부터 발굴한 7종의 유전자 중 *ATHG1*, *ATPG2*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG8* 유전자 모두 녹기 연장과 생산성 증대에 대한 표현형적 특징을 제공함을 확인할 수 있었다. 이러한 유전자들은 *ORE7*과 마찬가지로 모두 AT-hook domain을 가지고 있었다. 우리는 *ORE7*과 신규 발굴한 유전자 5종의 기능 분석을 통하여 chromatin architecture 조절 기술에 대한 새로운 모델을 제시하였다. 제노마인(주)의 chromatin architecture 조절기술은 식물의 노화 진행 동안 chromatin의 안정성을 제공하여 식물의 생산성 증대 또는 노화 지연의 표현형적 특징을 나타내며, 이러한 표현형적 특징은 적용 유전자의 발현 레벨에 따른다는 것이다. 적용 유전자의 발현이 강하면 강할수록 노화 지연의 표현형이 강력하게 나타나고, 적용 유전자의 발현이 적정 수준을 유지하면 식물의 생산성 증대에 강력한 표현형적 특징을 제공한다. 이러한 기술을 통한 생산성 증대는 야생형과 비슷한 수확 시기를 가진다는 점에서 본 기술이 생산성 증대에 대한 형질 제공에 있어 아주 강력할 것으로 판단된다. 한편 신규 발굴한 *GSDL2* 유전자는 녹기 연장과 스트레스 저항성에 대한 표현형적 특징을 제공함을 확인할 수 있었다.

본 연구팀은 상기 유전자를 고효율 콩과 유채 형질전환 시스템을 통하여 8종의 콩 형질전환체와 6종의 유채 형질전환체를 생산하였다. 이후 형질전환체의 기능 분석을 통하여 콩에서 생산성 증대 농업형질을 나타내는 2종의 우량 콩 형질전환체를 개발하였으며, 유채에서 생산성 증

대 농업형질을 가지는 1종의 우량 유채 형질전환체와 스트레스 저항성에 대한 목표형질을 가지는 1종의 우량 유채 형질전환체 후보를 개발하였다. 생산성 증대 우량 ORE7-콩과 ORE7-유채 형질전환체는 녹기 연장에 대한 목표형질의 발현과 생산성 증대에 대한 농업형질의 발현, 둘 다에 대한 표현형적 특징을 가졌다. 생산성 증대 우량 AtSIZ-콩 형질전환체 또한 염 스트레스 저항성에 대한 목표형질과 생산성 증대에 대한 농업형질을 가지는 것으로 확인되었다. 한편 AtSIZ-유채 형질전환체는 염 스트레스 저항성에 대한 목표형질을 가지는 것으로 확인되었으나, 생산성 증대에 대한 농업형질은 아직 연구가 진행 중이므로, 이후 포장시험을 통해 조속히 농업형질에 대한 분석을 수행하고자 한다. 이러한 목표형질과 생산성 증대에 대한 농업형질을 가지는 4종의 우량 형질전환체들은 이후 바이오디젤 생산용 우량 콩과 유채 품종 개발에 적용하고자 한다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과 목표 및 대비 실적

(단위 : 건수)

구분		특허		신제품				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종명 명칭 등록	품종생산 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표	2						1	1		
	달성	3									
2차년도	목표	1						1	1		
	달성	2	1						1		
3차년도	목표	2		1				2	1		
	달성	5									
계	목표	5		1				1	3	3	
	달성	10	1						1		

### 2. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Current status of tissue culture and genetic transformation systems in oilseed rape plants ( <i>Brassica napus</i> L.)	이상일, 김윤희, 이동희	김종보	이유미, 박서준	J. of Plant Biotechnology	37: 379-387	국내	비SCI
2012	ORE7-originated leaf senescence delay confers yield increase through maintenance of chromatin structure in active form	김미진	정영수	이동희 등	Nature Biotech.	투고 예정	국외	SCI

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	The CCCH-Type Zinc Finger Proteins AtSZF2 increases salt tolerance in transgenic soybean	김미진	정영수	이동희 등	Plant Cell Report	투고 예정	국외	SCI
2012	Optimization of <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation system in oilseed rape plants	이상일, 이이레	김종보	이동희, 노희선	J. of Plant Biotechnology	심사 중	국내	비SCI급
2012	Production of transgenic oilseed plants via particle bombardment	이상일	김종보	이이레, 노희선, 이동희	Korean Journal of Plant Resources	심사 중	국내	비SCI급
2012	Transient <i>gus</i> gene expression in oilseed rape plants	이강파, 이상일	김종보	이이레, 노희선, 이동희	Scientia Horticulturae	5월 투고 예정	국외	SCI급

### 3. 특허출원/등록 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2010년 2월	식물의~ <sup>a)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2010-0011652					
2010년 2월	ATHG1~ <sup>b)</sup>	제노마인(주)	PCT(국제)	PCT/KR2010/000767					
2010년 4월	식물의~ <sup>c)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2010-0030394					
					2010년 11월	두 가지~ <sup>d)</sup>	동아대학교 /한국화학 연구원	대한민국	10-2010-0994443
2011년 1월	AtSIZ~ <sup>e)</sup>	한국생명공학연구원	대한민국	10-2011-0007862					
2011년 1월	식물의~ <sup>f)</sup>	제노마인(주)	PCT(국제)	PCT/KR2011/000593					
2011년 8월	식물의~ <sup>g)</sup>	동아대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0084975					
2011년 4월	식물의~ <sup>h)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2011-0038929					
2011년 4월	식물의~ <sup>i)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2011-0038932					
2011년 10월	식물의~ <sup>j)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2011-0110593					
2012년 2월	식물의~ <sup>k)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2012-0016951					

<sup>a)</sup>식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

<sup>b)</sup>ATHG1 Protein Delaying Senescence and Providing Stress Tolerance of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use

- 이)식물의 수명 연장 기능 및 스트레스 내성 기능을 가지는 GSDL2 단백질, 그 유전자 및 이들의 용도
- 디)두가지 제초제에 대하여 저항성을 가지는 항생제 마커프리형질전환 콩 식물체
- 이)AtSIZ 형질전환 콩 6번 사상의 도입 유전자 위치 및 이의 이용 방법
- 이)식물의 수명 연장 기능 및 스트레스 내성 기능을 가지는 GSDL2 단백질, 그 유전자 및 이들의 용도
- 이)식물의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 AtSZF2 유전자 및 이의 용도
- 이)식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- 이)식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- 이)식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- 이)식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

#### 4. 연구성과 활용 계획

본 연구를 통하여 획득한 제노마인(주)의 chromatin architecture 조절기술을 통한 생산성 증대 관련 유용 유전자의 발굴 및 기능 검정을 통해 지적소유권을 확보하고, 본 유전자들에 대한 기술이전을 통하여 경제적 이익을 추구할 것이다. 이때 유전자의 기능을 강화하기 위하여 관련 전공자(식물 생리·생화학자 등)와의 공동연구를 적극 추진할 것이며, 이러한 연구 결과는 유용 유전자의 기술이전에 있어서 보다 부가가치를 높일 것이다.

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

**신품종 혹은 신기능성 작물 개발:** 본 사업을 통해 개발된 우량 형질전환체에 대한 품종 개발은 GM 작물 실용화 연구를 통하여 사업화를 추진하고자 하며, 본 사업동안의 추진한 단계인 생산성 증대에 대한 농업형질 획득은 이후 GM 작물 실용화에 있어서 기획, 형질전환체 개발, 우수 이벤트 선발 및 안정성 평가를 추진할 예정이다. 이러한 사업 추진전략은 단기적으론 우량 형질전환체에 대한 기술이전, 그리고 장기적으론 종자 생산으로 인한 종자 산업화의 활성화 및 고부가 가치 창출이 가능할 것으로 예측된다. 또한 본 사업에서 발굴되는 유전자는 생산성 증대 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능할 것이다.

**국가 농업 경쟁력 확보:** 본 사업을 통하여 확보된 생산성 증대 바이오디젤 원료 작물들을 간척지, 휴경농지 등 국가 비농지에 재배하여 농가 소득 증대 및 국내 농업 경쟁력 확보에 일조할 것이다.

## SUMMARY

The final goal of this research is to develop yield-improved transgenic soybean and rape plants harboring specific genes. The introduced genes confer senescence delay and stress tolerant traits to the transgenic plants produced. Those transgenic plants will be fundamental resources of a new cultivar development for biodiesel production through these plants.

GENOMINE Inc., main research group of the project, has developed a series of gene related to senescence delay traits such as *ORE7*, *ORE12*, and *ORE15* as well as *AtSIZ* gene related to stress tolerance trait, and provided to sub-research groups for soybean and rape transformation experiments. With all these cooperation among attendant groups, soybean and rape transgenic plants have successfully produced with the expected phenotype, yield increase. Moreover, several unidentified related genes were cloned through advanced RAM approach. Among those genes, *ATHG1*, *ATPG2*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7* and *ATPG8* are providing similar phenotype like *ORE7* gene. These newly identified gene also possessed AT-hook domain like *ORE7*. Through the research, we proposed that these genes regulate chromatin architecture. During the senescence these genes regulate chromatin architecture, stabilize at cell level and result in yield increase. We found that gene expression level also very important factor to reveal the traits. Too strong expression of the gene give senescence delay but whole plant became stunt by overexpression of gene. More positive phenotype came from relatively low level of gene expression. This is scientifically very important finding. So, we are preparing one paper to publish in high ranking journal. Proper use of this type of gene function will give us huge benefit to develop a good cultivar from soybean and rape.

Through the research, we have produced 8 different transgenic soybean and 6 rape plants via highly efficient transformation system. After detailed investigation on morphological traits in field condition, 2 soybean transgenic lines and 1 rape transgenic line were confirmed with high yield performance. Another 1 rape transgenic line was also produced with stress tolerant trait. Those transgenic soybean lines with high yield have showed normal agronomic appearance in field test. All the field test was carried in Ochang GMO field and field evaluation was aided by soybean breeder. Even after termination of the project by the end of march, 2012, one more field trial will be carried out in two locations, RDA in Milyang and GMO field in Kunwi (Gyungbuk National University). The permission for field trial has already been issued for this year test. We will carefully evaluate all the yield related parameters and total yield in relatively large scale cultivation.



## CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	10
Chapter 2. Current R&D status in Korea and abroad .....	17
Chapter 3. Contents and results of the project .....	28
Chapter 4. Achievement and contributions .....	127
Chapter 5. Products and employment planning .....	133
Chapter 6. The R&D informations collected .....	139
during the project	
Chapter 7. References .....	145
[Appendix 1] Patent (10-2012-0016951) .....	148
[Appendix 2] Patent (10-2011-0110593) .....	164
[Appendix 3] Patent (10-2011-0038929) .....	181
[Appendix 4] Patent (10-2011-0038932) .....	195
[Appendix 5] Patent (10-2011-0084975) .....	208

# 목 차

<b>제 1 장. 연구개발과제의 개요</b> .....	<b>10</b>
제 1 절. 경제·산업적 중요성 및 필요성 .....	10
<b>제 2 장. 국내외 기술개발 현황</b> .....	<b>17</b>
제 1 절. 국내외 기술개발 현황 .....	17
제 2 절. 국내외 특허 현황 .....	20
제 3 절. 선행연구 결과 .....	22
<b>제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	<b>28</b>
제 1 절. 연구개발수행 내용 및 방법 .....	28
제 2 절. 생산성 증대 관련 유용 유전자 발굴 .....	33
제 3 절. 콩 형질전환체 개발 .....	82
제 4 절. 유채 형질전환체 개발 .....	95
<b>제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> .....	<b>127</b>
제 1 절. 목표달성도 .....	127
제 2 절. 관련분야에의 기여도 .....	130
<b>제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획</b> .....	<b>133</b>
제 1 절. 연구개발 성과 .....	133
제 2 절. 성과활용 계획 .....	137
<b>제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보</b> .....	<b>139</b>
<b>제 7 장. 참고문헌</b> .....	<b>145</b>
[부록 1] 특허출원 (10-2012-0016951) .....	148
[부록 2] 특허출원 (10-2011-0110593) .....	164
[부록 3] 특허출원 (10-2011-0038929) .....	181
[부록 4] 특허출원 (10-2011-0038932) .....	195
[부록 5] 특허출원 (10-2011-0084975) .....	208

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

#### [기술의 기반성]

최근 한정된 화석 에너지의 고갈 등의 이유로 고유가 지속과 지구 환경 문제 해결을 위한 기후변화 협약 발효 등으로 에너지 문제에 대한 관심이 고조됨에 따라 바이오매스를 활용한 청정에너지, 신·재생에너지를 생산하는 바이오에너지 관련 기술개발 및 상용화에 대한 연구가 전세계적으로 활발히 진행되고 있다.

바이오에너지는 바이오매스의 연소 또는 생물학적 공정처리에서 발생하며, 이는 성상에 따라 고체, 액체 그리고 바이오가스로 구분된다(그림 1). 현재 대부분의 바이오에너지는 고체 바이오매스의 직접 연소를 통해 생산되나 이러한 고체 연소 방식은 에너지 효율이 낮고 산업적 활용 사례가 거의 없어 생물 공정을 통해 액체 바이오매스로 전환시키는 연구에 집중하고 있다. 액체 바이오매스는 미래의 핵심 바이오에너지 자원으로 사용될 것으로 전망되며 액체 바이오연료의 상업화는 바이오디젤이 앞선 반면, 잠재 가치는 바이오에탄올 또한 매우 높은 것으로 사료된다. 바이오디젤은 기존 디젤엔진에서도 사용 가능하여 비교적 단시간 내에 보급이 확대될 수 있으나 추출 가능한 원재료가 제한적인 단점을 가지고 있다. 한편 바이오에탄올은 전통적으로 곡물의 녹말 성분을 발효하여 제조하지만, 곡물 가격이 높기 때문에 보다 저렴한 원료 선정이 중요하다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 한국형 바이오에너지 작물 개발 및 생산성 증대 원료 작물의 개발이 필수적일 것으로 판단된다.

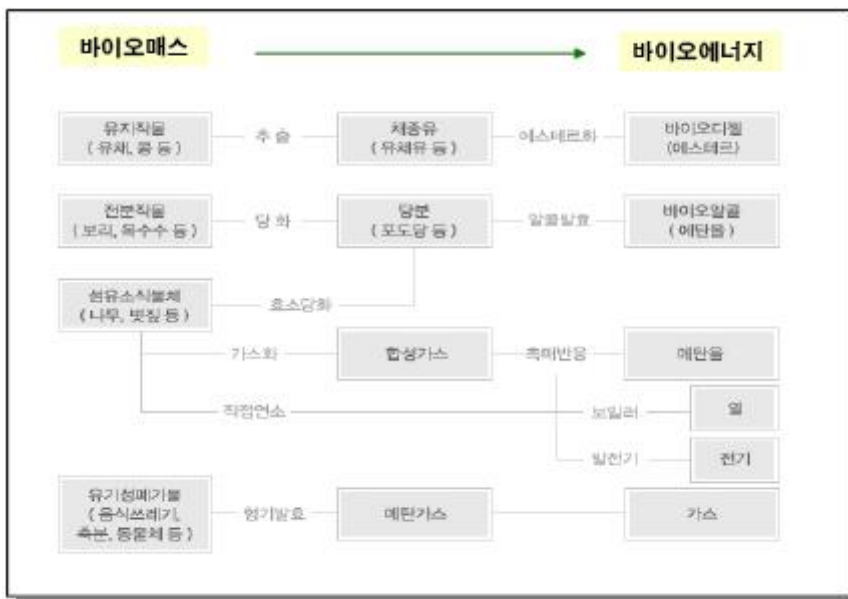


그림 1. 바이오에너지 변환시스템 (<http://www.knrec.co.kr>)

바이오에너지 개발은 에너지 확보, 이산화탄소의 감축 및 농가 소득 제고라는 세 가지 당면 문제를 동시에 해결할 수 있는 유망한 사업이며 이러한 개발에 있어서 가장 주된 핵심은 에너지 작물 개발이다. 이러한 바이오에너지에 대한 기술개발은 자원 확보, 공정 처리 및 활용의 3단계로 구분되며, 자원 확보 및 공정 처리 분야에 있어서 생명공학 기술 적용은 유용 형질이 도입된 다수확성 에너지 식물의 개발 및 탄수화물의 분해 효소와 발효 미생물의 개발 등을 통한 공정 기술 개발을 촉진할 수 있다. 따라서 바이오에너지 개발에 있어서 생명공학 기술은 핵심 기술로 대두되어 많은 연구 기관 및 산업체에서 이들에 대한 연구를 수행하고 있는 중이다.

바이오디젤은 식물성유, 동물성 지방 및 폐식용유 등 다양한 원료를 이용하여 알코올과 에스테르화 반응을 통해 얻어지는 디젤유(경유)이다. 원유로부터 정제를 통해 얻어지는 경유와 특성이 비슷해 디젤 자동차의 엔진 변경 없이 경유와 혼합해 사용이 가능하며, 미세먼지나 일산화탄소 등의 오염 유발 물질의 배출량이 일반 경유에 비하여 매우 낮은 것으로 알려지고 있다. 또한 황산화물도 약 20% 정도 감소되는 것으로 보고되고 있다. 이에 따라 환경 규제 강화와 더불어 바이오디젤 수요 잠재성은 매우 높을 것으로 예측된다. 최근 고유가 지속으로 경유의 소비자 가격이 급속도로 상승하고 있는 반면, 바이오디젤 원료 작물에 대한 휴경지 활용 등의 경작지 확대를 통한 생산성 증가와 최근 일시적인 곡물 가격 상승으로 인한 약간의 변화는 있지만 식물성 오일 가격의 지속적인 감소(그림 2)를 타나내고 있으며, 이는 가까운 미래에 바이오디젤이 석유의 일반 경유와 가격 경쟁이 가능하리라 예상되고 있다.

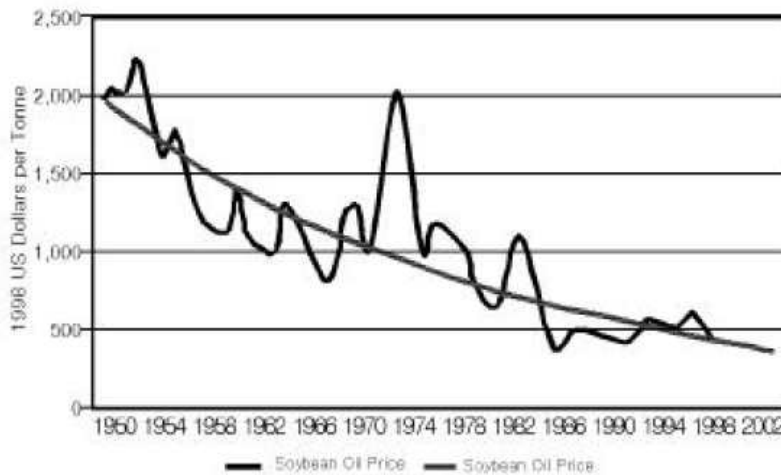


그림 2. 대두유의 가격변동 추이 (CTVO final conference, 2000)

현재 미국에서는 바이오디젤 원료로 가장 많이 사용되는 에너지 작물은 대두이며, 유럽에서는 주로 유채 기름을 많이 사용하고 있다. 전체적으로 볼 때, 유럽 국가의 바이오디젤 생산량이 많기 때문에 원료 비중은 유채가 압도적으로 높고, 해바라기, 대두가 그 뒤를 잇고 있다(그림 3). 한편 한국에서는 에너지 작물 생산량이 지극히 낮기 때문에 주로 폐식용유를 이용한 시도가 많은 것으로 나타난다. 한국은 에너지 작물 자급도가 매우 낮기 때문에 향후 원재료의 안정적인 확보 여부가 중요한 경쟁력 요인이 될 가능성이 높다. 따라서 절대 농지 면적의 제한을 가진 국내에서는 농지에서 생산량 증대를 위한 농업 기술 개발과 식물 생명공학 관련 기술 개발이 필수적일 것이다. 이러한 기법의 적용을 통한 바이오디젤 원료 작물의 우량화 및 다양

화가 이루어지게 되면 향후 바이오에너지 관련 산업 발달로 인하여 에너지 수입 대체 및 재배 농가 소득증대 효과까지 누릴 수 있을 것이다.

일반적으로 식물 유전공학적 기술을 통한 바이오디젤 원료 작물 개발은 다음과 같은 두 가지 단계로 이루어질 수 있다. 그 첫 번째는 품종 개발에 적용할 유용 표현형질을 지닌 유전자의 발굴이며, 두 번째는 유용 유전자를 바이오디젤 원료 작물에 도입할 수 있는 형질전환 기법의 확립이다. 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 핵심 기술로 적용되고 있다. 식물 기능성 유전체 연구(functional genomics)는 1) 식물에 내재하는 유전자의 발현을 인위적으로 제한하여 신 기능성 형질전환 식물을 창제하고, 2) 이 기술을 대량으로 적용하여 원하는 형질의 식물체를 선발하거나, 3) 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.

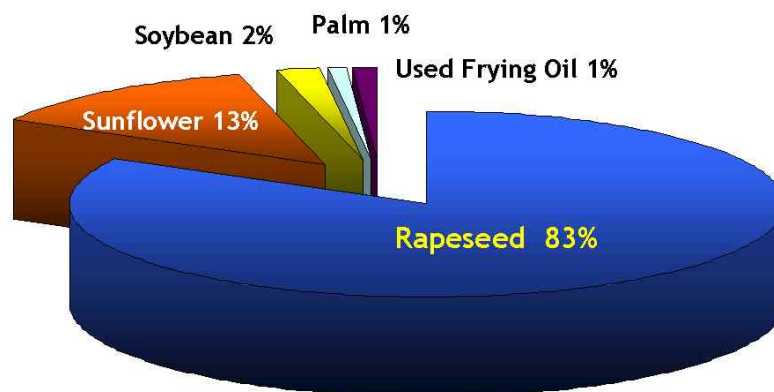


그림 3. 세계 바이오디젤 원료별 생산 동향 (이진석(2003) 국내의 바이오디젤 생산 기술 개발 동향, 한국에너지기술개발원)

본 연구팀 중 주관 기관인 제노마인(주)는 상기의 기능성 유전체 연구의 다양한 기법인 activation tagging, promoter trap 및 advanced RAM approach 기법 등을 확립하고 있으며, 이와 같은 기능성 유전체 연구를 통하여 바이오디젤 원료 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 *ORE7*과 *ORE15*가 삽입된 변이체는 잎의 녹화 연장 또는 organ size 증가 등을 유발하여 종자 생산량이 야생형에 비해 현저하게 증가한다고 증명하였으며, 이와 같은 유용 유전자의 바이오디젤 원료 작물 적용은 우량 품종 개발에 있어서 노화 조절을 통한 생산성 증대 표현형질 발현이라는 측면에서 기여도가 높을 것이라고 추측된다. 한편, 협동기관인 동아대학교 정영수 교수 연구팀은 국내 콩 품종의 고효율 형질전

환 시스템을 확립하였으며, 이를 통하여 제초제 저항성 콩 품종 개발을 성공하였다. 또한 협동기관인 건국대학교 김종보 교수 연구팀은 국내 유채 품종인 유달에 대한 고효율 형질전환 시스템을 확립하였고, 다른 품종인 영산 그리고 내한에 대한 형질전환 시스템을 확립 중에 있다. 따라서 생산성 증대를 통한 바이오디젤 원료 작물 개발에 대한 주관기관과 협동기관의 기술력은 본 사업의 성공에 대한 초석이 될 것이다.

### [기술의 핵심성]

생산성 증대 우량 바이오디젤 원료 작물을 개발하기 위해서는 노화지연, 다수확성, 종자 크기 증가 등과 같은 표현형을 유발하는 유전자 및 내한성, 내건성, 내담성, 내서성 등과 같은 다양한 외부 환경 저항성 유전자의 확보 및 발굴과, 바이오디젤 원료 작물로서의 많은 장점을 가지고 있는 유채와 콩 품종 개발에 있어 핵심기술인 유채와 콩 형질전환 기법의 확립이 관건이다. 흥미로운 사실은 식물의 노화 조절은 1차적으로 작물의 생산성 증가에 결정적 공헌을 할 수 있다는 것이다. 기존 보고에 의하면(Gan *et al.*, 1995) 담배에서 노화 조절을 통해 생산성을 최고 50%까지 증가 시킬 수 있었으며, 또한 벼 (personal communication, 국제미작연구소, 2004)와 콩(Guamett *et al.*, 1990)과 같은 곡물류에서도 노화 조절을 통해 생산성이 각각 최소 10%, 30% 이상의 증대 효과를 얻을 수 있었다. 이는 노화 조절 관련 유전자가 생산성 증대 표현형질을 제공함으로써 우량 바이오디젤 원료 작물 개발에 많은 장점을 줄 수 있다는 것을 시사한다.

따라서 본 과제는 **promoter trap, advanced RAM approach, activation tagging, 그리고 EMS mutagenesis** 등과 같은 다양한 유전체 기능 연구를 통하여 확보된 애기장대의 변이체 pool로부터 녹화 연장과 다양한 환경 스트레스 저항성 등과 관련된 신기능성 유용 유전자를 발굴하고, 유채와 콩에서의 활용성을 연구하며, 기능 검정된 유용 유전자를 생산성 증대 바이오디젤 생산 작물 중 한국형 작물 개발에 적합하고 오일 생산 효율성인 높은 유채와 콩(그림 4)의 품종 개발에 적용하여 생산성 증대에 있어서 최적 형질을 가지는 신기능성 유채 및 콩 품종 개발을 목적으로 한다.

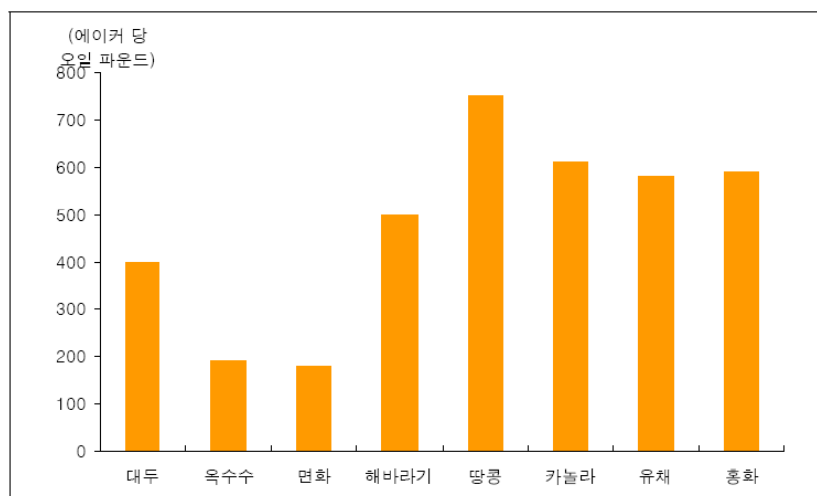


그림 4. 곡물 원료의 생산 효율성(에이커당 오일 생산량) (미국 농무부 자료 인용)

이러한 유채 및 콩 품종 개발에 있어서 녹화 연장 및 다양한 환경 저항성 유전자의 발굴 및 기능 검정은 생산성 증대 품종 개발에 범용적 응용이 가능한 핵심 기술이다. 본 연구팀은 생산성 증대 품종 개발의 연구 추진 속도를 가속화하기 위하여 일차적으로 기 확보된 유용 유전자를 유채 및 콩 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 녹화 연장 및 환경 스트레스 저항성 유전자를 콩에 적용하여 형질 전환체 개발에 성공하였으며, 또한 녹화 연장 유전자를 유채에 적용하여 형질전환 및 형질전환체 선별을 수행하고 있는 중이다. 이와 같은 선행 연구는 본 사업의 성공에 대한 확신을 제공하며, 또한 사업의 조기 성공을 이끌어낼 것이다.

**유채 형질전환 기술:** 유채의 품종 개발은 전통적인 육종 방법을 통하여 활발히 진행되고 있으나, 분자생물학적 기법을 이용한 신품종 개발은 거의 없는 실정이다. 이는 아직 유채에 대한 안정적인 형질전환 기법이 확립되어 있지 않음을 의미한다. 그러나 본 연구팀은 한국의 유채 품종인 유달을 이용하여 아그로박테리움을 매개로 한 고효율의 안정적인 형질전환 기법을 확립하였으며, 다른 품종인 영산에 대한 형질전환 기법도 확립 중에 있다. 이러한 아그로박테리움 매개 유채 형질전환 기법은 본 과제의 핵심기술이다.

**콩 형질전환 기술:** 콩의 품종 개발은 전통적인 육종 방법을 이용하고 있으나, 최근 분자생물학적 방법을 이용하여 신품종 개발이 시도되고 있다. 그러나 아직 국내에서 콩에 대한 상업적으로 안정적인 형질전환 성공 사례는 거의 없는 실정이다. 그러나 본 연구팀은 국내 콩 품종인 광안콩을 이용하여 아그로박테리움을 매개로 한 고효율의 안정적인 형질전환 기법을 확립하였다. 이러한 아그로박테리움 매개 콩 형질전환 기법은 본 과제의 핵심기술이다.

#### **기능성 유전체 연구를 통한 유용 표현형질 발현 시스템 발굴 기술:**

**녹화 연장 조절 유전자:** 식물의 노화는 세포나 조직을 죽음으로 이르게 하는 마지막 발달 단계로서, 작물의 생산성, 과일 및 화훼류의 저장성, 수송 과정, 수확기 조절 등에 관여하는 결정적 유전요인이다. 이러한 노화 조절 기술은 녹화 연장을 유발하며, 스트레스에 대한 내성 강화에도 응용이 가능하여 생산성 증대에 있어서 핵심기술이다.

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

## 2. 경제적·산업적 중요성

**국가 에너지 안보:** 한정된 화석 에너지의 고갈로 현재의 석유 비축량은 33년 정도에 불과하며 최근 배럴당 70달러 안팎인 국제 유가는 단기적인 수급 차질과 산유국의 정치 불안을 계기로 지속적인 상승세를 유지할 것으로 예상되면서 에너지 문제는 국가 안보차원의 위협요인이 되고 있다. 이에 세계 각국의 에너지 확보전이 치열해지고 소비 급증에 따른 에너지 안보의 중요성이 대두되고 있는 실정이다. 2005년 이후 국제 유가가 급등함에 따라 에너지 안보 차원에서 바이오에너지가 세계 경제의 키워드로 부상하고 있으며 이에 대비한 재생에너지 확보가 시급한 실정이다. 따라서 바이오에너지 원료 작물 개발은 이러한 에너지 안보문제에 있어 국가의 경쟁력 확보 등에 일조할 수 있을 것으로 확신한다.

**이산화탄소 감축:** 최근 이산화탄소에 의한 기후변화와 교토의정서에 의한 온실가스 감축 협약, 그리고 2012년 이후 새 기후변화 협상 절차를 담은 발리 로드맵이 2007년에 채택됨으로써, 온실가스 배출이 세계 9위인 우리나라는 연간 5억9천만 톤(2004년 기준), 1인당 배출량은 약 12톤으로 지난 15년간 약 69.5%의 증가율을 보이고 있어 앞으로 2012년까지 두 자릿수 이상을 감축해야 하는 것으로 분석되고 있다. 따라서 기존 화석연료를 대체 가능하며 환경오염 배출물질이 적은 바이오에너지 생산 기술 개발 및 보급을 위해 적극적인 대책 마련이 필요한 상황이다.

**고부가 가치 창출:** 세계적으로 신재생에너지 시장이 매년 30%의 성장세를 보이고, 재생 에너지 중 많은 부분을 차지하고 있는 바이오에너지는 2005년 기준 세계 바이오에탄올 및 바이오디젤의 생산은 각각 1,707만 톤과 291만 톤으로 연평균 13-28%의 증가율을 보이고 있다(해외경제정보 제2007-11호). 이러한 바이오에너지 생산 증가는 농산물 원료에 대한 수요 증가로 이어져 바이오에너지 원료 작물 개발은 경제적으로 고부가 가치 창출이 가능하게 할 것이다. 한편 바이오에너지는 원료 생산에서 제조 공정, 유통, 소비에 이르는 과정에서 많은 산업이 복합적으로 연계된 고부가 가치 산업으로, 고용 확대와 경제 활성화에 유용한 전략산업으로 육성이 가능하리라 판단된다.

**농업 활성화:** 바이오에너지 산업의 육성은 우리나라 농업의 고령화와 경제 환경 문제에 대한 새로운 방향을 제시하여 농업 활성화에 기여할 수 있다. 예를 들면 연간 10만 톤의 바이오디젤 생산은 농업 관련 산업부문에 약 1,800개의 일자리를 창출할 수 있다. 또한 바이오디젤과 에탄올 원료 작물 생산에 주어지는 각종 세제 혜택과 보조금은 WTO 규정에 어긋나지 않으며 농가 소득을 합법적으로 지원하는 수단으로 활용이 가능하다. 현재 전 세계 경작 농지의 약 1%가 바이오에너지 개발 목적으로 투입되고 있으며 향후 2030년에는 2.5-3.8%의 경작 농지가 투입될 것으로 전망되어 우리나라도 적극적인 대처가 필요한 상황이다.

**식물생명공학 산업 활성화:** 21세기 식물생명공학 산업은 다양한 식물로부터 유용 유전자를 발굴하고 그 유전자를 경제작물에 도입하여 개량 형질의 우수 품종을 개발하는 것이 새로운 전략으로 대두되고 있다. 이러한 경쟁의 핵심은 유용유전자에 대한 지적 소유권의 확보이다. 이를 위하여 기능성 유용 유전자의 대량 발굴 기술이 세계적으로 확산되고 있으며, 산업적 이용 가치가 있는 유용유전자 발굴과 이들 산물의 전장이 가속화 될 것이다. 이러한 유용 유전자의 경제작물로의 도입은 특수 목적 혹은 기능성 맞춤형 식물의 개발을 통한 고부가 가치 창출이 가



능할 것이다. 유전자 변형 작물 시장규모가 2010년경에는 약 250억불로 추정하고 있으나 바이오에너지 작물 개발이 현재와 같이 진행된다면 그 시장 규모는 훨씬 커질 것으로 추정된다 (Table 1 참조).

**Table 1. 유전자 변형 작물의 세계 시장 동향** (식물 개량 기술, 특허청, 2003; 단위: 억불)

연도	1997	1998	2000	2005	2010
시장규모	6	12	30	60	250

따라서 본 사업에서는 녹화 연장 및 다양한 환경 스트레스 저항성 유용 유전자를 애기장대로부터 발굴하고 이에 대한 지적 소유권을 확보하여 바이오디젤 작물인 유채와 콩에 적용하여 생산성 증대 우량 바이오디젤 품종 개발을 수행하고자 하며 유용 유전자에 대한 지적소유권의 확보는 유채와 콩의 품종 개발뿐만 아니라 다른 작물에도 적용이 가능하여 그 활용 가치가 높으며 또한 고부가 수익 창출로 인한 식물생명공학 산업의 활성화에 일조할 수 있을 것이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 국내외 기술개발 현황

2000년 초반 한정된 화석 에너지의 고갈 및 이산화탄소에 의한 지구 온난화 등의 문제로 휘발유와 경유 등 운송용 화석 연료를 대체할 수 있는 에너지원으로 바이오매스에서 생산되는 바이오디젤 생산이 바이오 강국(미국, 유럽, 브라질 등)을 중심으로 급증하고 있다.

유럽(독일, 영국 프랑스 등)의 경우, 대부분 바이오디젤 원료 작물로 유채를 재배하여 사용하고 있다. 특히 독일은 유럽 중에서도 바이오디젤에 가장 적극적으로 대처하고 있는 국가이다. 독일은 high oleic acid계통의 추파형 유채를 개발하고자 연구에 집중하고 있으며, 국가 정책적으로 2%의 바이오디젤 사용율을 '2010년까지 유럽 화석기원 연료의 5.75%를 바이오매스 기원 액체 연료로 대체한다'라는 계획을 기준으로 목표치를 설정한 후 바이오에탄올과 함께 바이오디젤 활용에 적극적으로 대처하고 있다. 바이오디젤 보급의 배경에는 독일의 디젤엔진 업체가 빠른 단계로 보급 활동에 참여하는 것을 들 수 있다. 그 예로 벤츠사는 1991년에 택시에 이용하는 테스트를 개시하였고 폭스바겐사도 94년에 시작하였고, 96년 이후 모든 디젤차 모델로 바이오디젤의 성능보증을 발표하였다.

미국은 정부 주도로 대체에너지 개발을 추진하여, 1988년 10월 의회에서 바이오디젤을 연료로 사용할 수 있는 법안을 통과시켰으며, 2001년 에너지부는 바이오디젤을 자동차 연료로 인증하여 사용하게 함으로써 본격적인 대체 에너지 시대를 열어 가고 있다. 또한 2001년까지 바이오에너지의 사용량을 현재보다 3배 이상 증가시킨다는 정책 목표를 설정하여 추진 중에 있다. 미국의 경우, 대부분의 바이오에너지 작물을 이용한 디젤 생산은 대부분 콩을 사용하고 있으며, 주요 바이오디젤 생산 업체의 현황은 Table 2와 같다.

캐나다의 경우 재생가능 에너지 관련 프로젝트 중 하나인 '바이오매스 프로젝트'(재생 가능 에너지원으로 바이오매스를 활용하는 프로젝트의 총칭)는 환경성, 천연자원성 등 캐나다 연방 정부 및 주정부가 중심이 되어 재생가능 에너지원의 이용을 추진하고 있는데 그 중 바이오디젤 프로젝트로서 2004년 6월부터 56만 캐나다 달러를 투자해 바이오디젤유를 선박에 이용하는 시도를 하고 있다. 캐나다의 바이오디젤은 농산물인 캐놀라를 주원료로 개발이 진행되고 있다.

브라질의 경우 바이오디젤의 상업 유통이 2004년 12월 연방 정부의 허가를 시작으로 '바이오디젤 생산, 이용 국가 프로그램(PNPB) 추진 등을 통하여 국가적으로 적극적 지원을 아끼지 않고 있는 실정이며, 또한 국영에너지회사인 페트로브라스(Petrobras)를 앞세워 바이오디젤 등 바이오에너지 생산을 크게 확대하면서 2030년 근처에 대체에너지 중심국가로 부상하겠다는 야심찬 계획을 추진하여 실행하고 있다. 그리고 일본 등 그 외 많은 나라에서 대체에너지의 필요성을 인식하면서부터 국가적 차원에서 대체에너지 개발에 집중하고 있는 실정이다.

Table 2. 미국 주요 바이오디젤 생산 업체의 현황 (천연 연료시대로의 회귀  
-바이오디젤과 에탄올(2), 미래엿세증권, 2006)

No	업체명	생산능력(갤런)	주원료
1	Minnesota Soybean Processors	30,000,000	Soybean oil
2	Soymor	30,000,000	Soybean oil
3	Organic Fuels,LLC	30,000,000	Multi Feedstock
4	Peter Cremer(TRI-IN)	30,000,000	Soybean oil
5	Johann Haltermann, LTD	20,000,000	Soybean oil
6	Ag Processing(AGP)	15,000,000	Soybean oil
7	Environmental Alternatives	13,000,000	Soybean oil
8	West Central	12,000,000	Soybean oil
9	Smithfield Bioenergy LLC	12,000,000	Multi Feedstock
10	Texago Technologies	12,000,000	Soybean oil
11	Stepan Company	11,000,000	Soybean oil
12	Bio Energy of Colorado	10,000,000	Soybean oil
13	Imperial Western Products	8,000,000	Multi Feedstock
14	Eastman chemical Company	6,000,000	Soybean oil
15	Biofuels of Colorado	6,000,000	Soybean oil
16	American Biofuels LLC	5,000,000	Soybean oil
17	Biodiesel of Las Vegas	5,000,000	Multi Feedstock
18	Channel Chemical Corporation	5,000,000	Soybean oil
19	SMS Envirofuels	5,000,000	Soybean oil
21	South Texas Blending	5,000,000	Beef Tallow
21	Seattle Biofuels,LLC	5,000,000	Soybean oil

한편 국내의 경우 2005년 9월 ‘석유 및 석유대체연료 사업법’ 시행령이 공포됨에 따라 바이오디젤을 일반 경유와 같이 합법적인 연료로 인정하는 내용 등을 담은 석유 대체연료 관련 조항이 2006년 1월부터 시행되어 바이오디젤 상용화 사업을 적극적으로 실시하고 있으나 미국 등의 선진국과 비교하면 초보적 수준에 머물러 있는 실정이다. 국내에서는 바이오디젤의 원료가 되는 폐식용유, 콩, 유채가 턱없이 부족해 바이오디젤 생산 원료로 적합한 유채, 대두유 등을 전량 미국 등지에서 수입에 의존하고 있어 폐자원 활용이라는 취지가 무색한 실정이다. 또한 대두유는 가격이 높고 거대 기업집단에 의해 가격과 유통망이 장악돼 있는 문제점을 가지고 있다. 이러한 원료 작물 개발을 위하여 2000년부터 농촌진흥청 작물과학원을 중심으로 바이오디젤 원료로서 유채 품종 개발 및 재배 확대 기술을 개발하고 있으며, 일부 대학에서 농작물로부터 바이오에너지 자원 개발을 위한 연구가 진행되고 있으나 아직은 미미한 실정이다. 바이오디젤 개발에 있어서 원료가 안정적으로 확보되어야 바이오디젤의 가격경쟁력이 생겨 공급이 확산될 수 있고 국가 에너지 안보를 유지할 수 있다. 따라서 한국형 바이오디젤 원료 작물의 생산성 증대는 원료 작물의 수입대체, 가격 경쟁력 확보 및 국가 에너지 안보 유지라는

측면에서 많은 장점을 제공할 것으로 확신한다.

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

애기장대에서 발굴한 유용 유전자의 고부가가치 작물 개발에 대한 적용은 다양한 작물에서 알려지고 있다. 애기장대 *PHYB* 유전자 도입으로 감자에서 광합성 효율 및 기공의 conductance 증가를 유발하여 high intensity 조건하에서 tuber number 및 yield의 증가가 유발되었으며 이러한 표현형을 가진 고부가 형질전환 감자 품종 개발에 집중하고 있다(Boccalandro et al., 2003). 또한 미국의 Texas Tech. Univ.와 Univ. of California Davis 연구팀은 애기장대의 vacuolar sodium/proton antiporter 유전자인 *AtNHX1*을 면화에 도입하여 salt stress에 대한 저항성뿐만 아니라 필드에서 보다 양질의 fiber 생산량 증가 표현형을 가지는 우수 면화 품종 개발에 집중하고 있다(He et al., 2005). 그러나 전체적으로 바이오디젤 원료 작물인 유채와 콩의 품종 개량에 대한 유용 유전자의 적용은 아직 미미한 실정이다. 한편 본 연구팀은 생산성 증대 관련 유용 유전자의 발굴에 연구를 집중하고 있으며, 협동기관인 동아대와 건국대와 공동으로 생산성 증대 표현형질을 가지는 우량 유채 및 콩 형질전환체 개발을 진행하고 있어 본 사업의 성공에 대한 신속성 및 확신을 가지고 있다.

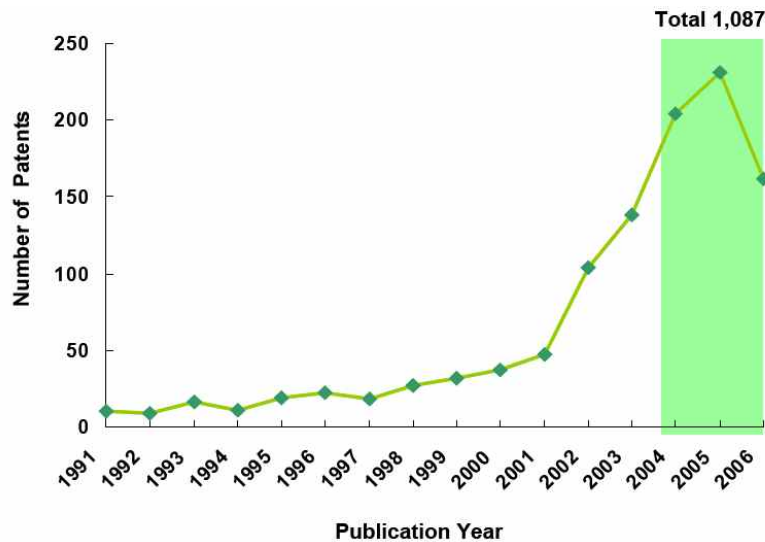


그림 5. 바이오에너지 관련 세계 특허 연도별 출원 및 등록 현황 (바이오에너지, 생명공학정책연구센터, 2006)

## 제 2 절. 국내외 특허 현황

바이오에너지 관련 국외 특허는 2000년 이후 고유가 및 기후변화협약 체결 등의 환경변화에 따라 관련 연구에 대한 관심과 기대가 급증하여 활발한 기술개발을 수행하여 관련 특허 건수가 급증하고 있는 추세이며 특허의 내용은 주로 바이오매스로부터 바이오디젤의 생산, 순수한 바이오디젤 정제에 관한 방법, 연료 첨가제로서 바이오디젤의 조성 등에 관련한 기술개발이 활발히 진행되고 있다(그림 5). 이러한 바이오에너지 주요 출원기관은 대부분 미국에 소재한 기업 및 대학으로 바이오에너지 관련 기술개발은 미국을 중심으로 추진되고 있는 것으로 나타났다. 한편 국내의 경우 바이오에너지 관련 특허 수는 충분치 않으나 세계 동향과 비슷한 양상으로 90년대 중반부터 관련 특허가 출원되기 시작하여 2000년대 들어서 매우 빠른 속도로 출원 건수가 증가하고 있다(그림 6).

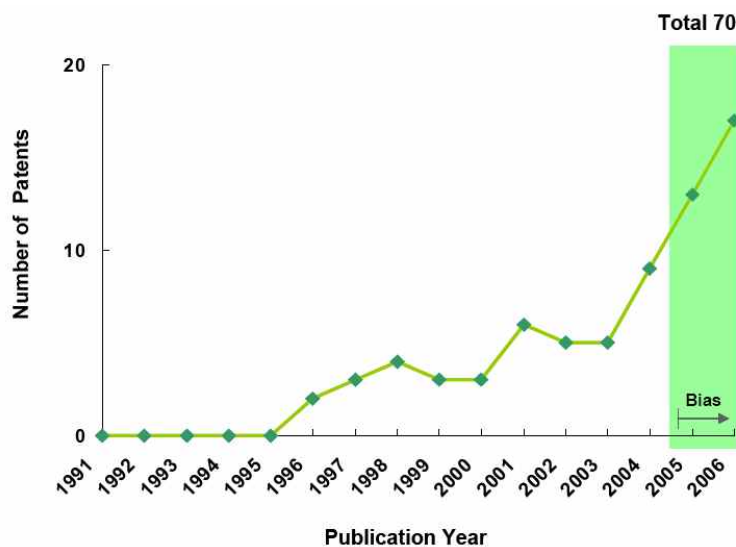


그림 6. 바이오에너지 관련 국내 특허 연도별 출원 및 등록 현황 (바이오에너지, 생명공학정책연구센터, 2006)

한편 유전자 및 형질전환체의 특허 현황을 보면 다음과 같다. 유전자 기술 분야에서 resistance와 protein and oil enhancement 분야가 다소 기복을 보이나 타 기술에 비해 특허 활동이 활발한 것으로 분석되며, resistance는 소분류로 내병성·내염성·내건성·내건성·내한성·제초제 저항성을 포함하며 90년대 후반까지 증감의 변동을 보이며 증가하는 추세를 보이다가 최근 특허 출원이 주춤하는 현상을 보인다. Yield increase에 대한 출원은 비교적 저조한 것으로 나타났다(그림 7). 형질전환 식물에 대한 특허 추이를 살펴보면, stress resistance에 대한 특허 활동이 다소 기복을 보이나 가장 활발한 것으로 나타난 반면 yield increase에 대한 활동은 비교적 저조한 것으로 나타났다(그림 8). 흥미로운 점은 바이오매스 부분에 대한 특허 출원 건수가 전체 바이오에너지 관련 특허 건수에 있어서 큰 비중을 차지하지 않지만, 논문의 경우 유전자 및 형질전환체 개발 등의 바이오매스에 대한 발표 건수가 37% 정도에 이를 정도로 집중되고 있다는 점이다. 이러한 사실은 바이오에너지 원료 작물 개발에 있어서 많은 연구가 집중되고 있음을 나타내고, 향후 이러한 바이오에너지 작물에 대한 특허 출원 건수의 급속한 증가를 유도할 것이다.

이러한 특허 출원 동향을 분석해 보면, 생산성 증대 바이오디젤 원료 작물 개발은 필수적이며, 지적소유권의 확보는 바이오디젤 개발에 있어 원천기술에 대한 국가 경쟁력 강화에 일조하며, 이를 통해 개발되는 생산성 증대 바이오디젤 원료 작물을 통하여 고부가 수익 창출로 인한 국가 농업 발전에 기여할 수 있을 것이다.

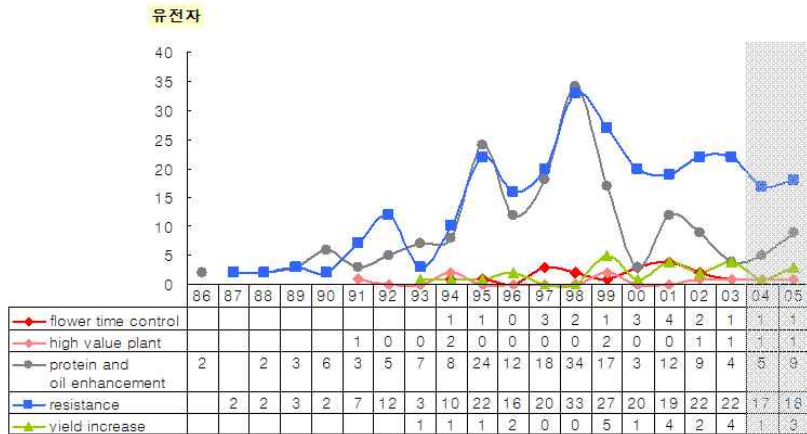


그림 7. 유전자 기술 분야에 대한 특허 연도별 출원 현황 (식물형질전환기술분야 특허 동향, 한국IP보호기술연구소, 2006)

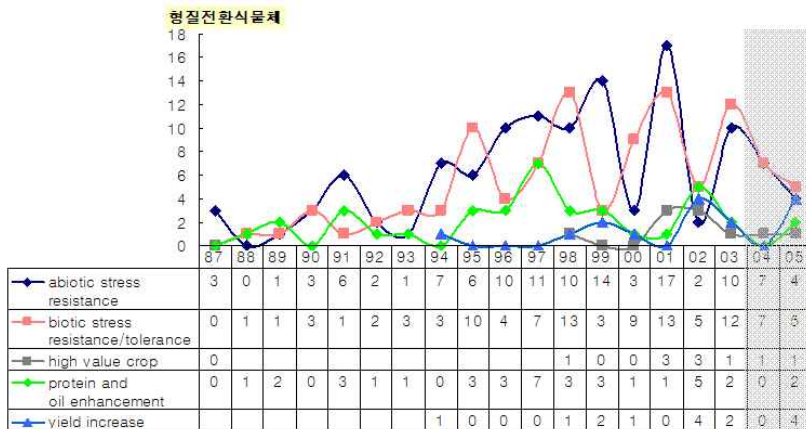


그림 8. 형질전환 식물체 개발에 대한 특허 연도별 출원 현황 (식물형질전환 기술분야 특허 동향, 한국IP보호기술연구소, 2006)

### 제 3 절. 본 과제의 기술과 관련된 선행연구 결과(본 연구팀의 선행연구)

#### 1. 기능성 유전체 연구 및 이를 통한 바이오디젤 생산 식물 개발 적용 유전자 확보 (주관 기관)

##### [기능성 유전체 연구]

주관 기관인 제노마인(주)는 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 연구를 통하여 유용 기능성 유전자의 발굴을 신속·정확하게 수행할 수 있으며, 특히 식물 proteomics를 통하여 후보 유전자의 생체 내 gene networking을 밝힐 수 있을 것이다. 확보된 유용 유전자는 벼, 잔디 등과 같은 고부가 작물에 적용하여 우량 품종 개발을 수행하고 있는 중이다. 본사에서 확보하고 있는 기능성 유전체 연구 기법은 activation tagging, promoter trapping, advanced RAM approach, 그리고 chemical mutagenesis approach 등으로 activation tagging의 경우, gain-of-function 대상 유전자의 발굴에 많은 장점을 가지고 있으며, promoter trapping의 경우, 유전자 발현을 조절할 수 있는 유용 프로모터 발굴에, advanced RAM approach의 경우, loss-of-function 대상 유전자의 발굴에, 그리고 chemical mutagenesis approach의 경우, 특정 대상 저항성 유전자의 발굴에 많은 장점을 가지고 있다. 본사에서 수행하고 있는 이러한 기능성 유전체 연구에 대한 기법은 그림 9에서 간략하게 소개되고 있다.

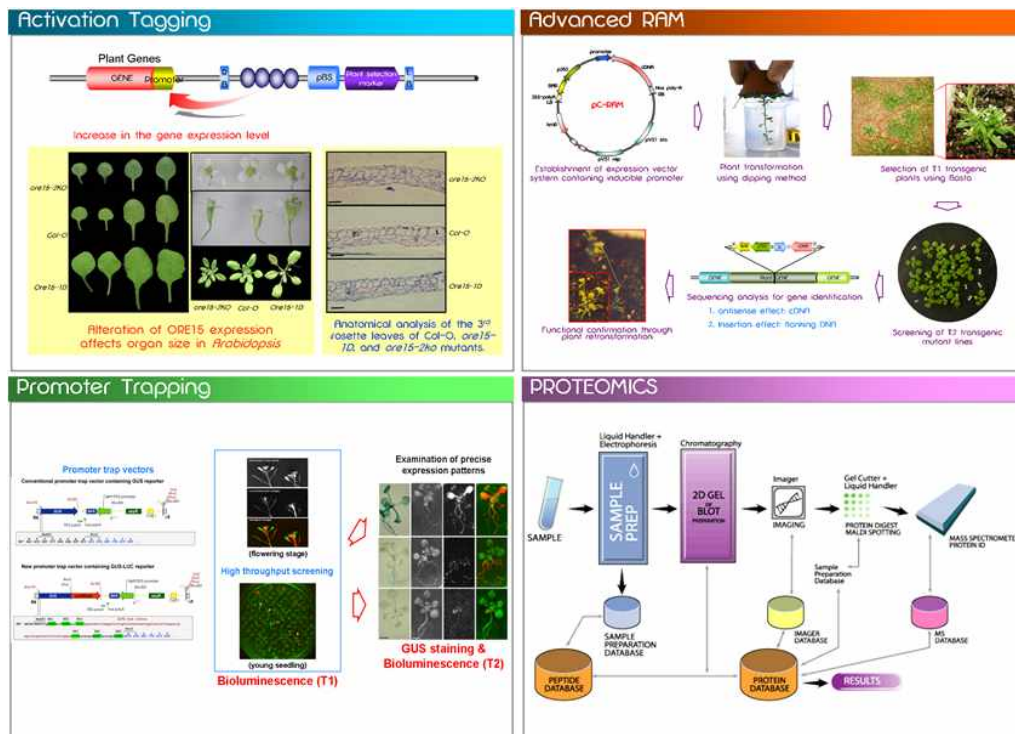


그림 9. 제노마인(주)에서 확보하고 있는 기능성 유전체 연구 기법

### [생산성 증대 관련 유용 유전자 발굴에 대한 연구 동향]

이러한 기능성 유전체 연구를 통하여 본사에서는 바이오디젤 원료 작물 개발에 적용 가능한 녹화 연장을 통한 생산성 증대 조절 유전자와 환경 스트레스에 대한 저항성을 통한 생산성 증대 조절 유전자를 확보하고 있으며, 계속적으로 발굴하고 있다.

**녹화 연장을 통한 생산성 증대 조절 유전자:** 본사에서 지적소유권 등으로 확보하고 있는 내부 환경 스트레스 저항성 관련 유용 유전자는 전사-해독 과정 및 대사과정 상위에서 관여하는 *ORE*(*ORESARA*, from Nam Hong Gil, Korean) 계열의 유전자와 최근 발굴된 *GSDL* (*Genomine Senescence Delay Line*) 계열의 유전자들이 있으며(그림 10), 이러한 노화 관련 유전자의 중요한 점은 식물체의 녹화 연장을 통하여 생산성 증대를 제공함으로써 바이오디젤 원료 작물의 고부가 가치 창출이라는 측면에서 기여도가 높을 것이다.

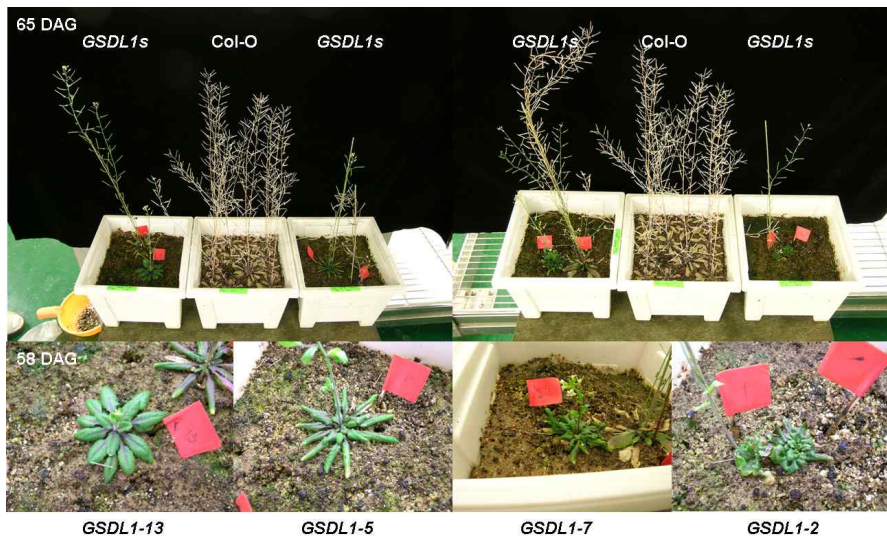


그림 10. *GSDL*에 의한 애기장대 T1 형질전환체의 녹화 연장 표현형

**외부 환경 스트레스 조절 유전자:** 본사에서 확보하고 있는 복합 환경 스트레스 저항성 관련 유용 유전자는 내건성, 내한성, 내염성 관련 유전자로 *AtSIZ* 및 *AtSIK* 등을 들 수 있다(그림 11). 이러한 외부 복합 환경 스트레스 조절 유전자는 외부 여러 스트레스에 대한 저항성을 제공함으로써 작물의 안정적인 생산성 제공 및 환경적 제한 요인에 대한 저항성 제공으로 보다 넓은 식재 공간이 가능함으로써 바이오디젤 원료 개발에 있어 다양한 적용이라는 측면에서 기여도가 높을 것이다.

그 외 본 연구팀은 광형태 형성과 개화 조절을 통한 생산성 증대 관련 유전자 혹은 광형태 형성관련 유전자의 특정 도메인의 발현을 통한 왜화 유도 유전자 등 다양한 유용 유전자를 확보하고 있으며 이러한 유전자들은 생산성 증대 바이오디젤 생산 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것이다.



# AtSIZ and AtSIK

## Stress-tolerance related genes

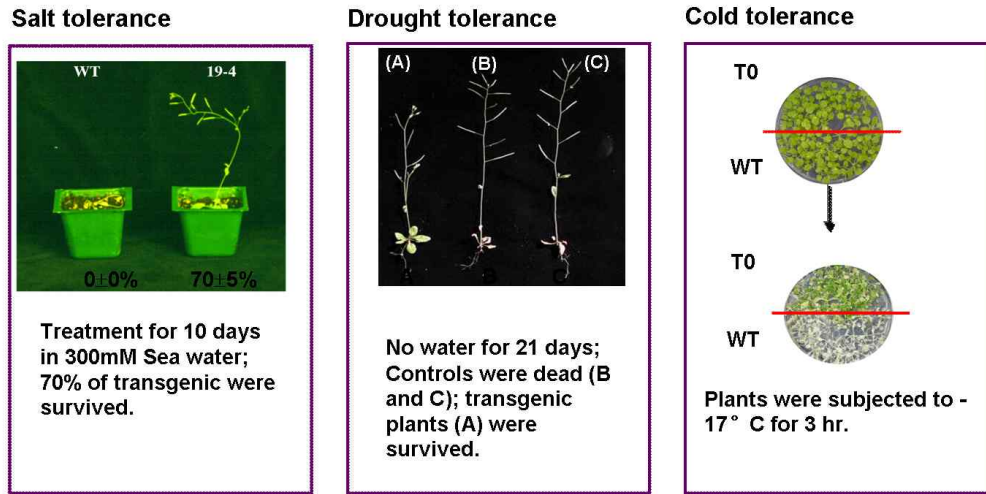


그림 11. *AtSIZ*와 *AtSIK*에 의한 애기장대 T1 형질전환체의 스트레스 저항 표현형

## 2. 콩 형질전환 기술 개발 및 형질전환체 개발 (협동 기관)

본 과제의 협동 기관인 동아대 정영수 박사 연구팀은 국내 콩 품종의 형질전환 체계를 이미 확립하여 콩 형질전환체 개발을 수행하고 있으며(그림 12), 최근 두 가지 제초제에 대하여 저항성을 가지는 항생제 마커프리 형질전환 콩 식물체 개발에 성공하여 국내 특허 출원을 하였다(대한민국 특허출원 10-2007-0137872). 또한 바이러스 저항성 및 여러 형질의 유전자를 적용하여 형질전환 콩 개발에 연구를 집중하고 있는 중이다. 이러한 형질전환 기술 및 형질전환체 개발 기술은 본 사업의 성공에 대한 초석이 될 것이다.

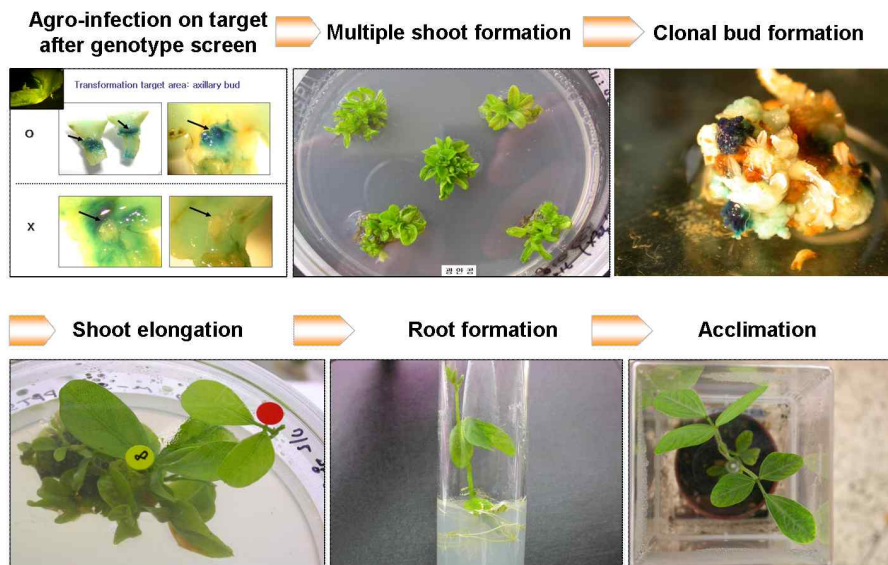


그림 12. 아그로박테리움 매개 콩 형질전환 과정

### 3. 유채 형질전환 기술 개발 및 형질전환체 개발 (협동 기관)

본 과제외의 협동 기관인 건국대 김종보 박사 연구팀은 국내 유채 품종인 유달에 대한 재분화 및 형질전환 체계를 확립하여 유채 형질전환체 개발을 수행하고 있으며(그림 13, 14), 최근 국내의 유채 품종 중 생산성 증대 형질을 가지는 영산과 내한성을 가지는 내한 품종에 대한 아그로박테리움 매개 혹은 유전자총을 통한 형질전환 시스템을 구축하고 있는 중이다. 이러한 형질전환 기술을 통하여 제초제 저항성 유채 품종 개발 및 녹화 연장 유채 품종 개발을 진행하고 있다. 이러한 선행 기술 및 연구는 본 사업의 성공에 대한 초석이 될 것으로 확신한다.

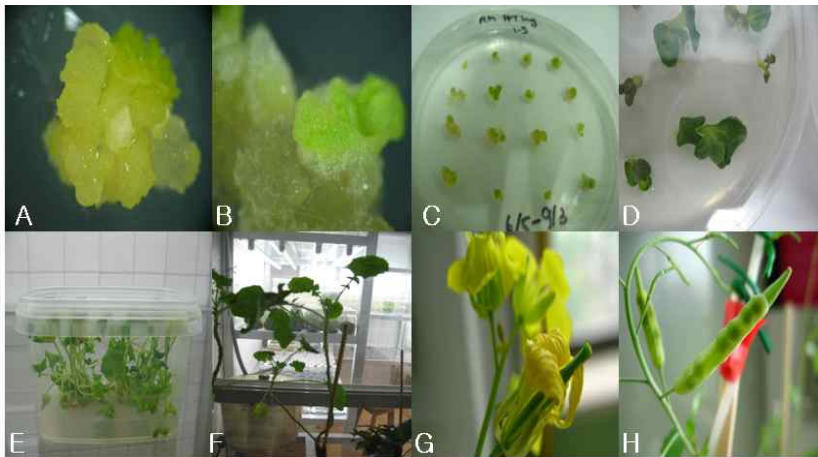


그림 13. 유채 재분화 체계 확립. A: 배축과 줄기에서 나온 배발생 캘러스 B: 체세포배의 발아  
C: 재분화 되는 싹초 D: 자엽 2-3매 상태의 기내 소식물체 E: 초장 5-8cm 기내 식물체  
F: 순화상태의 유채식물체 G: 개화 F: 종자 결실

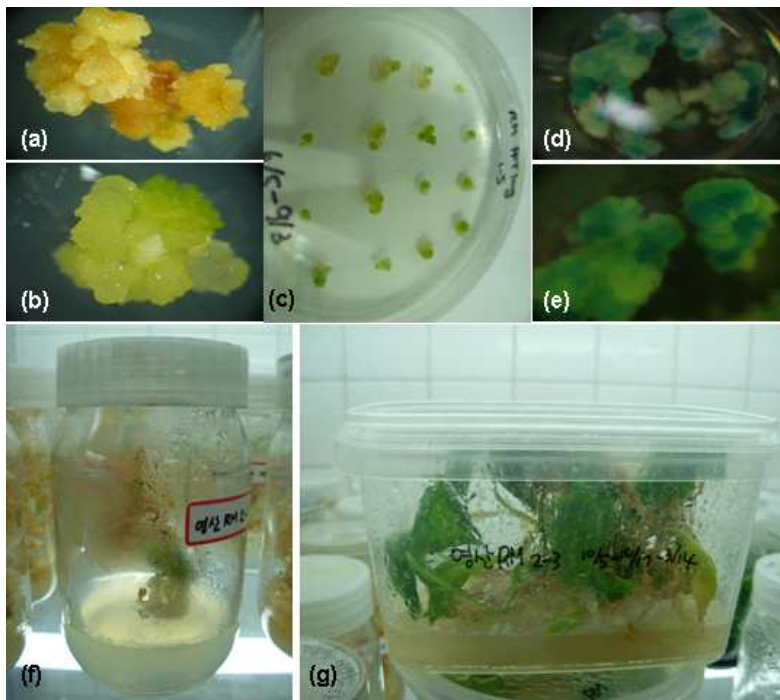


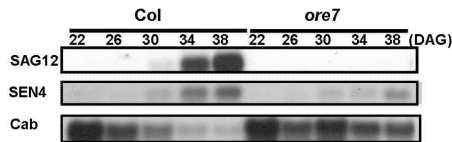
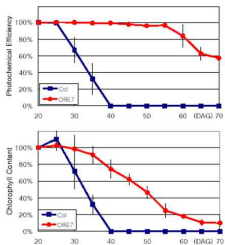
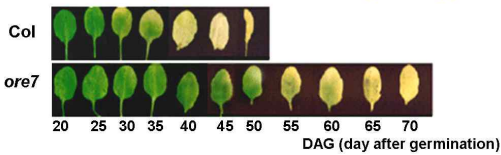
그림 14. 아그로박테리움 매개 유채 형질전환 과정

#### 4. 유용 유전자 도입을 통한 콩과 유채 품종 개발 (주관 및 협동 기관 공동연구)

주관 기관인 제노마인(주)과 협동 기관인 동아대는 공동으로 생산성 증대 콩 품종을 개발하기 위하여 주관 기관이 확보하고 있는 녹화 연장 유전자인 *ORE7*(그림 15)과 스트레스 저항성 유전자인 *AtSIZ1*(그림 11 참조)를 협동 기관이 보유하고 있는 콩 형질전환 기술에 적용하여 형질 전환체 개발을 수행하고 있다. *ORE7*이 적용된 형질전환체 개발의 경우 현재 성공적인 형질 전환을 통하여 형질전환체의 생육을 진행하고 있으며 일부 라인은 종자 수확 후 T1 screening을 수행하고 있는 중이다(그림 16).

### ORE7

#### ❖ The age-dependent senescence phenotype



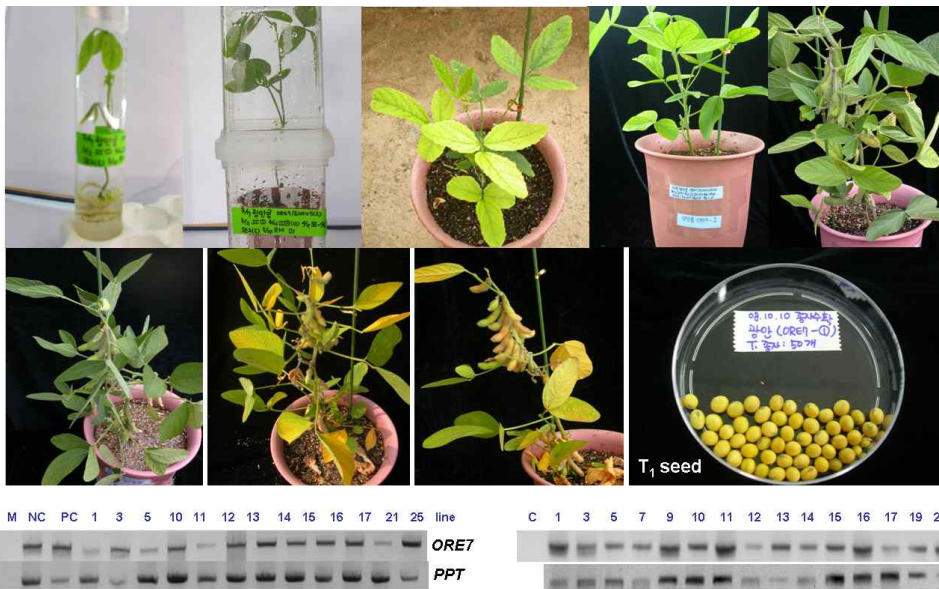
Increased leaf longevity during age-dependent senescence

#### ❖ The extended shelf life of ore7 cut flower



Overexpression of *ORE7* induces the yield increase of higher plants as well as increased leaf longevity during age-dependent senescence.

그림 15. *ORE7*에 의한 애기장대 형질전환체의 녹화 연장 및 생산성 증대 표현형



Insert confirmation of transgenic plants using PCR

Gene expression confirmation of transgenic plants using RT-PCR

그림 16. *ORE7* 적용 콩 형질전환체의 life cycle 및 PCR/RT-PCR을 통한 형질전환체 확인

또한 주관 기관인 제노마인(주)와 협동 기관인 건국대는 공동으로 생산성 증대 유체 품종을 개발하기 위하여 주관 기관이 확보하고 있는 녹화 연장 유전자인 *ORE7*과 스트레스 저항성 유전자인 *AtSIZ*에 대한 발현 벡터 construct를 제작하여 협동 기관이 보유하고 있는 유체 형질전환 기술에 적용하여 형질전환 및 형질전환체 개발을 수행하고 있다(그림 17). 이러한 선행 연구는 본 사업의 성공에 대한 신속성 및 확신을 제공할 것이다.

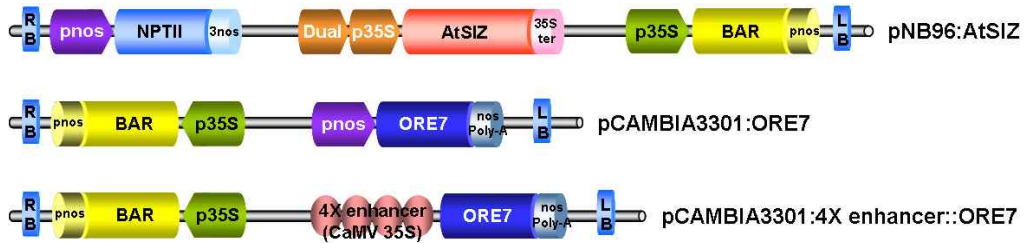


그림 17. *ORE7*과 *AtSIZ*에 대한 유체 형질전환용 발현 벡터

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절. 연구개발수행 내용 및 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
유용 유전자 발굴 및 기능 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plant Functional Genomics</li> <li>Direct Approach</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Activation tagging, Advanced RAM approach, Promoter trapping (주1)</li> <li>적용 변이체 선별 (주2)</li> <li>유전자 발굴 및 기능 검증 (주3)</li> </ul>
형질전환체 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>형질전환 벡터</li> <li>형질전환</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>형질전환 벡터 construct 제작 (주4)</li> <li>콩 형질전환 (주5)</li> <li>유채 형질전환 (주6)</li> </ul>
형질전환체 기능 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>형질전환체 유전자 발현 분석</li> <li>형질전환체 기능 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>PCR/Southern blot, RT-PCR/qRT-PCR/Northern blot 등 (주7)</li> <li>형질전환체 스트레스 저항성 및 생산성 증대 기능 분석 (주8)</li> </ul>

### 주1) Plant Functional Genomics

생산성 증대 유용 유전자를 발굴하기 위하여 본 연구팀은 advanced RAM approach, activation tagging, promoter trapping 등과 같은 식물 기능성유전체 연구(plant functional genomics)를 적용하여 녹화 연장 및 스트레스 저항성 변이체를 선별하였으며, 선별된 변이체로부터 유용 유전자를 발굴하고, 발굴된 유전자의 molecular profiling을 밝히기 위하여 proteomics 기법을 접목하였다. 적용된 기능성 유전체 연구의 기법은 그림 18과 같다.

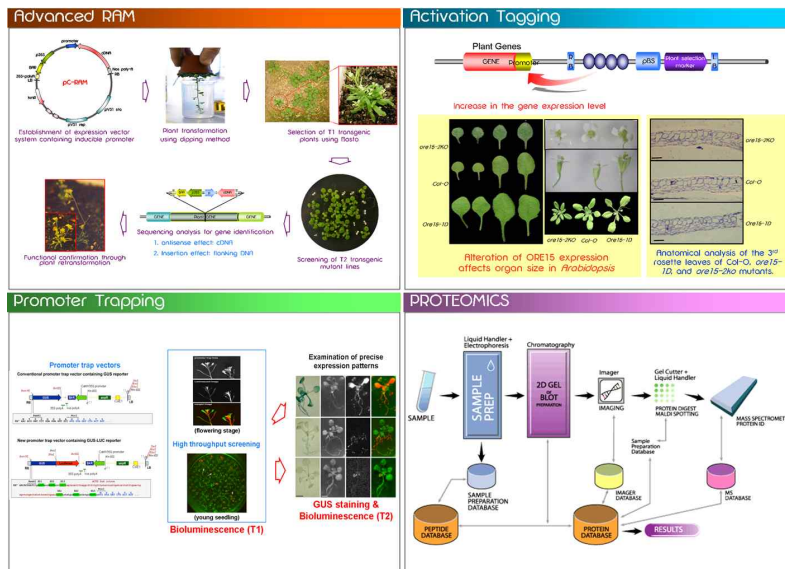


그림 18. 본 연구를 위해 적용된 식물 기능성 유전체 연구

## 주2) 적용 변이체 선별

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

## 주3) 유전자 발굴 및 기능 검정

확보된 변이체로부터 각 기법에 적절한 방법을 통하여 유전자 정보를 확보하고 이중 녹화 연장 및 다양한 환경 스트레스 저항성 조절 등과 관련된 신기능성 유용 유전자의 가치를 가지는 유전자를 선별하였다. 일반적으로 activation tagging 변이체 pool에서 확보된 변이체의 유전자 분리는 주로 TAIL-PCR을 수행하여 얻어지며, promoter trapping 변이체 pool에서 확보된 변이체의 유전자 분리는 plasmid rescue를 통하여, 그리고 advanced RAM 변이체 pool에서 얻어진 변이체의 유전자 분리는 inverse PCR을 통하여 얻어진다. 선별된 유전자의 기능을 재검정하기 위하여 reverse genetics를 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 강화하였다.

녹화 연장 조절 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등) 등에 대한 반응도 조사하였다.

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

## 주4) 형질전환 벡터 construct 제작

기본적으로 쌍자엽 식물인 콩과 유체에 적용 가능하고 형질전환체 선별에 있어서 보다 용이한 제조제를 선발마커로 사용 가능한 pCAMBIA3301과 Gateway system의 pB2GW7을 사용하였다. 이러한 기존 벡터는 constitute 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 벡터를 사용하였다. 한편 유전자 발현을 보다 강력하게 하기 위하여 ORE7-유체 형질전환체 개발에 있어서 CaMV 35S promoter 대신 activation tagging 벡터에 적용된 4X 35S enhancer를 적용하여 벡터 construct를 제작하였으며, 또한 ORE12 유전자 적용의 경우, 2개의 35S promoter 기능을 가지는 pNB96 벡터를 사용하였다.

### 주5) 콩 형질전환 (그림 19)

침지해 놓은 종자의 양 떡잎 사이로 scalpel를 넣어 하배축까지 수직으로 자르고 종피를 제거하였다. Hypocotyl을 떡잎 밑 약 1 cm되는 곳에서 자른 후 embryonic axis가 붙어있는 한 쪽을 scalpel로 7-8회 정도 상처를 내었다. 이 때 scalpel에 5 mL 농축액을 묻힌 다음 target 부위에 상처를 내었다. 대략 50개 정도의 explant를 15 mL co-cultivation/A. tumefaciens에 넣고 sonication 20초, 테시게이터와 다이어프램 펌프 (GAST사)를 이용해 vacuum 30초 (500 mm.Hg) 처리를 한 뒤 30분 동안 접종시켰다. Explant를 tube에서 꺼내 멸균한 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤, filter paper를 한 장 깔고 10 개체를 올려두었다(adaxial side down). Micropore로 봉한 뒤 25 °C, 18시간 광주기에 5일 동안 공배양하였다.

5일간 co-cultivation 후에 제균을 위해서 cefotaxime 250 mg/L, vancomycin 50 mg/L 그리고 ticarcillin 100 mg/L을 사용하였으며, 이 후 explant를 filter paper 위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 SI(shoot induction)-① 배지에 한 plate당 5개체씩 hypocotyl 부분이 배지에 고착되고 재분화 될 부분이 30° 정도의 각도로 flat side가 위로 향하도록 치상하였다. 각각의 plate를 micropore로 봉한 뒤 25 °C, 18시간 광주기에서 배양시켰다. 2주 후 shoot이 나온 explant를 선발항생제 PPT 10 mg /L가 들어있는 SI-② 배지에 치상하였는데, 이때 shoot을 제외한 나머지 부분은 잘라버리고 adaxial side down으로 치상하였다. 2주 후 갈변한 shoot/shoot pad는 scalpel로 깎아 선발항생제 PPT 5 mg /L가 들어있는 SEM(shoot elongation medium) 배지에 치상하였다. 2주 마다 새로운 SEM 배지로 옮겨주면서 shoot의 갈변부위는 덜 뾰족한 scalpel 윗면으로 쳐서 제거하고 shoot pad는 조금씩 계속 깎아내어 배지가 잘 흡수되도록 하였다. 이후 선발을 거치면서 신장된 shoot가 4 cm 이상일 때 RM 배지에서 뿌리 분화를 유도하였다.

1-2주가 경과한 후 2개 이상의 뿌리가 나오면 3차 증류수로 배지를 씻어내고 상토와 버미큘라이트를 2:1로 섞어 넣은 small pot(6 cm × 6 cm × 5.6 cm)에 심었다. 이 small pot는 다시 Magenta box 안에 넣어 25 °C, 18시간 광주기에서 성장시켰다. 10일 정도 경과 후 잎 표면에 100 mg/L DL-PPT로 leaf painting을 하였다. Leaf painting으로 유전자 도입을 확인한 식물체를 big pot로 옮겨 심고 투명한 플라스틱 덮개에 2, 4, 10개의 구멍을 만들어 3일 마다 개수가 적은 것에서부터 많은 것으로 바뀌어서 씩웠다. 10일 후 식물체에 basta(BAYER사)처리를 하고 단일처리(8시간 명조건, 16시간 암조건, 종이 box 이용)로 화아 분화를 유도하여 개화시켰다. Basta 처리를 하여 저항성을 나타내는 형질전환체를 온실로 옮기고 종자를 수확한다.

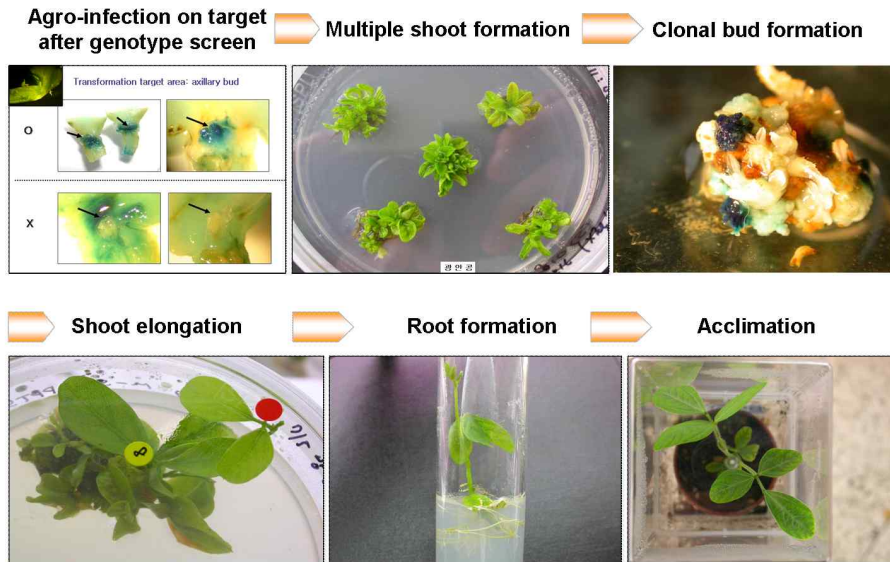


그림 19. 아그로박테리움 매개 콩 형질전환 과정

### 주6) 유채 형질전환 (그림 20과 21)

이미 확립된 고효율의 재생력을 지닌 유채의 자엽 혹은 유묘의 배축 유래 캘러스 분화조건으로 유전자 형질전환용 재료로서 유지, 증식하였다. 유용 유전자가 포함된 플라스미드가 들어 있는 아그로박테리움과 유채 캘러스를 3일간 1.962 mg/L의 acetosyringone이 함유되어 있는 GEM 배지에서 공동 배양한 후 cefotaxime과 vancomycin으로 agrobacterium을 제거하였다. 균이 제거된 캘러스는 5 mg/L의 PPT가 첨가된 shoot 유도 배지에 치상하여 shoot를 유도한 후, 뿌리 배지에 치상하여 배양시킨 후 순화과정을 거쳐 온실 내에서 재배하였다.

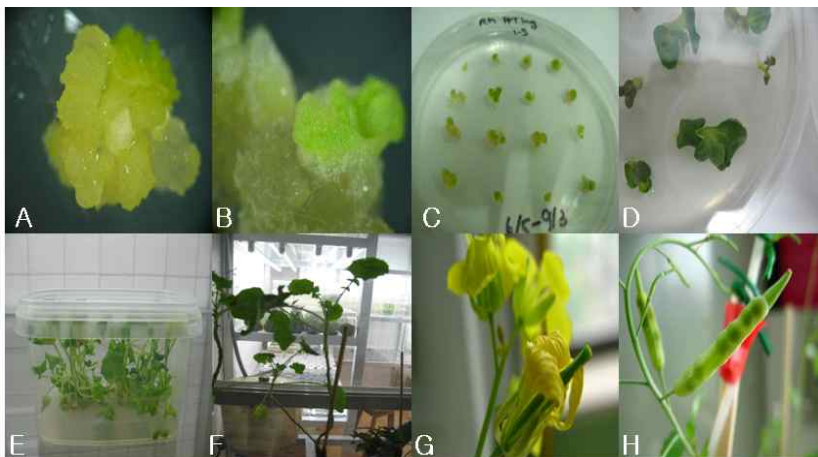


그림 20. 유채 재분화 체계 확립. A: 배축과 줄기에서 나온 배발생 캘러스, B: 체세포배의 발아, C: 재분화 되는 싹, D: 자엽 2-3매 상태의 기내 소식물체, E: 초장 5-8cm 기내 식물체, F: 순화상태의 유채 식물체, G: 개화, H: 종자 결실



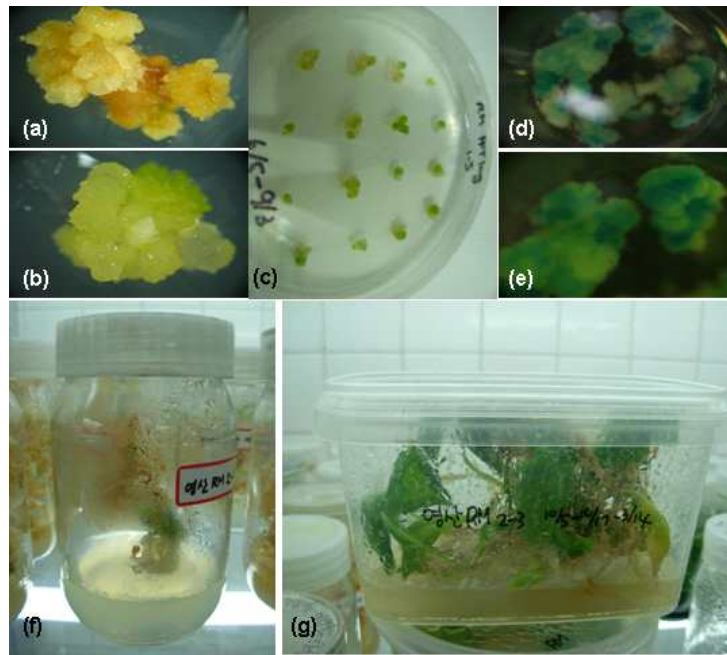


그림 21. 아그로박테리움 매개 유체 형질전환 과정

### 주7) 형질전환체 유전자 발현 분석

형질전환된 식물체를 제초제 PPT로 선별한 후 형질전환 콩과 유체는 일차적으로 PCR 기법 혹은 Southern blot을 통하여 유전자 삽입을 확인하고, RT-PCR/qRT-PCR 혹은 Northern blot을 통하여 도입 유전자의 발현을 확인하였다. 확인한 형질전환 식물체로부터 종자를 수확한 후, T1 screening을 통하여 표현형질을 분석하였다.

### 주8) 형질전환체 기능 분석

형질전환체의 표현형질에 대한 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 처리 뿐만 아니라 methyl jasmonate, ABA, ethylene, oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등) 등에 대한 반응도 조사하였다. 외부 환경 스트레스 저항성 관련 변이체의 기능 검정은 변이체를 다양한 스트레스 조건(drought stress, cold stress, salt stress, oxidative stress, etc)하에 일정 기간 방치한 후 그들의 표현형적 특징 및 생리·생화학적 특성을 조사하였다. 이후 형질전환체는 온실 및 간이 포장 검정을 통하여 이러한 형질로 인하여 생산성 증대가 유발하였는지를 광합성 효율, 개체 생존율, 바이오매스 증가, 종자 수확량 증가 혹은 종자 크기의 증가 등과 같은 분석을 수행하여 실용화의 가능성을 탐색하였다. 변형식물안정성 관리에 대한 방안은 현재 과제를 통하여 만들어진 콩 변형체(GMO)들이 모두 오창에 있는 생명공학원 안정성평가 센터에서 재배가 되고 있으며, 매년 정부기준에 의거하여 관리되고 있다. 2, 3차년도에 1, 2차 포장시험을 생명공학원 안정성 평가팀과 수행하였다. 이와 같은 표현형 검정을 통해 선별된 품종들의 생리·생화학적 기능 분석을 통하여 생산성 증대 바이오디젤 원료 형질전환체를 개발하였다.

## 제 2 절. 생산성 증대 관련 유용 유전자 발굴

### 1. 기확보 유전자 기능 재검정

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

#### 가. *AtSIZ*(Salt-inducible zinc finger, At2g40140):

Salt stress 저항성 유전자인 *AtSIZ*의 기능을 재검정하기 위하여 본 연구팀은 애기장대 야생형(WT)과 *AtSIZ* knock-out 변이체(mt), 그리고 knock-out 변이체에 *AtSIZ*를 삽입하여 그 기능을 회복시킨 변이체(mt/*AtSIZ*)의 잎에 NaCl을 처리한 결과, mt 변이체는 salt stress에 아주 민감한 것으로 나타났으며, 이러한 표현형은 mt/*AtSIZ* 변이체에서는 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 이러한 *AtSIZ* 유전자가 salt stress 저항성을 제공하는지를 확인하기 위하여 과발현 변이체(19-4)를 제작하여 300 mM NaCl을 처리한 결과, 본 변이체가 salt stress에 내성이 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 *AtSIZ*는 또한 건조 스트레스에 있어서도 저항성이 있음을 건조 처리에 의해 확인할 수 있었다(그림 22).

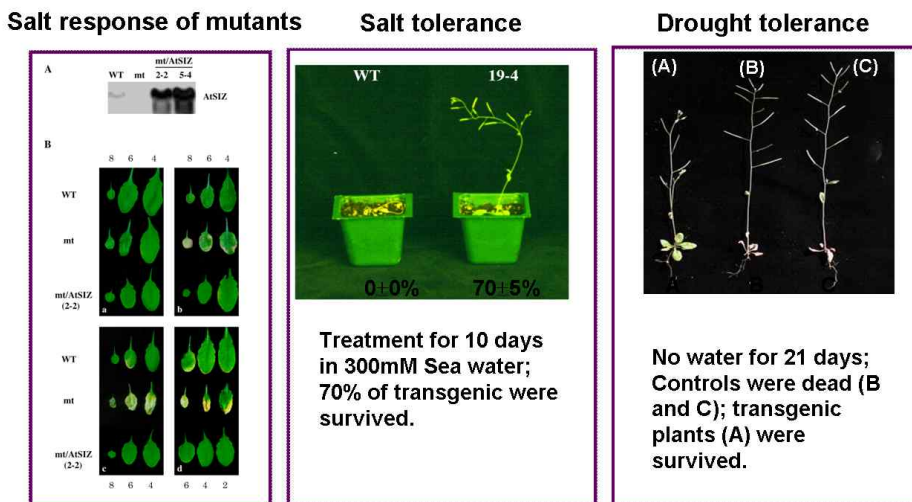


그림 22. *AtSIZ* 유전자의 knock-out 및 과발현에 의한 표현형적 특징

#### 나. *ORE7*(Oresara7, At1g20900):

식물의 노화 지연에 대한 표현형적 특징을 가지는 *ORE7*의 기능을 재검정하기 위하여 본 연구팀은 *ORE7* 과발현 애기장대를 제작하고 그들의 노화 지연 및 생산성 증대에 대한 표현형을 조사하였다. *ORE7* 과발현 애기장대(*ore7*)는 야생형(Col)에 비하여 노화 지연뿐만 아니라 종자 생산량의 증가를 유발하였다(그림 23). 애기장대 야생형과 *ore7*의 종자 크기를 비교해 보았을 때 큰 차이를 나타내지 않았다. 그림 23 오른쪽 그림에서 나타내는 개체당 종자 생산량의 증가는 종자의 크기에 의해서가 아닌 종자의 개수 증가를 의미한다. 한편 본 유전자는 흥미롭게도 국화에 있어서도 노화 지연 표현형적 특징을 유발하였다(전북농업기술원 공동연구). *ORE7*으로 형질전환된 국화 잎을 detach하여 암 처리 동안 그들의 표현형적 특징을 분석한 결과, 야생형에 비하여 현저하게 녹화 연장이 유발되며 또한 ion leakage에 있어서도 현저히 감소함을

볼 수 있었다(그림 24). 따라서 본 유전자는 타 작물 적용에 있어서 노화지연이라는 표현형적 특징을 유발하여 생산성 증대 효과를 제공하는데 있어서 많은 장점을 제공하리라 판단된다.

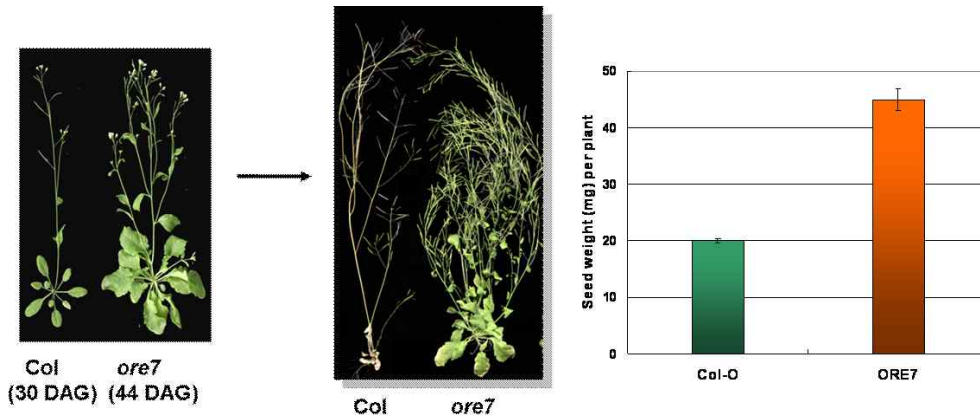


그림 23. ORE7 과발현 변이체의 노화지연 및 생산성 증대(종자 수확량 증대)에 대한 표현형적 특징

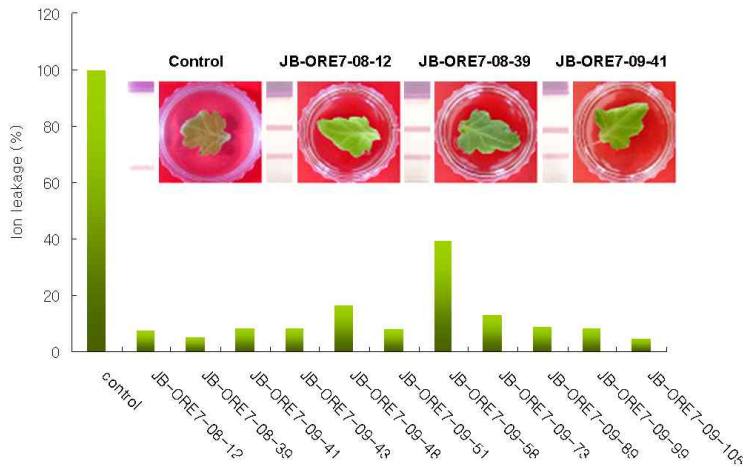


그림 24. ORE7 과발현 국화 변이체의 40일 동안 암 처리된 detach 잎의 ion leakage 및 표현형적 특징

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

식물의 노화 지연에 대한 표현형적 특징을 가지는 *ORE12*와 *ORE15*의 기능을 재검정하기 위하여 본 연구팀은 *ORE12*와 *ORE15* 과발현 애기장대를 제작하고 그들의 노화 지연에 대한 표현형을 조사한 결과, *ORE15* 과발현 애기장대는 노화 지연과 더불어 성장 촉진, 식물 기관의 크기 증가 등과 같은 표현형적 특징을 가졌으며, *ORE12* 유전자의 경우 노화 지연에 대한 표현형적 특징, 특히 절화 식물에 대한 노화 지연 표현형적 특징을 유발하였다(data not shown).

기확보 유전자의 기능 재검정 결과, 이들은 모두 스트레스 저항성, 개체크기 증가, 노화 지연 등과 같은 생산성 증대 표현형질을 가지므로 본 연구팀은 이를 콩과 유체에 도입하여 형질전환체를 생산, 개발하였다.

## 2. 생산성 증대 신규 유용 유전자 발굴:

기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 변이체로부터 생산성 증대, 노화 지연 혹은 스트레스 저항성에 대한 표현형적 특징을 가지는 신규 유전자 7종을 발굴하여 그들의 기능을 검정하였다.

### 가. *ATHG1*(AT-hook protein of Genomine 1, At4g19800): 녹기연장, 생산성 증대 및 스트레스 저항성 유전자

① 식물의 노화 조절 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATHG1* 발굴: 본 연구팀은 advanced RAM 변이체로부터 얻어진 유용 기능성 유전자 후보에서 신기능성 유용 유전자를 발굴하기 위하여 전사인자 등 식물 생장·발달 조절관련 유전자에 대한 sense and/or antisense construct를 제작하고 이를 애기장대에 도입하여, 변이체의 표현형적 기능 분석 및 유전자의 기능 분석을 수행하였다. 선별된 유전자 중 At4G17800 유전자의 과발현은 T1 형질전환 식물체에서 현저한 노화 지연이라는 표현형적 특징을 유도하였다. 본 연구팀은 At4G17800 유전자를 *ATHG1*(AT-hook protein of Genomine 1)으로 명명하였으며, 본 유전자의 과발현에 의한 표현형적 변이는 노화 지연 표현형적 특징을 가지는 기존의 ORE7과 유사하여, 노화관련 유전자인 것으로 추측된다. 따라서 본 연구팀은 상기 변이체로부터 T2 라인을 확보하여 노화 연장에 대한 보다 심도 있는 기능 분석을 수행하였다.

pCSEN-*ATHG1* 벡터(그림 25A)로 형질전환된 T<sub>1</sub> 애기장대 *ATHG1 ox-a* 및 *-b*는 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-a* 및 *-b* 변이체들이 노화 지연의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 형질전환 개체에서 이러한 노화 지연 현상의 정도의 차이는 유전자의 과발현이 개체마다 다르게 나타남에 기인하는 것으로 판단된다(그림 25B). 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T<sub>1</sub> 형질전환 애기장대로부터 T<sub>2</sub> 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 제초제 저항성으로 선별된 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 60일째 수행하였다(그림 25C). pCSEN-*ATHG1* 구상체를 가지고 있는 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체 라인은 애기장대 야생형(Col-0)과 비교하여 볼 때, T<sub>1</sub> 변이체와 마찬가지로 식물체의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 이러한 노화 지연 현상은 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 유전자의 과발현이 라인마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 아울러 이들 변이체들은 노화 지연 표현형뿐만 아니라 노화 지연동안 개체 크기와 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이와 같은 변이체의 노화 지연 현상은 *ATHG1* 유전자의 AT-hook domain에 의한 chromatin alteration을 통하여 유도되는 것으로 판단된다.

*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 25D). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대

라는 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 *ACT8*을 양성대조구로 하여 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 25E), 이러한 사실은 본 변이체가 *ATHG1* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

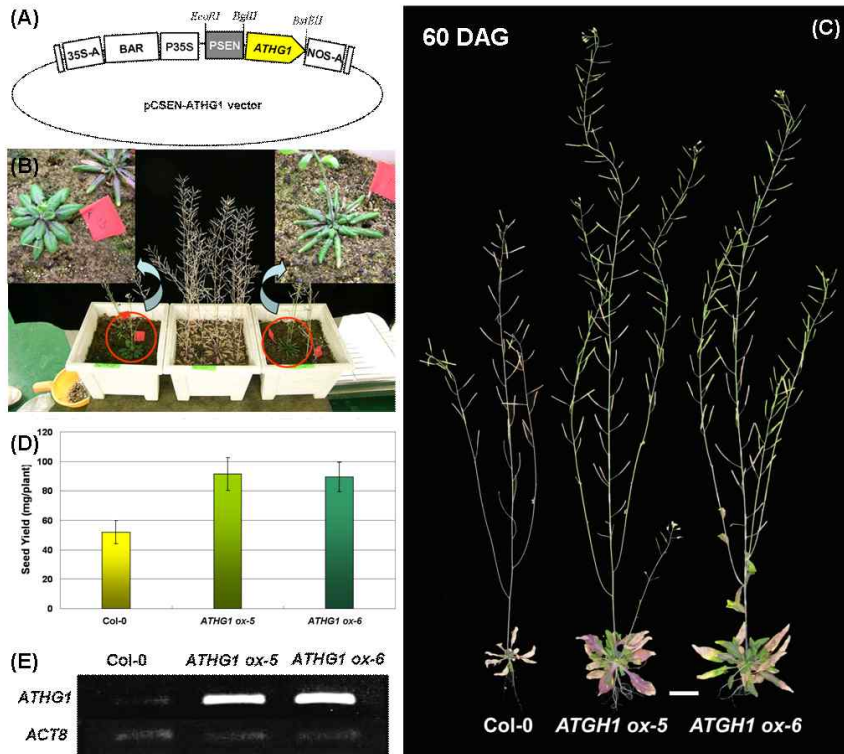


그림 25. *ATHG1* 과발현 벡터(A) 및 형질전환체의 표현형적 특징(B, C), 종자수확량,  $n=20$  (D), 그리고 유전자 발현, 양성대조구는 *ACT8*(E)

② *ATHG1* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 대한 특성 분석: *ATHG1* 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T<sub>2</sub> 세대에서 발아 후 25일 이후부터 3-4번 좌엽(rosette 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 -6의 경우 잎의 황화 현상이 55일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 60일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(그림 26A). 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 -6의 경우 발아 후 55일이 되었을 때도 측정 초기의 40%

이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다(그림 26B). 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 26C). 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 발현도 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 26D). 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.

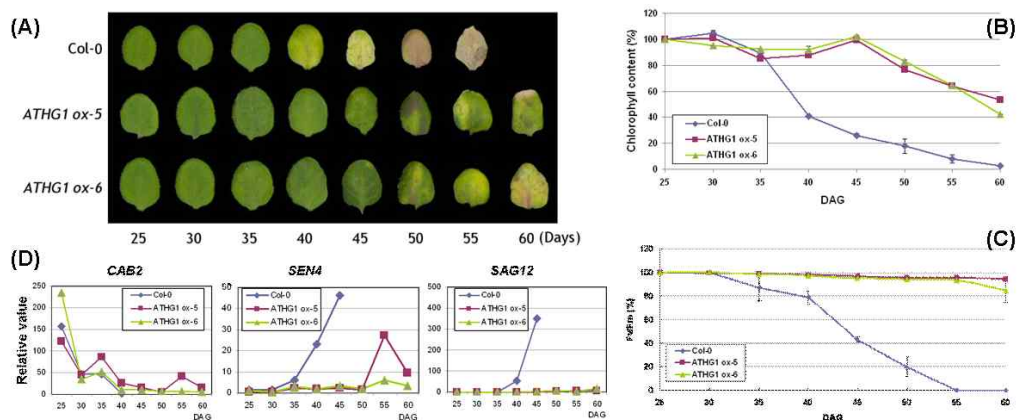


그림 26. *ATHG1* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, n=6(B), 광합성 효율, n=6(C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT8*당 각 유전자 발현의 relative level(D)

③ *ATHG1* 과발현 변이체의 암-유도 노화에 대한 특성 분석: 노화를 촉진한다고 알려진 암 처리에 대한 *ATHG1* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T<sub>2</sub> 세대 에서 발아 후 25일째 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, 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 상기와 동일한 방법으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암 처리 후 4일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 8일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATHG1 ox-5*와 *-6*의 경우 잎의 황화 현상이 12일 이후부터 나타났고 있음을 확인할 수 있었다(그림 27A). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암 처리 후 6일 이후 급격한 감소를 보여 암 처리하지 않은 상태의 약 10% 정도의 수치를 나타냈으나, *ATHG1 ox-5*와 *-6*의 경우, 6일째에도 50% 이상의 엽록소 함량을 나타냈다(그림 27B). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 *ATHG1* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(그림 27C). 또한, 노화분자 지표인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현 양상을 조사한 결과, 야생형이 암 처리 후 6일째 *SEN4*와 *SAG12*의 발현이 현저히 증가하는데 비해, *ATHG1* 과발현 변이체는 암 처리 기간 동안 지속적으로 노화분자 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*의 발현이 현저히 억제되는 것을 볼 수 있었다(그림 27D).

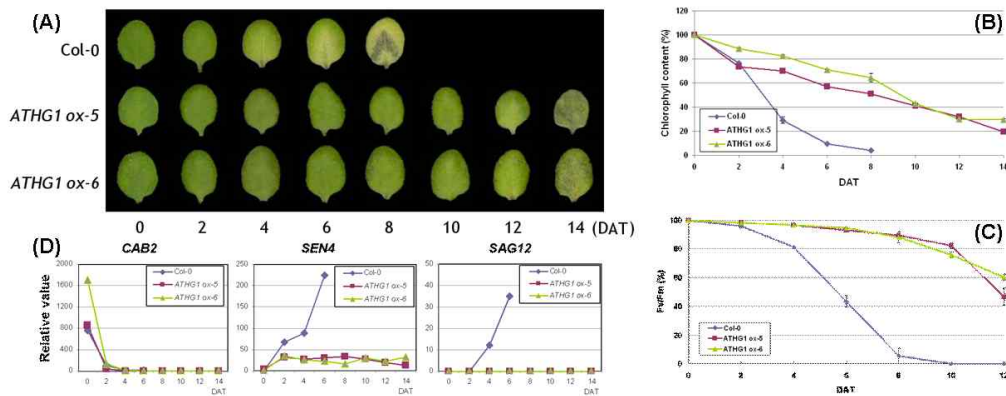


그림 27. *ATHG1* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, n=6(B), 광합성 효율, n=6(C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT*당 각 유전자 발현의 relative level(D)

④ *ATHG1* 과발현 변이체의 세포 사멸 및 스트레스에 대한 특성 분석: *ATHG1* 과발현 변이체의 노화 진행에 따른 세포 사멸 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 축적을 분석하기 위하여 T<sub>2</sub> 세대에서 발아 후 25일째 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 detach하여 6일간 암 상태에서 염색하였으며, 매 2일 간격으로 현미경 하에서 관찰하였다. 세포 사멸 분석은 TB(0.05% Lactophenol-Trypan blue) 염색 방법을 사용하였으며(Koch and Slusarenko, 1990), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 축적에 대한 분석은 DAB (3,3'-diaminobenzidine-4HCl, 0.05%, pH 5.8) 염색 방법(Thordal-Christensen et al, 1997)을 사용하

여 현미경 하에서 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후 잎의 세포 사멸 및  $H_2O_2$ 의 축적이 급격하게 일어나 6일째 최대치를 이루었다. 이러한 사실은 잎의 노화 진행은 세포 사멸과 더불어 ROS의 축적, 특히  $H_2O_2$ 의 축적을 유발한다는 것을 알려주고 있다. 한편 *ATHG1* 과발현 변이체에서는 암처리 동안 세포 사멸 및  $H_2O_2$ 의 축적이 현저히 지연됨을 보여 주었다(그림 28A와 B). 따라서 *ATHG1*은 식물의 노화 지연을 통하여 세포 사멸 및  $H_2O_2$ 의 축적 지연을 유발하는 것으로 판단된다. *ATHG1* 과발현 변이체에서 나타나는 식물 잎의 노화 동안 유발되는  $H_2O_2$ 의 축적 감소가 실질적으로 외부 환경 스트레스의 하나인 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공하는지를 확인하기 위하여 외부  $H_2O_2$  스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형의 경우  $H_2O_2$  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 28C와 D). 이러한 사실은 *ATHG1*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

한편 본 유전자가 가뭄스트레스에 대해서도 저항성을 제공하는지를 확인하기 위하여 발아 후 30일된 *ATHG1*의 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 28E와 F). 이러한 사실은 *ATHG1*이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

**⑤ *ATHG1* 유전자의 세포내 위치 및 chromatin architecture에 대한 기능:** *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 p*ATHG1*-GFP 벡터를 제작하였다. 이후 *ATHG1*의 세포내 위치를 확인하기 위해서 p*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 29A). 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 29B). 이는 *ATHG1* 단백질이 핵으로 이동되어 핵 속에서 기능을 수행한다는 것을 보여주는 것이다.



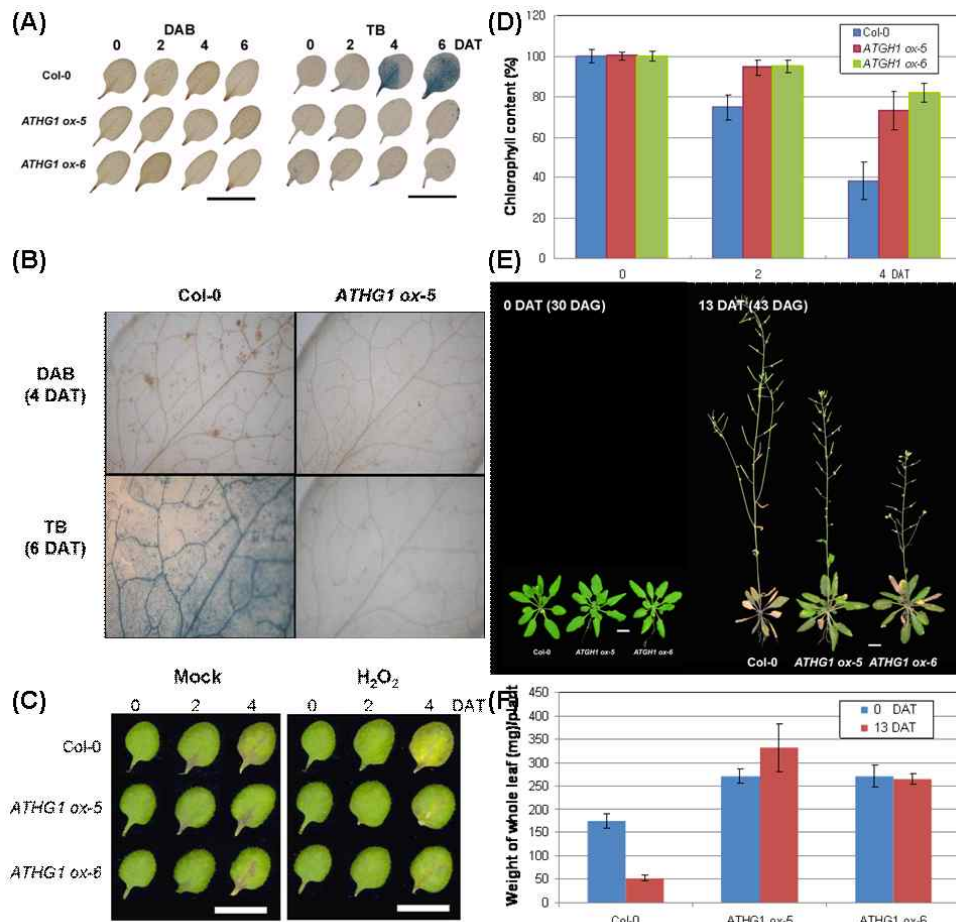


그림 28. *ATHG1* 과발현 형질전환체의 세포 사멸(A와 B), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 스트레스에 대한 표현형적 특징(C) 및 엽록소 함량, n=6(D), 그리고 가뭄 스트레스에 대한 표현형적 특징(E) 및 잎 무게 변화, n=6(F)

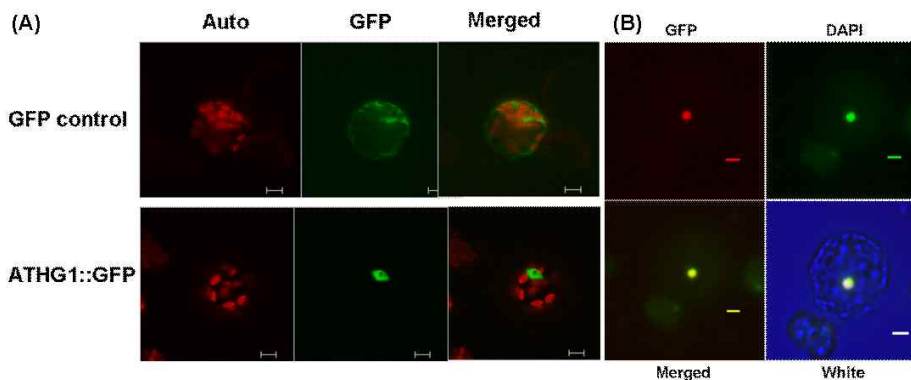


그림 29. Reporter 유전자 GFP를 이용한 *ATHG1*의 세포내 위치(A)와 DAPI를 통한 핵내 발현 확인(B)

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 담당하는지는 조사하기 위하여 H2B-GFP 융합 단백질을 발현하는 형질전환체를 생산하고, *ATHG ox* 변이체와 교배하였다. 앞선 암처리에 의해 노화의 결과와 마찬가지로 융합 과발현 변이체는 대조구에 비하여 노화 지연에 대한 표현형적 특징이 뚜렷하였다(그

림 30A). 이러한 노화 과정의 진행 동안 chromatin architecture를 조사한 결과, 대조구는 노화 동안 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/*ATHG1 ox-5*와 -6)는 핵에 골고루 분포되어 있는 형광 패턴이 노화 동안에도 크기의 변화없이 여전히 균일한 분포를 가짐을 알 수 있었다(그림 30B). 이러한 사실로 미루어 보아 *ATHG1* 유전자는 핵에서 chromatin architecture를 조절함으로써 세포 사멸을 지연시키고, 이러한 결과는 결과 노화 지연과 생산성 증대라는 표현형적 특징을 제공하는 것으로 판단된다.

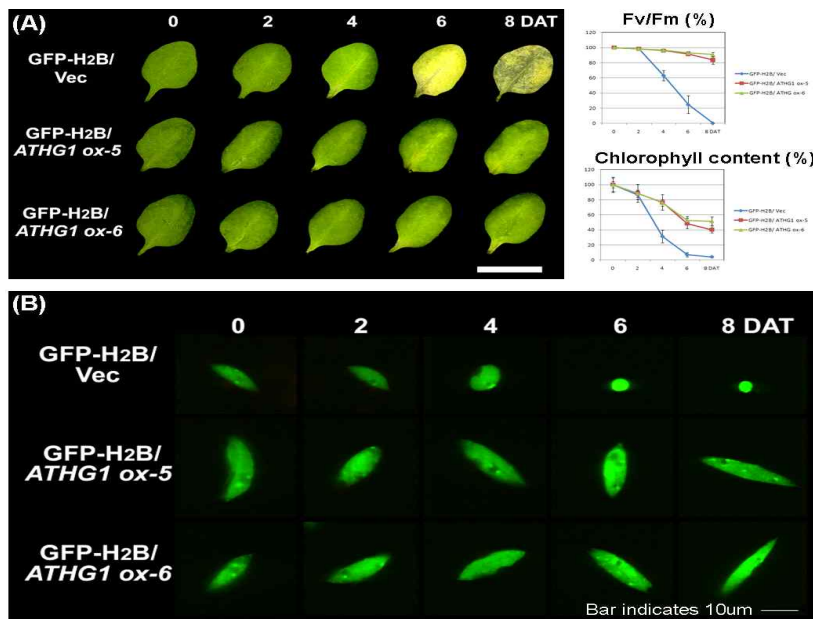


그림 30. Alteration of chromatin architecture by *ATHG1*. H2B-GFP 융합 식물체의 암-유도 노화과정, n=6(A)과 H2B-GFP 융합 단백질의 핵에서의 분포 패턴(B). The chromatin architectures were examined by following the distribution patterns of H2B-GFP fusion proteins that incorporate into chromatin. The patterns were examined by confocal microscopy of nuclei from the rosette leaves of transgenic *Arabidopsis*.

⑥ *ATHG1* 과발현 변이체의 단백질체 분석: 상기에서 언급한 바와 같이 *AtHGI*의 과발현은 노화 단계에서 특이적 발현 증가로 인하여 식물체의 노화 지연 및 생산성 증대와 같은 표현형적 특징을 유발한다고 제안되었다. 이러한 사실을 단백질 수준에서 확인하기 위하여 발아 후 30일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *SEN::ATHG1* 변이체에 암/명 처리한 식물체로부터 각각 단백질을 분리하여 이차원 전기영동을 통하여 단백질 발현 양상을 조사하였다(그림 31).

그림 32는 애기장대에서 *ATHG1* 유전자의 과발현에 의해 up/down-regulation되고 암처리에 의해 단백질의 발현 수준이 변화하는 분석 결과이다. 암 처리에 의해 일반적으로 발현이 조절되는 chaperone, senescence-related, 그리고 light component의 발현 변화는 변이체의 단백질 발현 변화에 대한 지표로 노화지연 pattern이 정상적으로 이루어져 있음을 확인할 수 있었다. 무엇보다

흥미로운 점은 *ATHG1* 유전자의 과발현이 상당히 많은 효소의 발현을 조절한다는 점이다. 이러한 사실로 미루어보아 *ATHG1* 유전자의 과발현은 노화동안 여러 효소의 기능을 조절하여 노화 지연의 표현형을 제공할 것으로 추측된다. 이러한 효소 기능 조절은 상기에서 언급한 chromatin architecture와 연관성이 있을 것으로 판단되며, 보다 정확한 단백질체 변화에 대한 증거를 확보하기 위하여 본 연구팀은 변이체의 단백질체 분석에 보다 집중하고 있는 중이다.

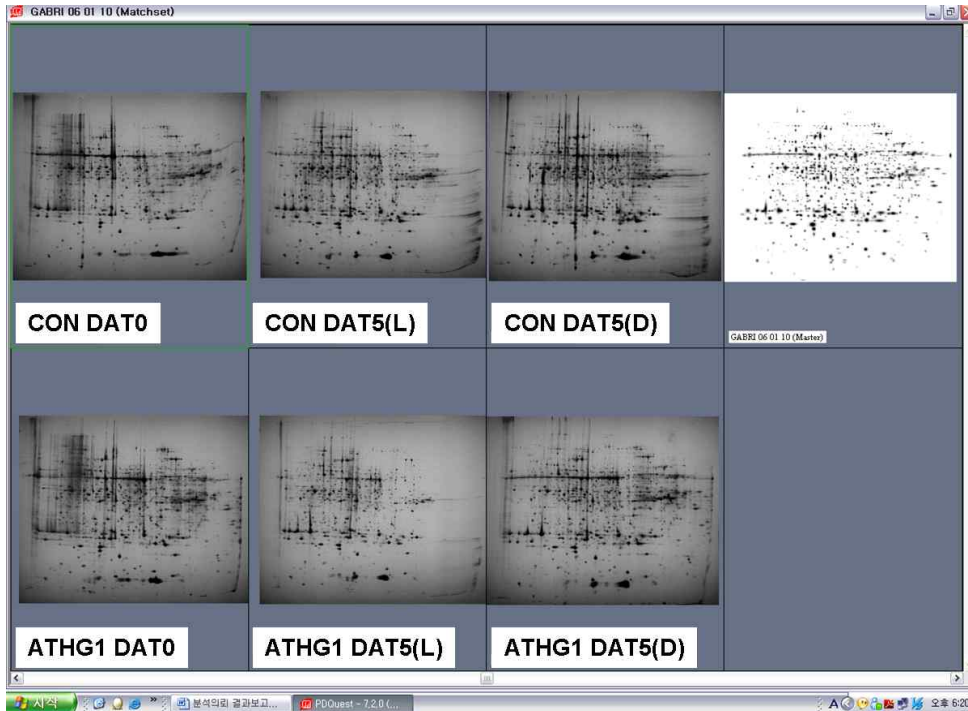


그림 31. Proteome analysis caused by the overexpression of *ATHG*. control (CON) DAT0 (A), *SEN::ATHG1* (ATHG1) DAT0 (B), CON DAT5(L, light) (C), ATHG1 DAT5(L) (D), CON DAT5(D, dark) (E), and ATHG1 DAT5(D) (F). DAT: day after treatment

Num	Light 조대값		Dark 조대값		Spot ID
	2x증가	1/2감소	2x증가	1/2감소	
1	1605				tubulin
2	1608				tubulin
3	1708				malate oxidoreductase
6	2708				putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
7	3006				DCT domain-containing protein
8	3713				Myo-inositol-1-phosphate synthase
17	5406				aspartate aminotransferase
18	5509				sulfate adenylyltransferase
23	7407				glutamate dehydrogenase (NAD(P)+)
25	7802				GTP-binding protein tyxA (tyrosine phosphorylated protein A)
13	4801				Clp protease ATP binding subunit
15	4902				Clp amino terminal domain, ATP-dependent chaperone Clp8
16	5007				Clp amino terminal domain
					Clp ATPase: Protein unfolding and degradation
19	6203				RuBisCO large subunit
20	6209				RuBisCO large subunit
22	6704				NADH-quinone oxidoreductase, chain G
4	2003				putative trypsin inhibitor
9	3905		low		Peptidase family M1
10	3908				Peptidase family M1
21	6211				CLP81, serine-type endopeptidase
14	4802				C2 domain present in plant phospholipase D (PLD)
26	8403				Glycosyl hydrolase family 1
5	2308				Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins
11	4210				Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins
12	4303				Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins
24	7411				Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins
27	8602	low	low		Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins, Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
					The function of these proteins was mainly joining oxidation-reduction reaction

그림 32. *ATHG1*의 과발현에 의해 유발된 단백질체 변화 분석

본 연구팀은 *ATHG1* 유전자의 AT-hook domain에 대한 phylogenetic tree를 이용한 기능 분석을 유추하는 중 흥미로운 사실을 알 수 있었다. AT-hook domain을 함유한 *ATHG1*, *ORE7* 그리고 *SOB3* 유전자의 공통적인 특징으로 노화지연에 대한 특징을 가지고 있었다. 따라서 본 연구팀은 애기장대의 AT-hook domain을 가지는 유전자들에 대한 direct approach를 수행하여 신규 유용 유전자 5종 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8*, 그리고 *ATPG2*를 발굴하여 그 기능을 분석하였다.

#### 나. *ATPG3*(AT-hook protein of Genomine 3, At4g14465): 녹기연장, 생산성 증대 및 스트레스 저항성 유전자, [부록 1, 특허출원 10-2012-0016951]

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.

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 33A). 상기 *SEN1* 프로모터는 식물의 성장 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 형질전환된 애기장대의 생육 동안 상기 화분에 바스타 제초제를 5회 처리한 후, 각 화분에서 형질전환된 애기장대를 선별하였다. pCSEN-*ATPG3* 벡터로 형질전환된 T<sub>1</sub> 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 T<sub>1</sub> 형질전환 애기장대로부터 T<sub>2</sub> 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 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 흥미로운 점은 이들 변이체들은 개체 크기와 종자 생산량에서도 애기장대 야생형에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다(그림 33B). 이러한 노화 지연 현상과 생산성 증대는 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 유전자의 과발현이 라인마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다(그림 33C).

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 33C).

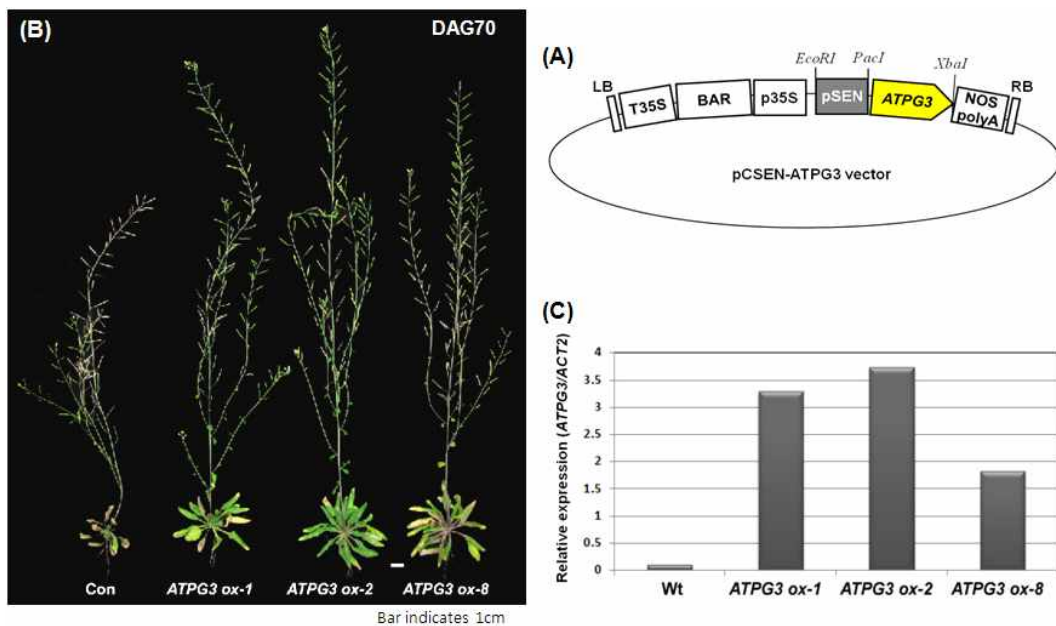


그림 33. ATPG3 과발현 벡터(A) 및 형질전환체의 표현형적 특징(B), 그리고 유전자 발현, 양성대조구는 *ACT*(C)

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 34). 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.

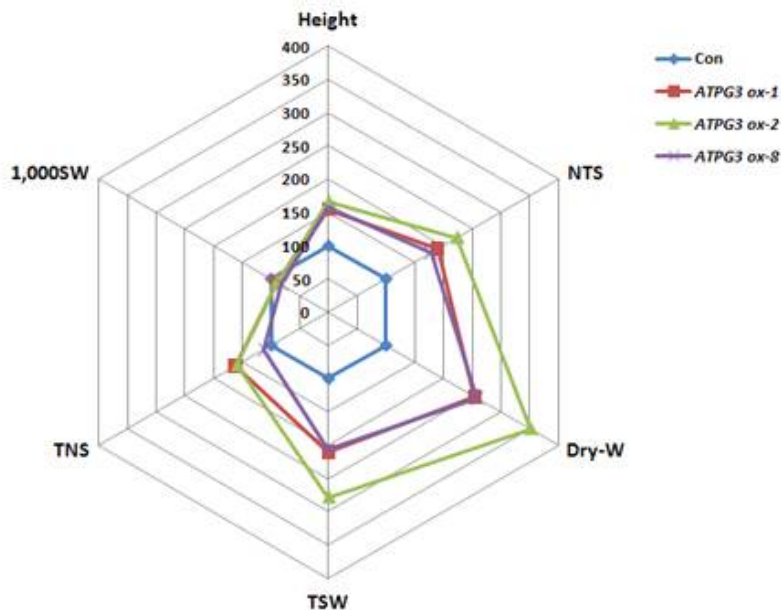


그림 34. ATPG3 과발현 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; Dry-W, weight of plant after dry (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number: 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

ATPG3 ox-1, ATPG3 ox-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 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.

④ *ATPG3* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 대한 특성 분석: 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매4일마다 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-2*와 *ATPG3 ox-8*의 경우 잎의 황화 현상이 32일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일 이후부터 일어남을 확인할 수 있었다(그림 35A). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG3* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라 라고 판단된다.

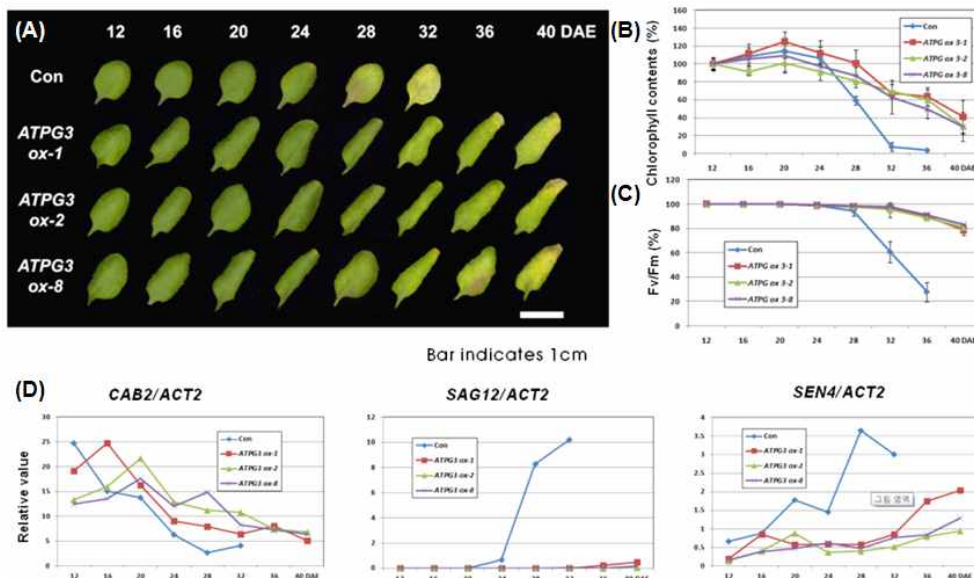


그림 35. *ATPG3* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, n=6(B), 광합성 효율, n=6(C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT2*당 각 유전자 발현의 relative level(D)

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 35B에 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 PSII(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 35C에 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 대조구로는 *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 35D). 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.

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<sub>2</sub> 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액 (2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 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 36A), 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 36B와 C).

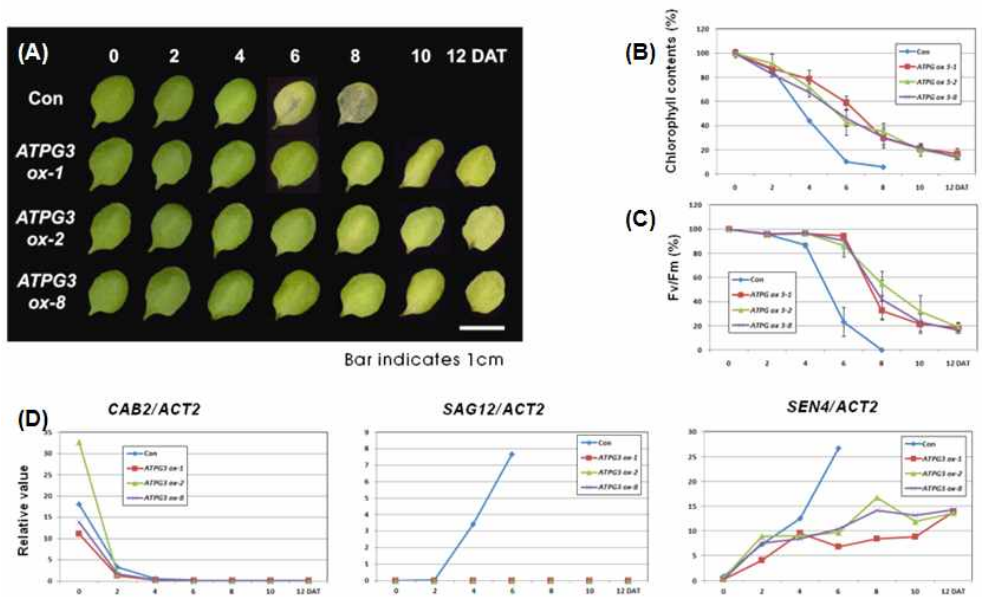


그림 36. *ATPG3* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, n=6(B), 광합성 효율, n=6(C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT*당 각 유전자 발현의 relative level(D)

또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 조사하였다. 그 결과, 그림 36D에 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 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 그림 37A와 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.

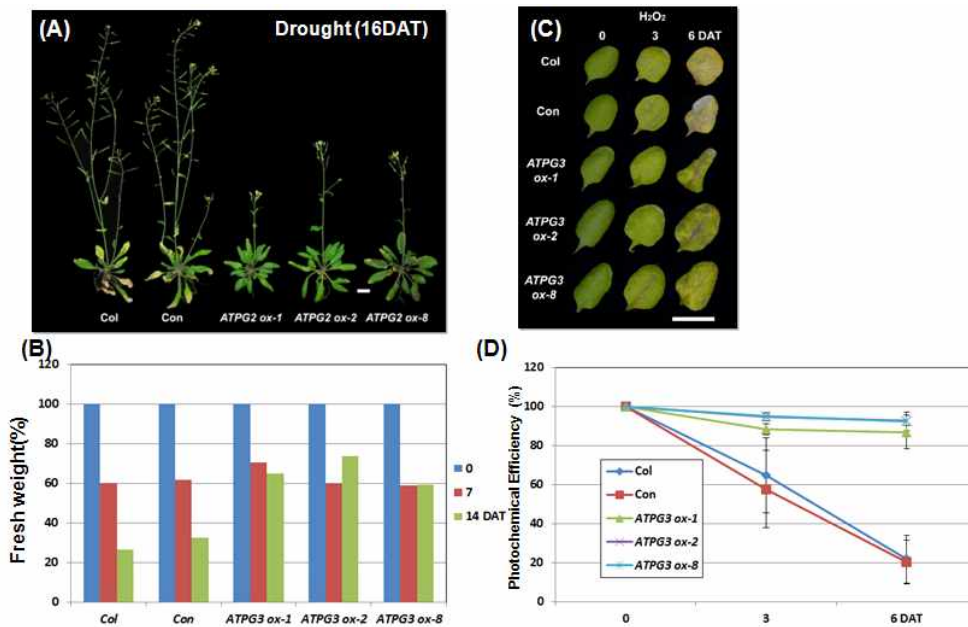


그림 37. *ATPG3* 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화  $n=6$ (B), 그리고  $H_2O_2$  스트레스에 대한 표현형적 특징(C) 및 광합성 효율 변화,  $n=6$ (D)

*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 37C와 D). 이러한 사실은 *ATPG3*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

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

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

① 식물의 생산성 증대, 노화 지연 그리고 스트레스 내성을 제공하는 *ATPG4* 유전자 발굴: 애기장대의 AT-HOOK MOTIF NUCLEAR-LOCALIZED PROTEIN (GeneBank accession number NP\_566232.1)의 염기서열을 기초로 하여 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 프라이머 (*PacI*/AT3G04570 SOE-F, 5'-TTA ATT AAA TGG CGA ATC CAT GGT GGA CAG -3')와 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*XbaI*/AT3G04570 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA AAA TCC TGA CCT AGC TTG AGC -3')를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다. 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 32 kDa의 분자량을 갖는 315개의 아미노산을 암호화하는 948bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG4*(AT-hook protein of Genomine 4)로 명명하였다.

② *ATPG4* 과발현 애기장대의 표현형적 특징: 상기 유전자가 식물의 생산성 증대와 노화 지연을 조절하고 또한 식물의 스트레스 내성을 제공하는지를 확인하기 위하여 *ATPG4* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG4* 전사체의 발현을 변화시켰다. 사용된 벡터는 유도성 프로모터(inducible promoter)인 *SEN1* 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터이며, 유전자를 센스 방향으로 클로닝하여 *ATPG4* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG4* 재조합 벡터를 제작하였다(그림 38A). 상기 *SEN1* 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

상기 pCSEN-*ATPG4* 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션(electroporation) 방법을 이용하여 형질전환을 수행하였다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T<sub>1</sub>)를 수확하였다. 대조군으로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *ATPG4* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

pCSEN-*ATPG4* 벡터로 형질전환된 T<sub>1</sub> 애기장대는 대조군과 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 변이체들은 뚜렷한 노화 지연 특성을 보였다. 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T<sub>1</sub> 형질전환 애기장대로부터 T<sub>2</sub> 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환 라인들의 표현형 확인은

발아 후 70일째 수행하였다(그림 38B). pCSEN-ATPG4 구성체를 가지고 있는 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 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 그림 38C에서 나타나듯이 유전자의 과발현이 라인 마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 선별된 노화 지연 표현형을 가지는 변이체들이 실질적으로 *ATPG4* 유전자의 과발현에 의해 유도되었는지 확인하기 위하여 qRT-PCR을 수행한 결과, 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체의 *ATPG4* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG4* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

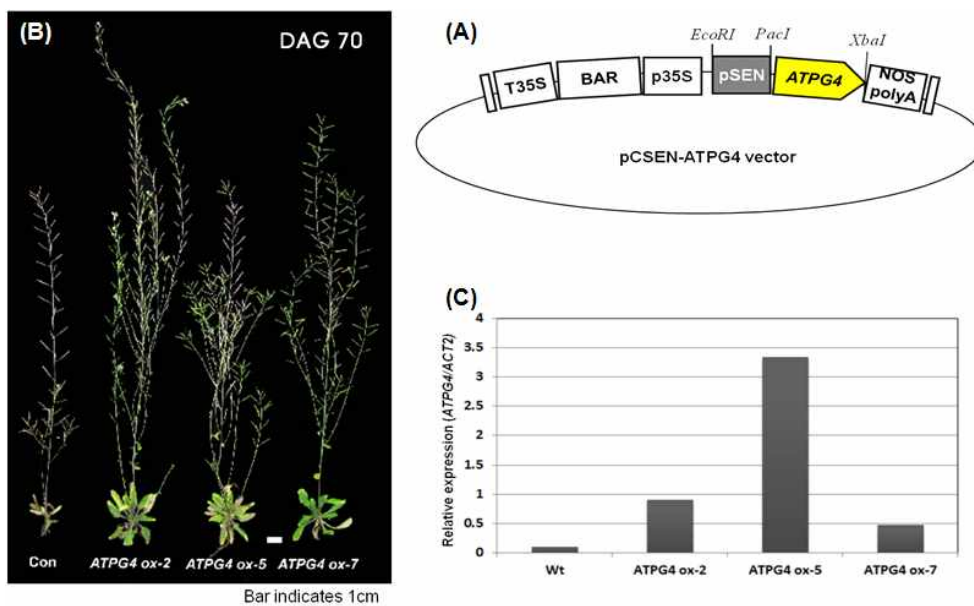


그림 38. *ATPG4* 과발현 벡터(A) 및 형질전환체의 표현형적 특징(B), 그리고 유전자 발현, 양성대조구는 *ACT*(C)

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

③ *ATPG4* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석: *ATPG4* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 라인별로 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표들을 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다(그림 39). 적용된 생산성 증대 지표는 식

물의 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.

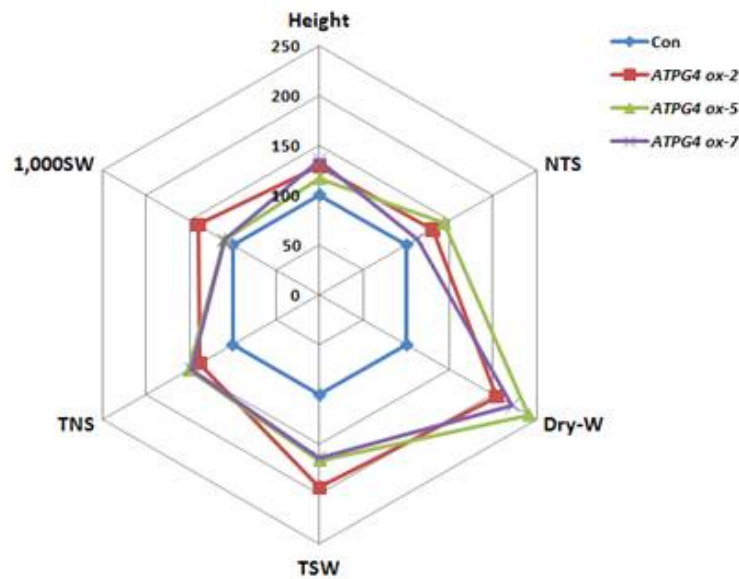


그림 39. ATPG4 과발현 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; Dry-W, weight of plant after dry (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

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

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

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 40B에 도시된 바와 같이, 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격한 감소를 보이며 36일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 경우 자엽 생성 후 28일이 되었을 때도 측정 초기의 60% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다.

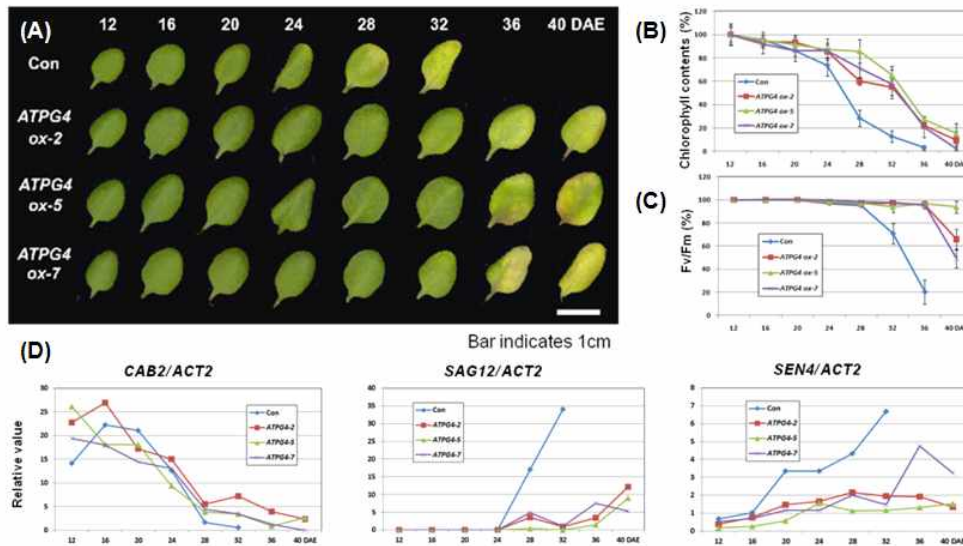


그림 40. *ATPG4* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, n=6(B), 광합성 효율, n=6(C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT*당 각 유전자 발현의 relative level(D)

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

야생종과 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG4* 유전자와 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다. 야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이

지날수록 노화에 비례하여 야생형과 *ATPG4* 과발현 변이체들은 비슷한 감소 양상을 나타내었다. 그러나 노화의 signal로 사용되는 *SAG12* 발현의 경우, 야생종은 32일째 최대 발현을 나타내는 반면, *ATPG4* 과발현 변이체들은 36일까지 증가 현상이 거의 나타나지 않다가 40일째에도 야생종에 비하여 약한 signal을 나타냈다. 그리고 식물의 노화동안 점진적으로 발현이 증가되는 것으로 알려진 *SEN4*의 발현은 야생종에서는 20일 이후 급격하게 증가하는 반면, *ATPG4* 과발현 변이체들은 노화 전 과정동안에도 *SEN4*의 발현 증가가 크게 나타나지 않았다. 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG4* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

⑤ *ATPG4* 과발현 변이체의 암-유도 노화에 대한 특성 분석: 노화 촉진 요인으로 알려진 암 처리에 대한 *ATPG4* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T<sub>2</sub> 세대에서 발아 후 21일째 3-4번좌엽(rosette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액 (2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 야생종 애기장대와 비교하였다.

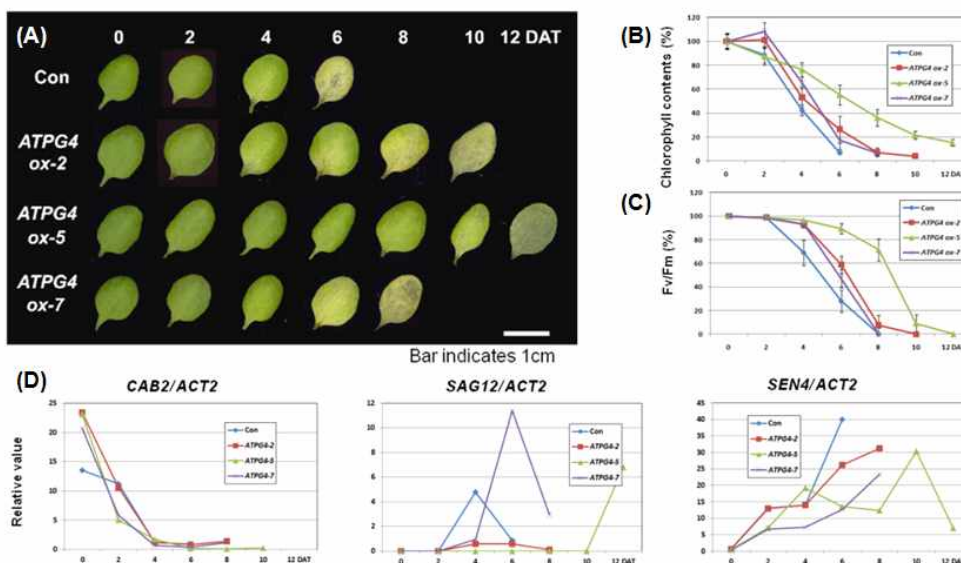


그림 41. *ATPG4* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량, n=6(B), 광합성 효율, n=6(C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT*당 각 유전자 발현의 relative level(D)

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암 처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 6일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어든 반면, *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 보여지며, 특히 *ATPG4 ox-5*의 경우 지연현상이 더욱 뚜렷함을 확인할 수 있었다(그림 41A). 암 처리에 의한 노화 동안 엽록소 함량과 광합성

효율 변화에 있어서도 야생종에 비하여 *ATPG4* 변이체들은 정도의 차이는 있지만 함량 및 활성 감소가 지연됨을 알 수 있었다(그림 41B와 C).

또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 조사한 결과, 그림 41D에 도시된 바와 같이, 야생형에 비하여 *ATPG4* 변이체들은 *SAG12*의 발현이 지연되고, *SEN4*의 발현율이 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 보아 *ATPG4* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

### ⑥ *ATPG4* 과발현으로 인한 식물 노화 지연과 생산성 증대의 상관관계 분석

*ATPG4* 과발현 정도에 따른 변이체의 노화 지연과 생산성 증대에 대한 상관관계를 분석하기 위하여, T<sub>2</sub> 세대 10 라인을 선별하여 노화 지연 및 생산성 증대에 대한 그들의 표현형적 특징, 변이체 라인들의 *ATPG4* 과발현 정도, 그리고 변이체 라인들의 생산성 증대를 조사하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

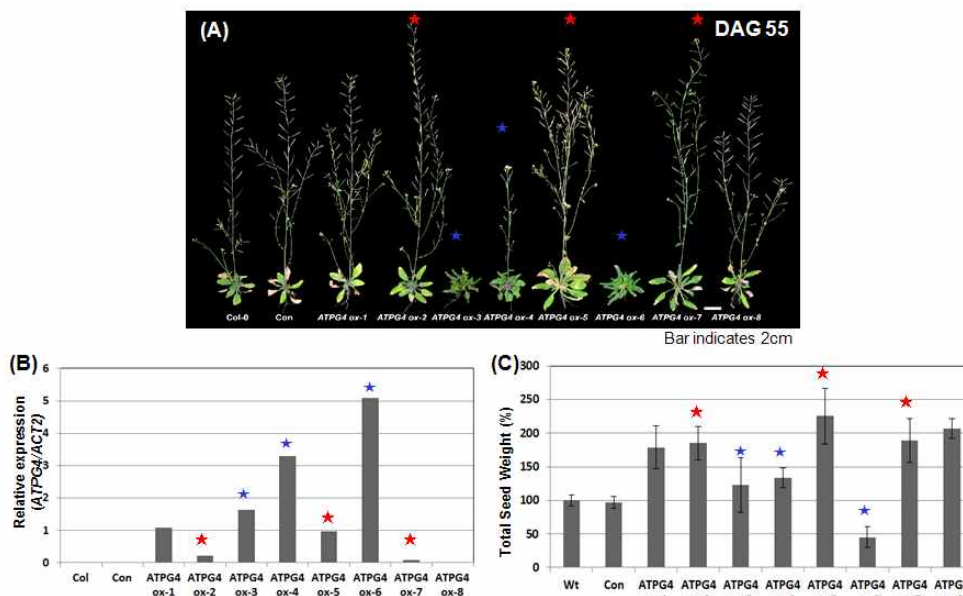


그림 42. *ATPG4* 과발현으로 인한 식물 노화 지연과 생산성 증대의 상관관계 분석. *ATPG4* 과발현 변이체의 표현형적 특징(A), *ATPG4* 유전자의 발현 양상, 각 수치는 양성 대조구인 *ACT*당 각 유전자 발현의 relative level(B), 그리고 종자 수확량 n=20(C)

*ATPG4* 과발현 변이체의 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특성을 분석하기 위하여 앞서 분석한 T<sub>2</sub> 형질전환 애기장대 3라인 외에 추가로 5라인을 선별하여 총 8라인의 T<sub>2</sub> 형질전환 애기장대 라인과 애기장대 야생형(Col-0)과 대조구(Con)의 표현형적 변화를 비교하였다. 선별된 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 55일째 수행하였다(그림 42A). 전체적으로 *ATPG4 ox-1*과 *ATPG4 ox-8* 변이체 라인을 제외하고 나머지 6 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 노화 지연의 표현형적 특징을 가지고



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

노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특징과 *ATPG4* 유전자의 상대적 과발현 정도와의 상관관계를 분석하기 위하여 자엽 생성 후 24일째의 변이체의 *ATPG4* 유전자의 발현 양상을 조사하였다(그림 42B). 변이체 8라인 모두 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG4* 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG4* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다. 흥미롭게도, 노화지연 표현형이 강력한 *ATPG4 ox-3*, *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체들은 *ATPG4* 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 반면, 개체 크기와 silique 생산량 증가와 같은 생산성 증대의 표현형적 특징을 가지는 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체들은 모두 *ATPG4* 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 식물의 생산성 증대 혹은 노화지연의 표현형적 특징을 가지는 작물을 임의적으로 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

*ATPG4* 과발현 변이체의 *ATPG4* 유전자 과발현 정도와 생산성 증대에 대한 특성을 보다 정확히 분석하기 위하여 변이체 라인들의 총 종자 무게를 애기장대 야생형과 비교, 분석하였다(그림 42C). *ATPG4 ox-3*, *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체들에 비하여 *ATPG4* 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 *ATPG4 ox-2*, *ATPG4 ox-5*와 *ATPG4 ox-7* 변이체들은 종자 수확량에 있어서 애기장대 대조구에 비하여 1.7배 이상 증가하는 것으로 나타난 반면, 유전자의 발현 정도가 상대적으로 높은 *ATPG4 ox-3*, *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체들은 애기장대 대조구에 비하여 1.3배 이하의 증가율, 심지어 *ATPG4 ox-6* 변이체는 오히려 감소율을 가지는 것으로 나타났다. 흥미로운 사실은 생산성 증대 특정 형질을 가지는 변이체 라인들의 수확 시기는 애기장대 대조구와 큰 차이가 없다는 것이다. 이러한 사실은 본 유전자의 과발현으로 인한 생산성 증대는 대조구의 수확시기가 비슷하여 작물의 수확시기에 대한 문제점을 최소화할 수 있으리라 확신한다.

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

생산성 증대 작물 개발에 많은 장점을 제공하리라 판단된다.

⑦ *ATPG4* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석: *ATPG4* 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 그림 43A와 B에 도시되었다. 야생형 애기장대는 가뭄에 의해 잎의 황화 현상이 급속히 진행됨을 알 수 있었으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 가뭄에 의하여 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그에 비하여 *ATPG4* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG4*가 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

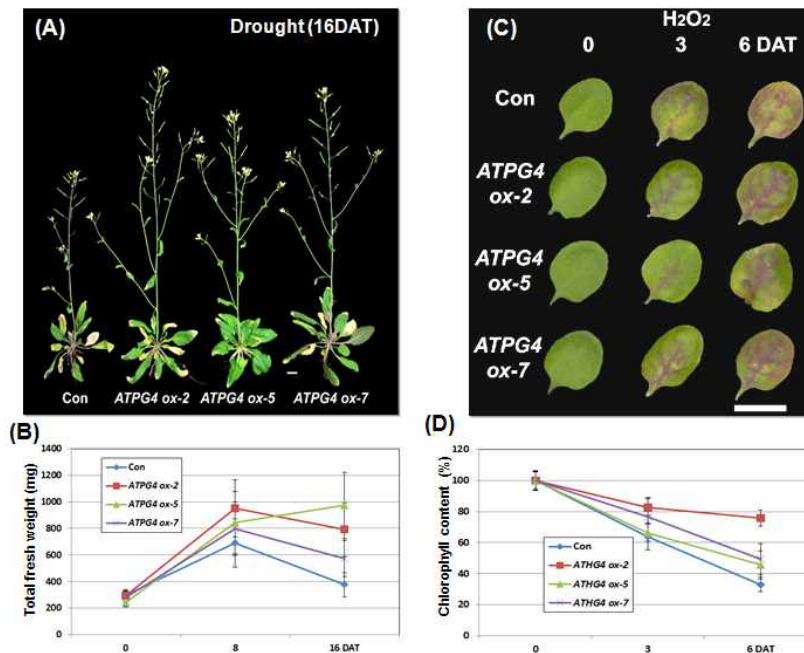


그림 43. *ATPG4* 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화 n=6(B), 그리고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 스트레스에 대한 표현형적 특징(C) 및 광합성 효율 변화, n=6(D)

*ATPG4* 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 2일 간격으로 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG4* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율(data not shown)의 감소에 있어서도 지연됨을 확인할 수 있었다(그림 43C와 D). 이러한 사실은 *ATPG4*가 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

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

**라. *ATPG7* (AT-hook protein of Genomine 7, At4g22810): 녹기 연장, 생산성 증대 및 스트레스 저항성 유전자, [부록 3, 특허출원 10-2011-0038929]**

① 애기장대로부터 녹기연장 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG7* 유전자 발굴: 식물의 녹기 연장 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 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 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.

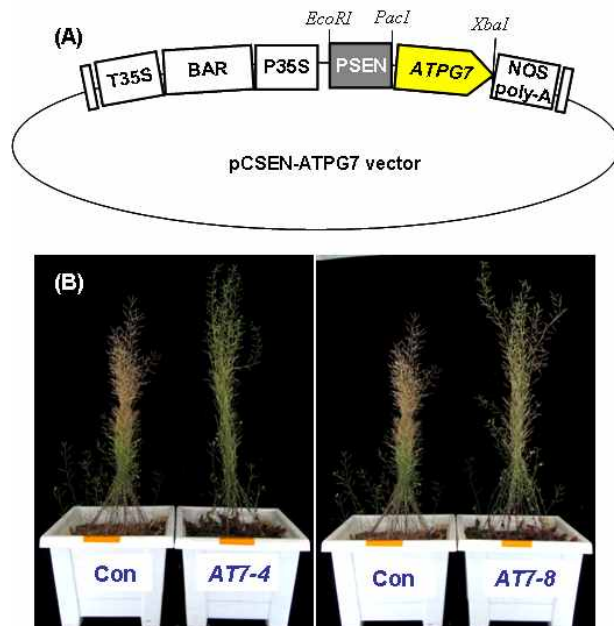


그림 44. *ATPG7* 유전자에 대한 형질전환 벡터 모식도(A)와 T<sub>1</sub> 형질전환체의 발아 후 60일째 표현형적 특징(B)

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 44A). 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다. pCSEN-*ATPG7* 벡터로 형질전환된 T<sub>1</sub> 애기장대 *AT7-4* 및 *AT7-8*은 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 노화 지연의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 형질전환 개체에서 이러한 노화 지연 현상의 정도의 차이는 유전자의 과발현이 개체마다 다르게 나타남에 기인하는 것으로 판단된다(그림 44B).

이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T<sub>1</sub> 형질전환 애기장대로부터 T<sub>2</sub> 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 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 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 45), 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG7* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

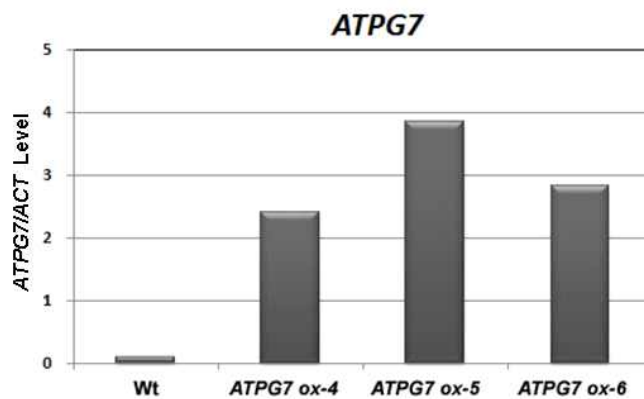


그림 45. 애기장대 야생형과 *ATPG7*-과발현체의 *ATPG7* 유전자의 발현 분석, 양성대조구는 *ACT*.

선별된 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 46). pCSEN-*ATPG7* 구성체를 가지고 있는 *ATPG7 ox-4*, *ATPG7 ox-5*와 *ATPG7 ox-6* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T<sub>1</sub> 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 그림 45에서 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.

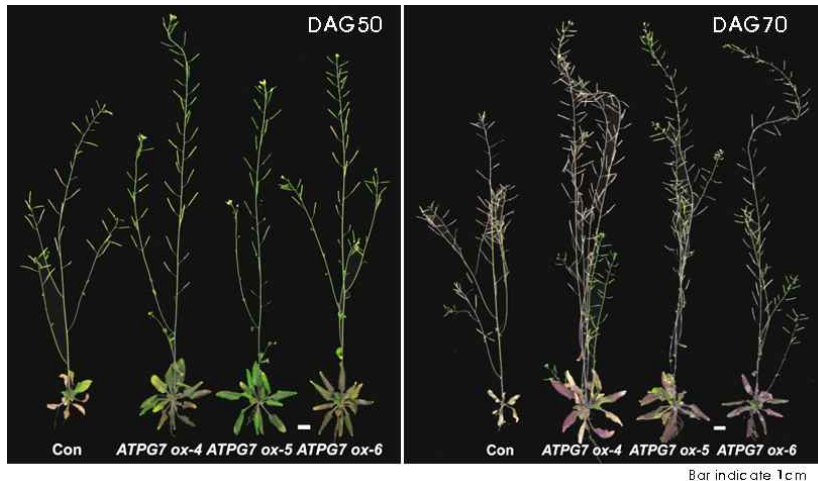


그림 46. *ATPG7* 과발현 애기장대  $T_2$  형질전환체의 발아 후 50일 그리고 70일째 표현형적 특징

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 47). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

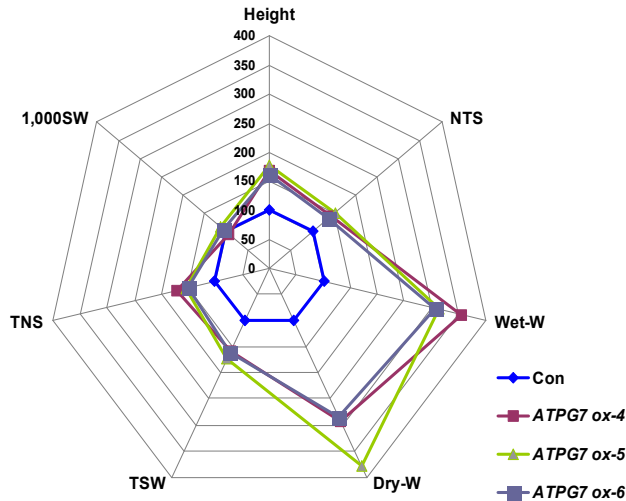


그림 47. *ATPG7* 과발현 애기장대  $T_2$  형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; Dry-W, weight of plant after dry (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number: 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

③ *ATPG7* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 대한 특성 분석: *ATPG7* 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여,  $T_2$  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 48). 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 49A). 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 49B). 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.

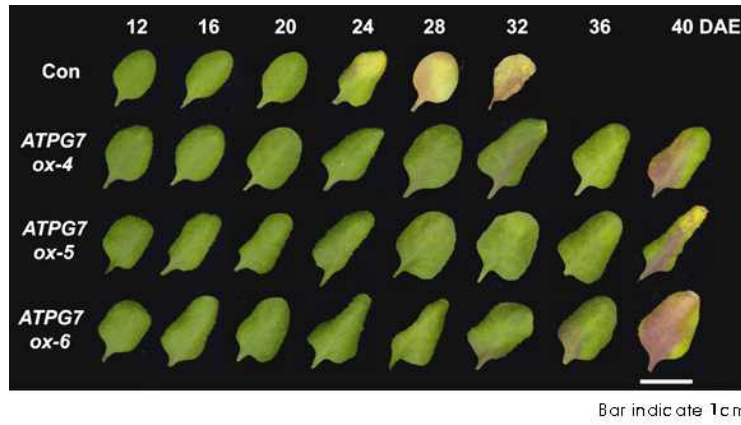


그림 48. *ATPG7* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징

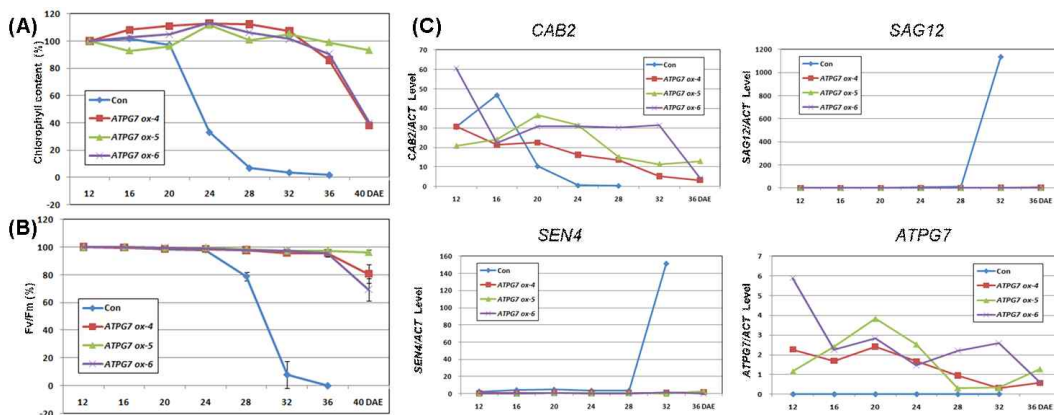


그림 49. *ATPG7* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 엽록소 함량 (n=6)(A), 광합성 효율 (n=6)(B), 그리고 *ATPG7*과 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성대조구는 *ACT1*(C)

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 49C). 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.

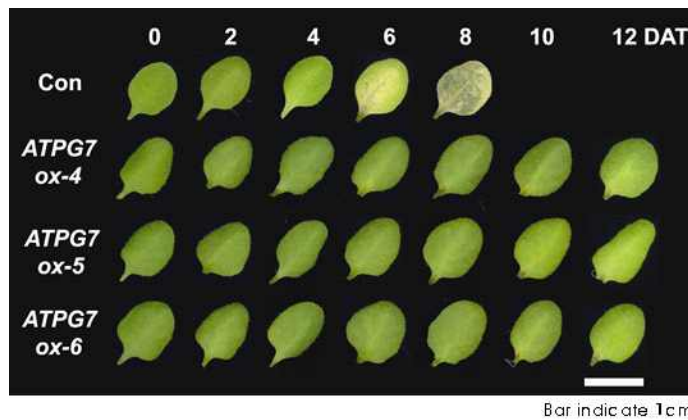


그림 50. *ATPG7* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징

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 T<sub>2</sub> 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 50). 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 51A). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 *ATPG7* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(그림 51B). 또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 나이-의존적 노화와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 그림 51C에 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.

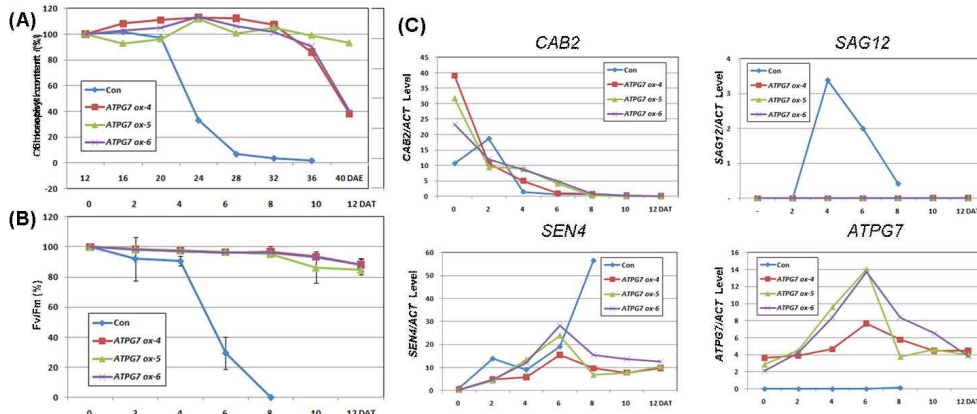


그림 51. *ATPG7* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 엽록소 함량 (n=6)(A), 광합성 효율 (n=6)(B), 그리고 *ATPG7*과 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 *ACT1*(C)

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 52A와 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 2일 간격으로 6일동안 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 52C와 D). 이러한 사실은 *ATPG7*가 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.

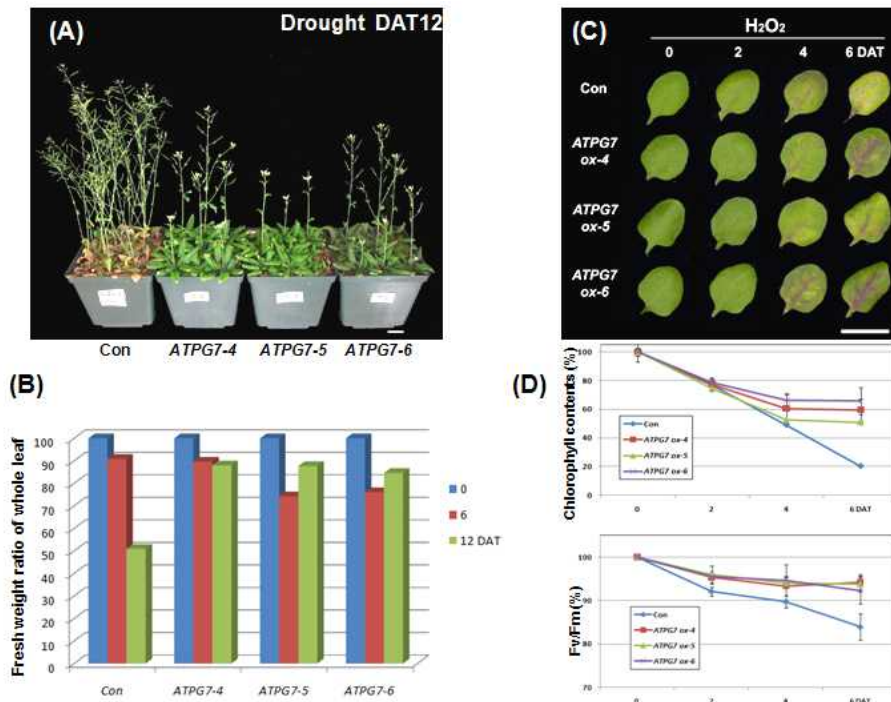


그림 52. ATPG7 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화  $n=6$ (B), 그리고  $H_2O_2$  스트레스에 대한 표현형적 특징(C) 및 엽록소 함량과 광합성 효율 변화,  $n=6$ (D)

마. *ATPG8* (AT-hook protein of Genomine 8, At3g60870): 녹기 연장, 생산성 증대 및 스트레스 저항성 유전자, [부록 4, 특허출원 10-2011-0038932]

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

상기 유전자가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *ATPG8* 유전자 과발현 변이체를 제작하였다. Inducible promoter인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터를 제작하였다(그림 53A). pCSEN-*ATPG8* 벡터로 형질전환된 T<sub>1</sub> 애기장대 *AT8-10*은 대조구(*ATHG8* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)와 발아 후 60일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 *AT8-10* 변이체 라인은 노화 지연의

뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 또한 흥미롭게도 종자 수확량 증가와 개체 크기 증가와 같은 생산성 증대 특징을 가졌다(그림 53B).

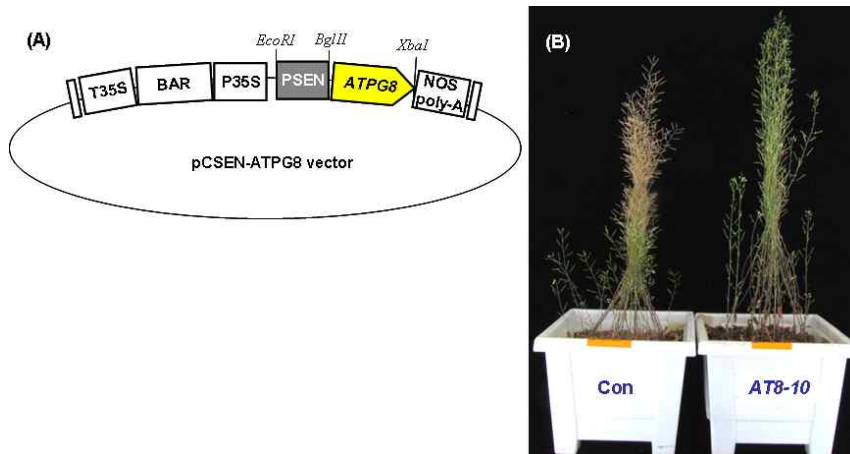


그림 53. *ATPG8* 유전자에 대한 형질전환 벡터 모식도(A)와 T<sub>1</sub> 형질전환체의 발아 후 60일째 표현형적 특징(B)

이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T<sub>1</sub> 형질전환 애기장대로부터 T<sub>2</sub> 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 선별된 노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 *ATPG8* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10* 변이체의 잎으로부터 전체 RNA를 각각 추출하고 이를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후, 합성된 cDNA를 주형으로 하고, *ATPG8* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자를 대상으로 유전자 발현을 조사하였다. 그 결과, 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10* 변이체의 *ATPG8* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며(그림 54), 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG8* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

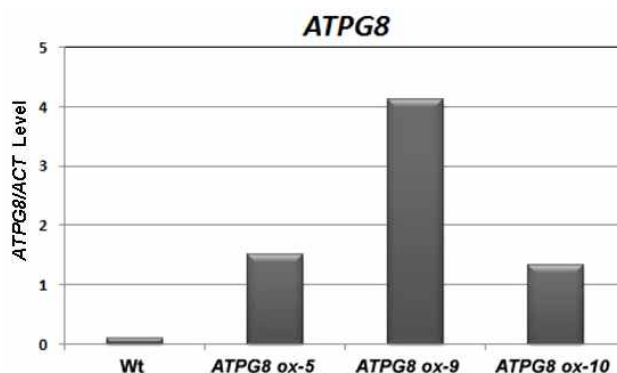


그림 54. 애기장대 야생형과 *ATPG8*-과발현체의 *ATPG8* 유전자의 발현 분석, 양성 대조구는 *ACT*.

선별된 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 55). pCSEN-ATPG8 구성체를 가지고 있는 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*

변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T<sub>1</sub> 변이체와 마찬가지로 식물체의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 노화 지연 표현형뿐만 아니라 노화 지연 동안 개체 크기와 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 노화 지연 현상과 생산성 증대는 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 그림 54에서 나타나듯이 유전자의 과발현이 라인마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 흥미로운 사실은 노화 지연 형질이 강력한 *ATPG8 ox-9*는 생산성 증대에 있어서 큰 표현형적 차이를 못 가지는 반면, 노화 지연 형질이 강하지 않는 *ATPG8 ox-5*와 *ATPG8 ox-9*는 생산성 증대에 있어서 대조구에 비하여 종자 수확량 증가 및 개체 크기 증가와 같은 큰 표현형적 특징을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 생산성 증대와 노화 지연에 대한 표현형적 특징을 가진 식물을 임의로 제작할 수 있을 것으로 판단된다.

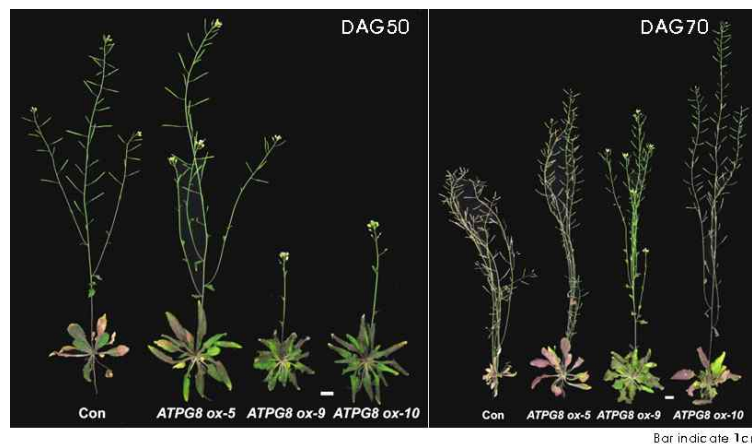


그림 55. *ATPG8* 과발현 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환체의 발아 후 50일 그리고 70일째 표현형적 특징

② *ATPG8* 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석: *ATPG8* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 라인별로 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다. 적용된 생산성 증대 지표는 식물의 키 (height), silique 수(NTS), 생체량(Wet-W), 생체건량(dry-W), 총 종자 무게(TSW), 총 종자수(TNS), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며 결과는 라인별로 각 20개체의 평균값이다. *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 종자 무게 및 종자 수에 있어서 증가하는 하는 것으로 나타났으며, 특히 *ATPG8 ox-5*와 *ATPG8 ox-9* 변이체는 1.5배 이상 증가한 것으로 나타났다. 그런 반면 종자 1,000개의 무게에는 대조구와 큰 차이가 없었다. 그리고 생체량과 생체건량에 있어서는 과발현 변이체 모두는 대조구에 비하여 약 1.5배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 사실은 *ATPG8* 유전자가 녹기 연장과 더불어 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다(그림 56). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

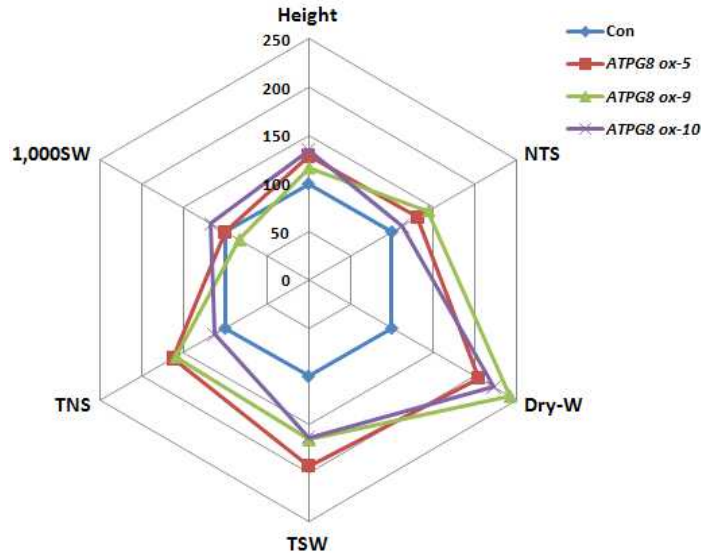


그림 56. *ATPG8* 과발현 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; Dry-W, weight of plant after dry (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number: 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

③ *ATPG8* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 대한 특성 분석: *ATPG8* 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T<sub>2</sub> 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 24일 이후 잎의 황화 현상이 진행되어 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 잎의 황화 현상이 36일부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(그림 57). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG8* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 엽록소의 함량에 있어서는 그림 58A에 도시된 바와 같이 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 자엽 생성 후 32일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다. 과발현 변이체의 광합성 효율 변화도 엽록소 함량 변화와 유사한 양상을 나타내었다. 야생종은 자엽 생성 후 28일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 자엽 생성 후 36일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않다가 40일째 라인에 따라 정도의 차이는 있지만 약 20% 범위 정도만 활성 소실이 일어났다(그림 58B). 상기 결과로부터, *ATPG8* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG8* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

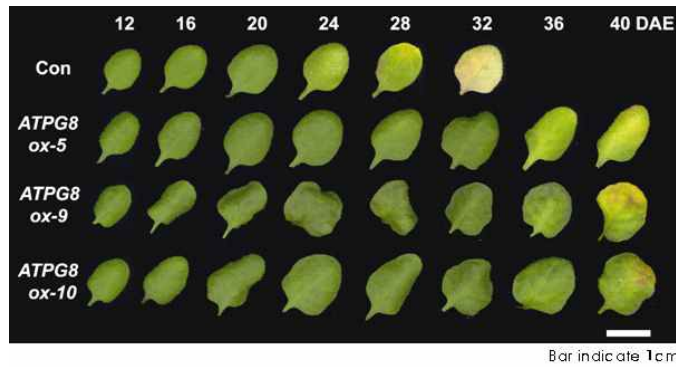


그림 57. *ATPG8* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징

야생종과 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10* 변이체에서 노화 관련 유전자 (senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 *ATPG8* 유전자와 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다. 야생종의 경우, *CAB2*(엽록소a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였다. 그러나 *ATPG8* 과발현 변이체들에서는 정도의 차이는 있으나, 이들 유전자의 발현 감소 양상이 지연됨을 알 수 있었다. *SAG12* 및 *SEN4*와 같은 노화 관련 유전자들은 노화단계에서 그 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. *SEN4*와 *SAG12* 경우 야생종에서 자엽 생성 후 28일 이후 급격히 증가하여 32일째 최대의 발현치를 가지는데 비해, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10* 변이체 모두는 *SEN4*와 *SAG12*의 발현이 자엽 생성 후 36일째까지 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 한편 *ATPG8* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 전체적으로 *ATPG8* 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 발현 수준이 현저히 높으며 노화 동안 라인별로 정도의 차이는 있지만 24일에서 28일 사이에 작은 피크를 가졌다가 점진적으로 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(그림 58C). 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG8* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

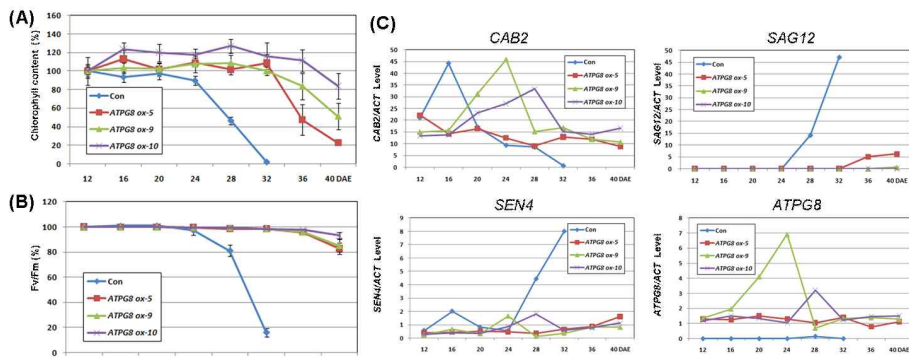


그림 58. *ATPG8* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 엽록소 함량 (n=6)(A), 광합성 효율 (n=6)(B), 그리고 *ATPG8*과 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 *ACT1*(C)

④ *ATPG8* 과발현 변이체의 암-유도 노화에 대한 특성 분석: 노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG8* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T<sub>2</sub> 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액 (2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 조사하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암 처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 잎의 황화 현상이 12일 이후부터 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(그림 59). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암 처리 후 4일 이후 급격한 감소를 가져 6일 이후 암 처리하지 않은 상태의 약 10% 이하의 수치를 나타냈으나, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우, 대부분 6일째에도 60% 이상의 엽록소 함량을 나타냈다(그림 60A). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 *ATPG8* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(그림 60B).

또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 조사한 결과, 그림 60C 도시된 바와 같이, 야생형이 암 처리 후 4일째 *SAG12*의 발현이 현저히 증가하고 6일째 최고치를 나타내는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 동안 거의 발현되지 않았다. *SEN4*의 발현에 있어서, 야생형의 경우 암 처리 초기 동안 발현이 현저히 증가하여 6일째 최고치를 나타내는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 동안 야생형에 비하여 현저히 낮은 발현량을 나타내었다. 한편 *ATPG8* 유전자의 경우, 야생형에서는 거의 발현이 없는데 비해, 과발현 변이체에서는 암 처리 시 증가 현상을 보여 6일째 최고치를 가지고 이후 감소함을 알 수 있었다. 그러나 전체적인 발현량은 야생형에 비하여 현저히 높은 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어 보아 *ATPG8* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

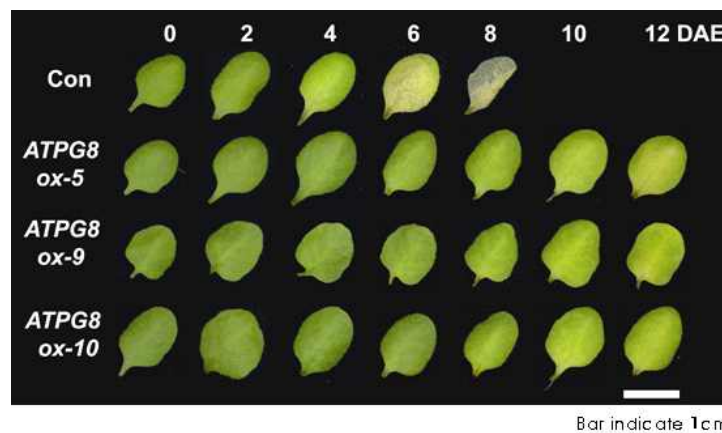


그림 59. *ATPG8* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징

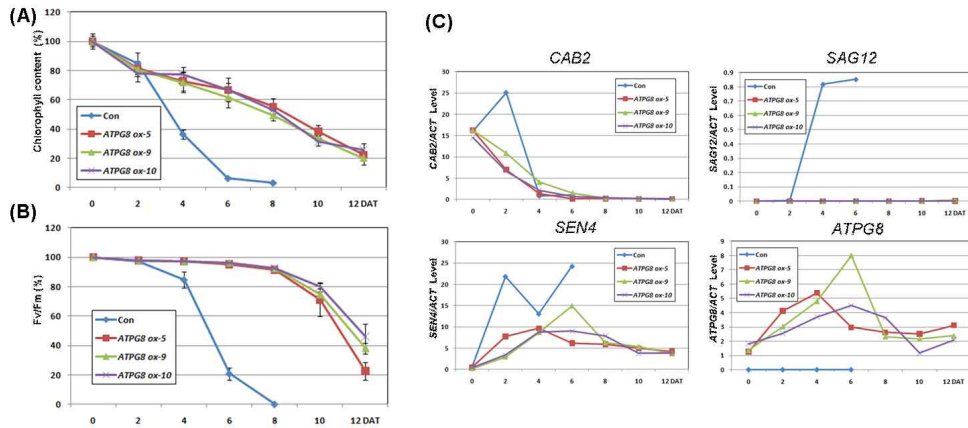


그림 60. *ATPG8* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 엽록소 함량 (n=6)(A), 광합성 효율 (n=6)(B), 그리고 *ATPG8*과 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 *ACT1*(C)

⑤ *ATPG8* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석: *ATPG8* 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 그림 61A와 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 *ATPG8* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG8*이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

*ATPG8* 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 50mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 함유한 배지에 floating한 후 매 2일 간격으로 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATPG4* 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소에 있어서도 지연됨을 확인할 수 있었다(그림 61C와 D). 이러한 사실은 *ATPG7*가 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.



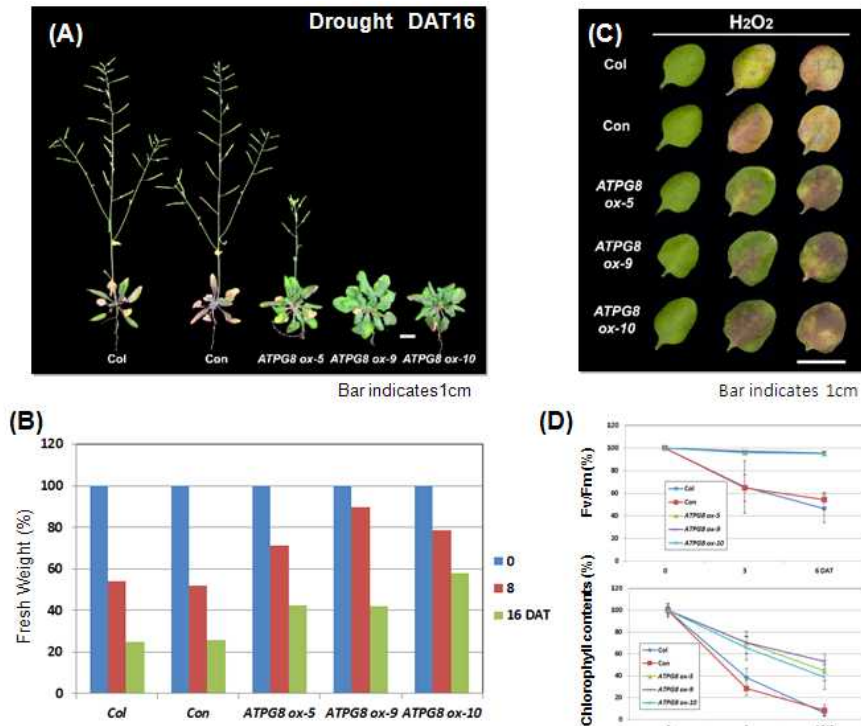


그림 61. ATPG8 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화  $n=6$ (B), 그리고  $H_2O_2$  스트레스에 대한 표현형적 특징(C) 및 엽록소 함량과 광합성 효율 변화,  $n=6$ (D)

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

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

상기 유전자가 식물의 녹기연장 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *ATPG2* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG2* 전사체의 발현을 변화시켰다. Inducible promoter인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 *ATPG2* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG2* 재조합 벡터를 제작하였다(그림 61A). pCSEN-*ATPG2* 벡터로 형질전환된 T<sub>1</sub> 애기장대 AT2-7은 대조구(*ATPG2* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)와 발아 후 60일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 AT2-7 변이체 라인은 노화 지연의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌다(그림 61B).

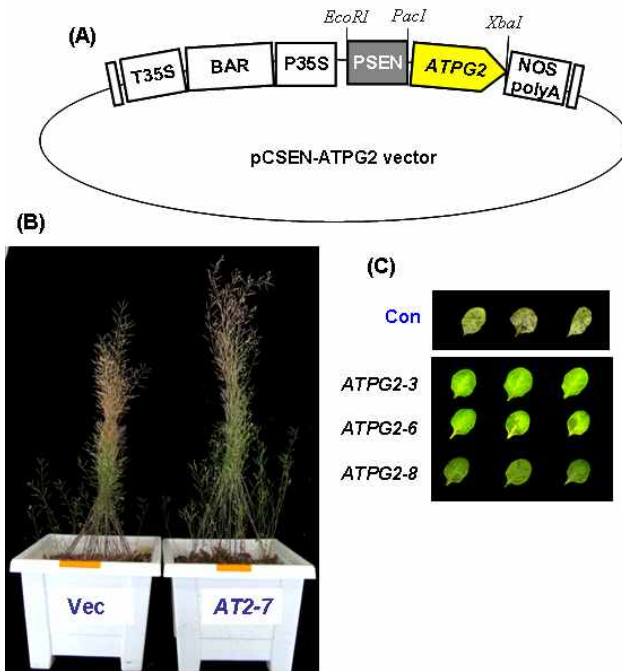


그림 61. *ATPG2* 유전자에 대한 형질전환 벡터 모식도(A)와 T<sub>1</sub> 형질전환체의 발아 후 60일째 표현형적 특징(B), 그리고 T<sub>2</sub> 형질전환 라인의 암 처리 후 6일째 잎의 표현형적 특징

이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T<sub>1</sub> 형질전환 애기장대로부터 T<sub>2</sub> 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 노화 지연에 대한 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환 라인들의 표현형 확인은 일정 기간 생육 후 6일 동안의 암 처리 후 수행하였다. pCSEN-ATPG2 구성체를 가지고 있는 과발현 변이체 라인들은 애기장대 대조구 (Con)와 비교하여 볼 때, T<sub>1</sub> 변이체와 마찬가지로 식물체잎의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났다으며, 특히 *ATPG2 ox-3*과 *ATPG2 ox-6* 라인은 노화 지연에 대하여 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌다(그림 61C). 따라서 본 연구팀은 *ATPG2* 유전자의 과발현은 식물의 노화 지연이라는 표현형적 특징을 제공한다는 것을 재확인할 수 있었다.

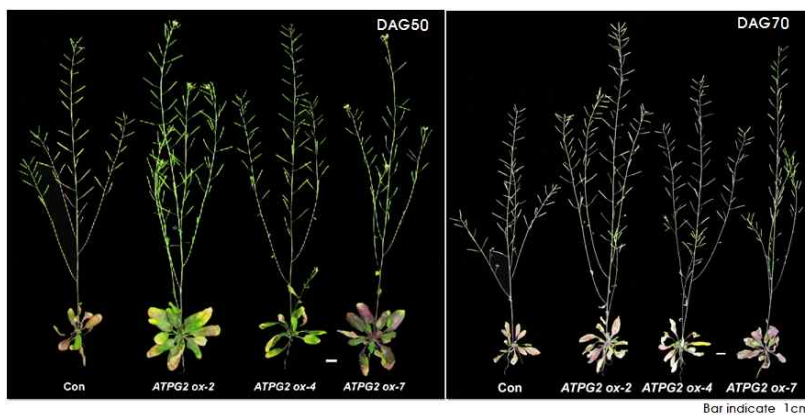


그림 62. *ATPG2* 과발현 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환체의 발아 후 50일 그리고 70일째 표현형적 특징

이러한 노화 지연에 대한 표현형적 특징을 가지는 변이체에서 선별된 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환 라인들의 *in vivo* 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 62). pCSEN-ATPG2 구성체를 가지고 있는 *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T<sub>1</sub> 변이체와 마찬가지로 식물체의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 노화 지연 표현형뿐만 아니라 노화 지연 동안 개체 크기와 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 노화 지연 현상과 생산성 증대는 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 앞서 다른 AT-hook protein을 encoding하는 유전자와 마찬가지로 유전자의 과발현이 라인 마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 흥미로운 사실은 *ATPG2* 유전자는 노화 지연 형질이 앞선 유전자에 비해 강하지 않은 것으로 나타난 반면, 종자 수확량 및 개체 크기 증가와 같은 생산성 증대에 보다 강한 효과를 가지는 것으로 나타났다. 따라서 AT-hook protein을 encoding하는 유전자에서도 그들의 특성에 따라 생산성 증대 혹은 노화지연의 표현형적 특징을 제공하는 차이가 있으리라 판단된다. 이러한 사실은 생산성 증대 우량 작물 개발에 있어서 대단히 중요한 요인이 될 수 있을 것이다. 작물의 특성에 따라 상기 유전자의 적용을 조절함으로써 생산성 증대 우량 작물 개발에 대한 핵심 기술이 될 것이다.

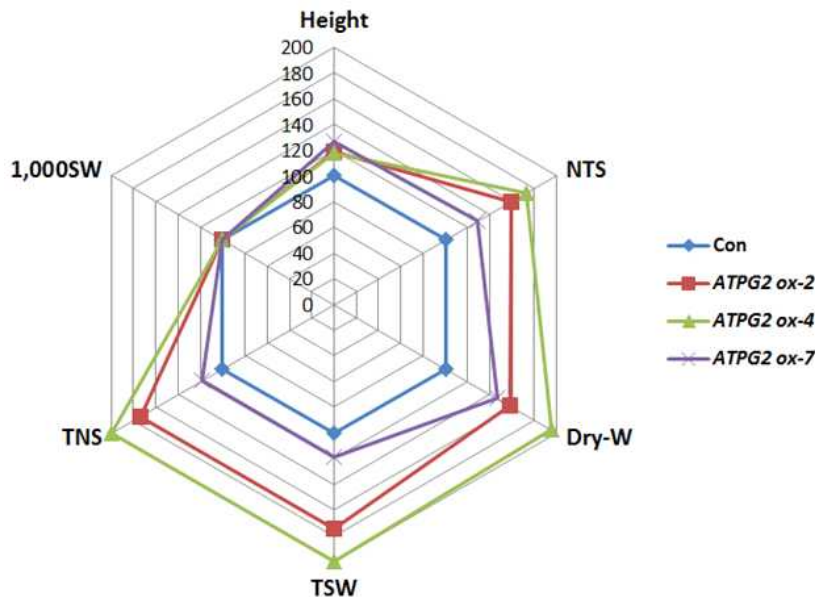


그림 63. *ATPG2* 과발현 애기장대 T<sub>2</sub> 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; Dry-W, weight of plant after dry (g); TSW, total seed weight (g); TNS, total seed number: 1000SW, total number of seeds thousand seed weight (g)

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

(height), 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. *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 종자 무게 및 종자 수에 있어서 증가하는 하는 것으로 나타났으며, 특히 *ATPG2 ox-2*와 *ATPG2 ox-4* 변이체는 1.8배 이상 증가한 것으로 나타났다. 그런 반면 종자 1,000개의 무게에는 대조구와 큰 차이가 없었다. 그리고 생체량과 생체건량에 있어서는 과발현 변이체 모두는 대조구에 비하여 약 1.4배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 사실은 *ATPG2* 유전자가 녹기 연장과 더불어 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다(그림 63). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 바이오매스 증대 혹은 종자 수확량 증대와 같은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

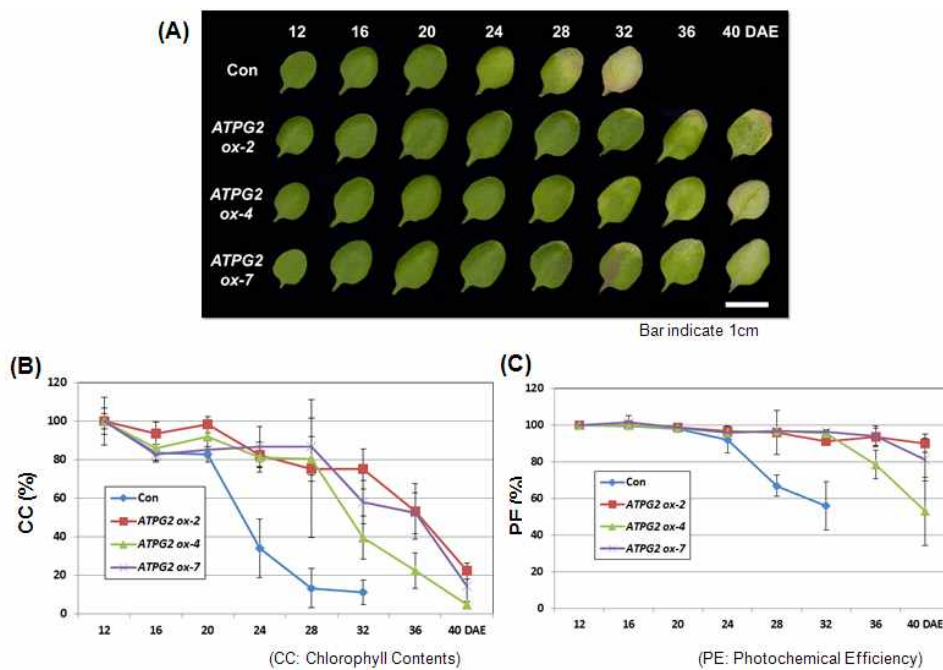


그림 64. *ATPG2* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량 (n=6)(B), 그리고 광합성 효율 (n=6)(C)

③ *ATPG2* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 대한 특성 분석: *ATPG2* 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T<sub>2</sub> 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 28일 이후 잎의 황화 현상이 급속히 진행되어 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 32일부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일째 일어남을 확인할 수 있었다(그림 64A). 이러한 사실로 미루어보아, *ATPG2* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 엽록소의 함량에 있어서는 그림 64B에 도

시된 바와 같이 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 20일 이후부터 급격한 감소를 보이며 28일째 엽록소의 함량이 최소 수준에 도달하였으나, *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7*의 경우 자엽 생성 후 28일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 정도의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다. 과발현 변이체의 광합성 효율 변화도 엽록소 함량 변화와 유사한 양상을 나타내었다. 야생종은 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 사라졌으나, *ATPG2 ox-4*를 제외하고 *ATPG2 ox-2*와 *ATPG2 ox-7*은 자엽 생성 후 40일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않았다(그림 64C). 상기 결과로부터, *ATPG2* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ATPG2* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

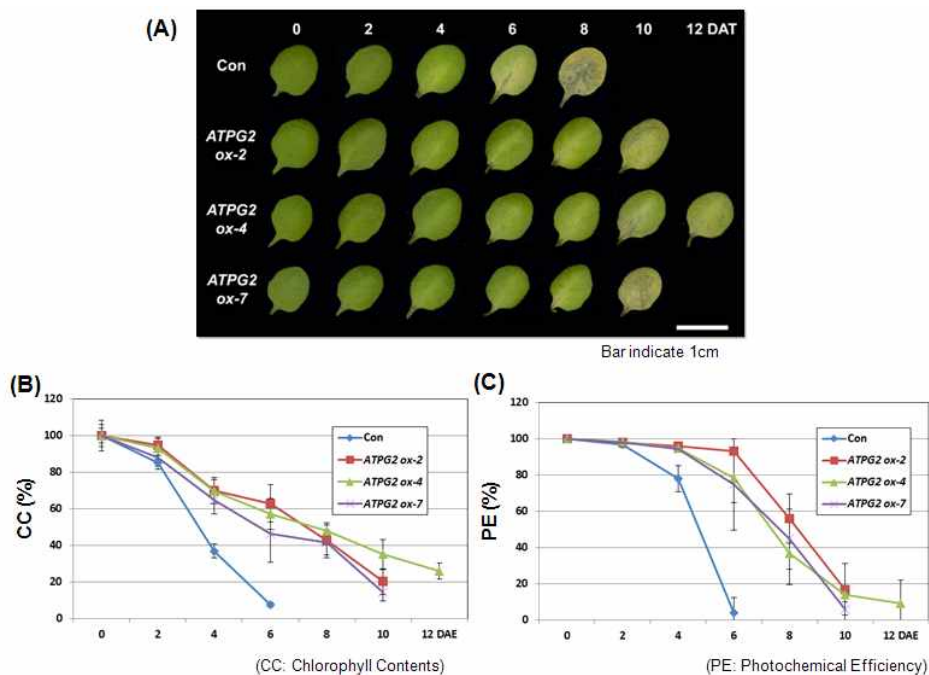


그림 65. *ATPG2* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량 (n=6)(B), 그리고 광합성 효율 (n=6)(C)

④ *ATPG2* 과발현 변이체의 암-유도 노화에 대한 특성 분석: 노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG2* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T<sub>2</sub> 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액 (2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 조사하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암 처리 후 6일 이후부터 잎의 황화 현상이 급속히 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 10일 이후부터 급속히 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(그림 65A). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암 처리 후 2일

이후 급격한 감소를 가져 6일 이후 최소 수준을 나타냈으나, *ATPG2 ox-2*, *ATPG2 ox-4*와 *ATPG2 ox-7*의 경우, 대부분 6일째에도 50% 이상의 엽록소 함량을 나타냈다(그림 65B). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 *ATPG8* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(그림 65C).

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

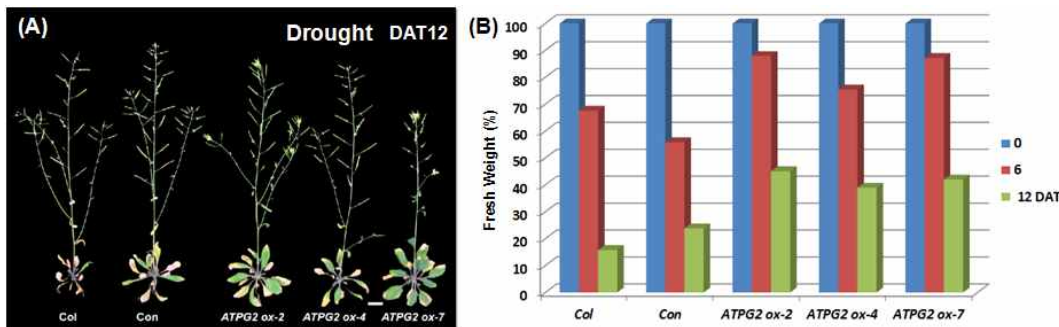


그림 66. *ATPG2* 과발현 형질전환체의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 잎의 무게 변화, n=6(B)

⑤ *ATPG2* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석: *ATPG2* 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 12일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 그림 66A와 B에 도시되었다. 야생형 애기장대는 가뭄에 의해 잎의 황화 현상이 급속히 진행됨을 알 수 있었으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 가뭄에 의하여 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그에 비하여 *ATPG2* 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ATPG2*이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

본 연구팀은 이들 유전자의 기능을 보다 심도 있게 밝히기 위하여 현재 나이-의존적 노화 및 암-유도 노화에 대한 노화관련 유전자의 발현 분석,  $H_2O_2$  스트레스에 대한 저항성 조사 등을 계속 수행하고 있는 중이다.

본 연구팀은 본사에서 확보하고 있는 ORE7과 상기에서 발굴한 AT-hook protein을 encoding하는 유전자 5종의 기능 분석을 통하여 chromatin architecture 조절 기술에 대한 새로운 모델을 제시하였다(그림 67). 제노마인(주)의 chromatin architecture 조절 기술은 식물의 노화 진행 동안 chromatin의 안정성을 제공하여 식물의 생산성 증대 또는 노화 지연의 표현형적 특징을 나

타낸다. 흥미로운 점은 이러한 표현형적 특징은 적용 유전자의 발현 레벨에 따른다는 것이다. 적용 유전자의 발현이 강하면 강할수록 노화 지연의 표현형이 강력하게 나타나고, 적용 유전자의 발현이 적정 수준을 유지하면 식물의 생산성 증대에 고효율의 표현형적 특징을 제공한다. 이러한 기술을 통한 생산성 증대는 야생형과 비슷한 수확시기를 가진다는 점에서 본 기술이 생산성 증대에 대한 형질 제공에 있어 아주 강력할 것으로 판단된다. 또한 본 기술은 염, 산화 혹은 건조와 같은 환경 스트레스에 대한 저항성도 제공하여 바이오매스 증대 형질 제공에 있어 보다 많은 장점을 제공할 것으로 확신한다.

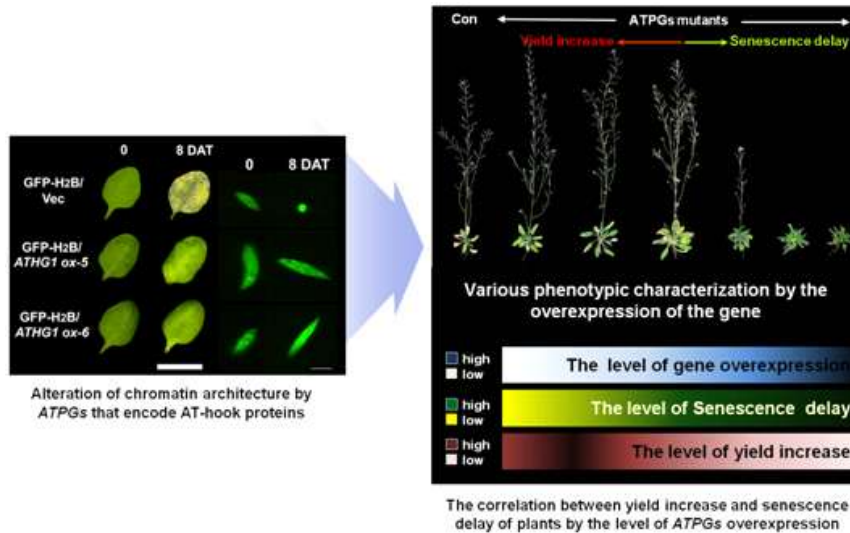


그림 67. Model for chromatin engineering technology of Genomine. The technology shows a wide range of yield increase and/or senescence delay in the plants by the expression level of *ATPGs* genes

#### 사. *GSDL2*(Genomine Senescence Delay Line 2, At4g35760): 녹기연장 및 스트레스 저항성 유전자

① 식물의 노화 및 스트레스 조절 기능을 갖는 *GSDL2* 발굴: 본 연구팀은 advanced RAM 변이체로부터 얻어진 유용 기능성 유전자 후보에서 신기능성 유용 유전자를 발굴하기 위하여 전사 인자 등 식물 성장·발달 조절관련 유전자에 대한 sense and/or antisense construct를 제작하고 이를 애기장대에 도입하여, 변이체의 표현형적 기능 분석 및 유전자의 기능 분석을 수행하였다. GIR213464 변이체는 잎의 형태 변이, pale green, 그리고 성장억제 등의 표현형적 특징을 가지며 At4G35760 유전자의 발현 억제를 통하여 유발된 것으로 밝혀졌으며(그림 68), 본 유전자의 과발현은 식물체에서 어떤 표현형적 특징을 가지는 지를 확인하였다. At4G35760 유전자의 과발현은 T1 형질전환 식물체에서 노화 지연이라는 표현형적 특징을 유도하였다. 본 연구팀은 At4G35760 유전자를 *GSDL2* (Genomine Senescence Delay Line 2)로 명명하였다. 본 유전자의 domain 기능 분석을 통하여 본 유전자의 과발현에 의한 표현형적 변이는 복합 스트레스에 대한 저항에 의해 유도되는 것으로 추측된다.

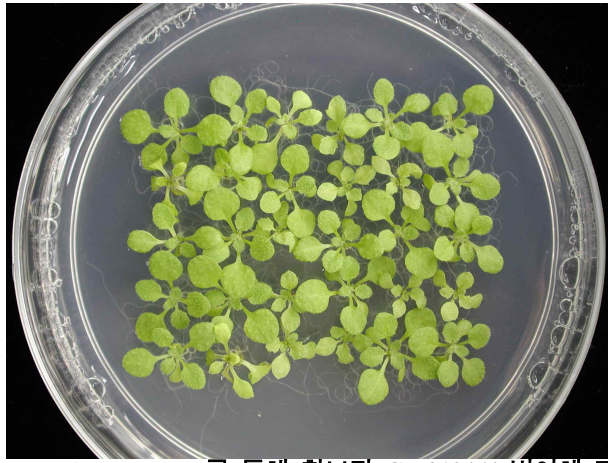


그림 68. advanced RAM approach를 통해 확보된 GIR213464 변이체 라인의 표현형적 특징

pSEN::GSDL2 벡터로 형질전환된 T<sub>1</sub> 애기장대는 대조군과 비교하여 볼 때, 놀랍게도 식물의 노화 과정이 현저히 지연되는 것을 알 수 있었으며, 이러한 노화 지연은 *GSDL2* 유전자의 과발현으로 유도되는 것으로 판단된다. 이러한 노화 현상을 확인하기 위하여 T<sub>2</sub> transgenic 라인인 *GSDL2-2*의 age-dependent senescence를 65일째 조사해 본 결과, T<sub>1</sub> transgenic plants와 같은 양상을 가졌다(그림 69). 이러한 노화 현상을 보다 세밀히 규명하기 위하여 본 연구팀은 dark-induced 그리고 age-dependent senescence에 대한 생리·생화학적 연구를 수행하였다.

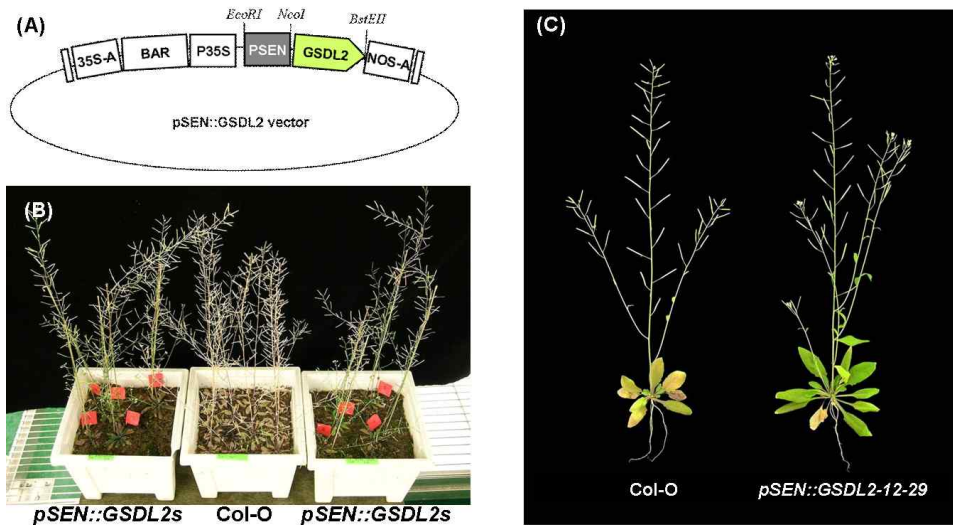


그림 69. *GSDL2* 과발현용 형질전환 벡터 모식도(A) 및 *GSDL2* 과발현 T<sub>1</sub>과 T<sub>2</sub> 형질전환체의 발아 후 65일째 표현형적 특징(B와 C)

② *GSDL2* 과발현 변이체의 노화에 대한 특성 분석: 그림 70에서 보는 바와 같이 야생형이 30일 이후 노화 표현형이 가속화 되는 반면 변이체 *GSDL2-12*는 40일 이후 노화 표현형이 가속화되었으며, 이러한 표현형에 대한 광합성 효율 또한 같은 경향을 나타내었다(A와 B). dark-induced leaf senescence 또한 age-dependent senescence와 같은 경향을 가졌다. 야생형 (Col-O)과 *GSDL2-12*가 25 DAG(days after germination) 시기가 되었을 때 3, 4번 잎을 detach하여



12일 동안 dark 처리를 하는 방법을 통해 dark-induced leaf senescence를 조사한 결과, 야생형이 4일부터 노화 표현형이 가속화되어 8일에 necrosis 단계에 도달하는 반면, 변이체 *GSDL2-12*는 6일까지 노화 표현형이 거의 나타나지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 광합성 효율 및 엽록소 함량 조사를 통한 생리학적 지표상에서도 확연히 변이체인 *GSDL2-126*에서 노화 지연 효과가 있음을 확인할 수 있었다(C와 D).

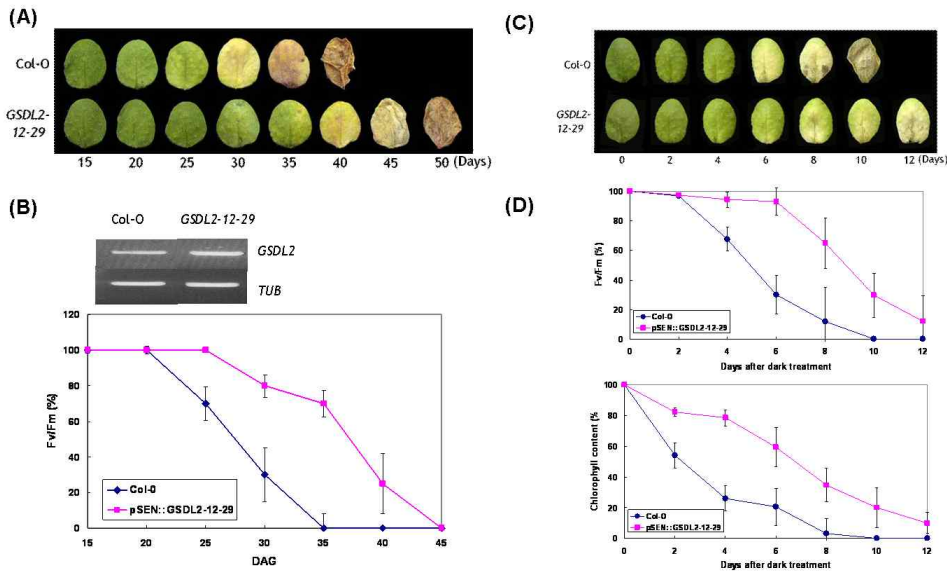


그림 70. *GSDL2* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 유전자 발현(양성대조구는 *TUB*)과 광합성 효율(n=6)(B), 그리고 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(C)과 엽록소 함량/광합성 효율(n=6)(D)

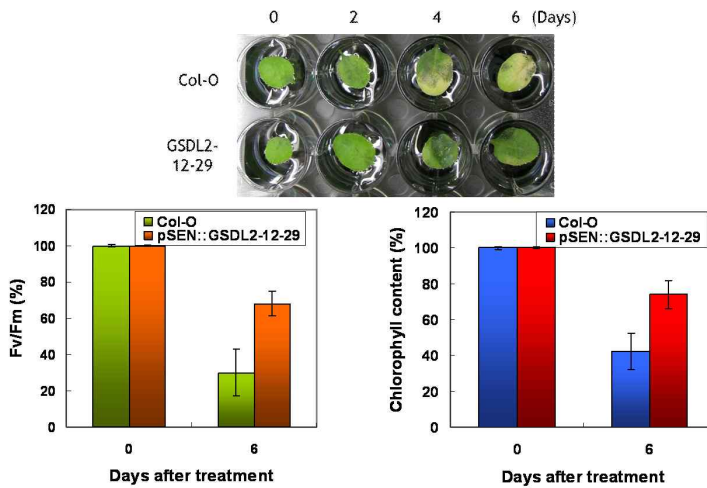


그림 71. *GSDL2* 과발현체의 6일 동안 150 mM NaCl 처리에 대한 표현형적 특징, 광합성 효율, 그리고 엽록소 함량 변화, n=6.

③ *GSDL2* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석: 흥미롭게도 이러한 노화 지연 특성을 가지는 *GSDL2*는 엽분 및 산화 스트레스에 대해서 저항성을 제공하였다. 야생형(Col-0)과

*GSDL2-12* 라인이 25 DAG(days after germination) 시기가 되었을 때 3, 4번 잎을 detach하여 6일 동안 150 mM NaCl과 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 결과, 변이체 *GSDL2-12* 라인은 염분과 산화 스트레스 모두 대해서 저항성을 가지는 것으로 나타났다(그림 71과 72). 따라서 본 유전자의 주요 작물 적용은 녹화 연장뿐 만 아니라 스트레스 저항성까지 유도할 수 있어 우량 품종 개발에 많은 장점을 제공할 것이라 판단된다.

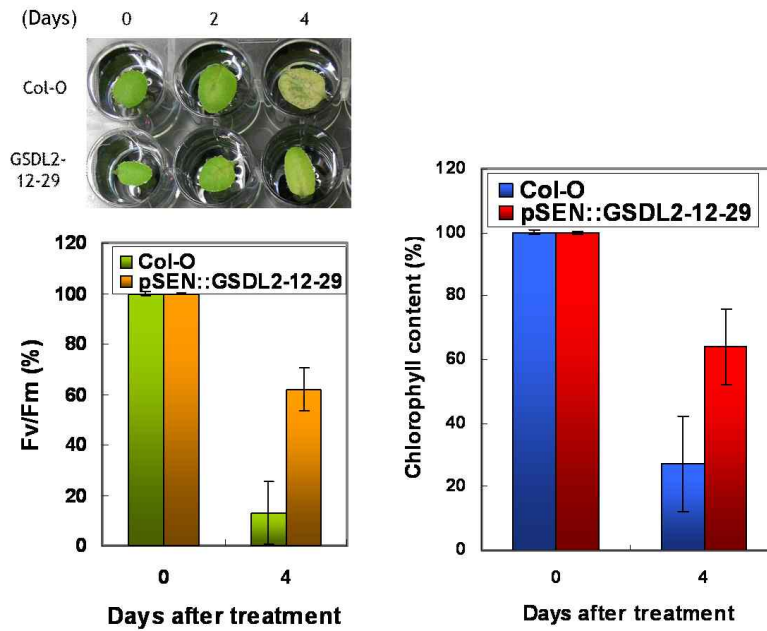


그림 72. *GSDL2* 과발현체의 4일 동안 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 대한 표현형적 특징, 광합성 효율, 그리고 엽록소 함량 변화, n=6.

### 제 3 절. 콩 형질전환체 개발

생산성 증대 우량 콩 형질전환체를 개발하기 위하여 본 연구팀은 기능성 유전자 연구를 통하여 확보된 유전자 및 신규 유용 유전자에 대한 형질전환 벡터 construct를 제작, 형질전환, 형질전환체 선별 및 형질전환체 기능 검정을 수행하였다.

#### 1. 콩 형질전환용 벡터 construct 제작

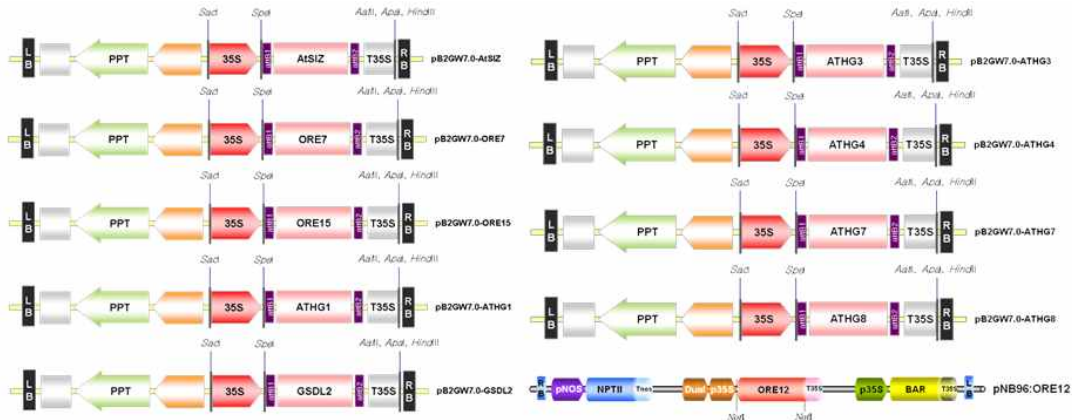


그림 73. 콩 형질전환용 벡터 construct. 1) pB2GW7.0-AtSIZ 벡터 construct, 2) pB2GW7.0-ORE7 벡터 construct, 3) pB2GW7.0-ORE15 벡터 construct, 4) pB2GW7.0-ATHG1 벡터 construct, 5) pB2GW7.0-GSDL2 벡터 construct, 6) pB2GW7.0-ATPG3 벡터 construct, 7) pB2GW7.0-ATPG4 벡터 construct, 8) pB2GW7.0-ATPG7 벡터 construct, 9) pB2GW7.0-ATPG8 and 10) pNB96:ORE12 벡터 construct. RB, right border; LB, left border; PPT, DL-phosphinothricin resistance; 35S, CaMV 35S promoter; T35S, terminator.



그림 74. pCSEN-IF 벡터 모식도(dhlsWHR)와 콩 형질전환용 벡터 construct. 1) pCSEN-ATPG3 벡터 construct, 2) pCSEN-ATPG4 벡터 construct, 3) pCSEN-ATPG7 벡터 construct and 4) pCSEN-ATPG8 벡터 construct. RB, right border; LB, left border; PPT, DL-phosphinothricin resistance; 35S, CaMV 35S promoter; T35S, terminator.

본 연구팀은 바이오에너지 원료 작물로서 생산성 증대 우량 콩 품종을 개발하기 위하여 기능이 검증된 확보 유전자 및 신규 유전자 등 총 10종에 대한 발현 construct를 제작하여 형질전환을 수행하였다. 적용 유전자는 *ORE7*, *AtSIZ* (*AtSZF2*), *ORE15*, *ORE12*, *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8* 그리고 *GSDL2*이며, *ORE12*를 제외하고는 모두 pENTR vector를 사용하여 유용 유전자를 pB2GW7.0 vector로 삽입하는 구조로 그림 73에서 각 유전자에 대한 벡터 모

식도를 제시하고 있다. *ORE12*의 경우, pNB96 vector를 사용하여 유전자를 삽입하였으며 그 모식도도 그림 73에서 제시하고 있다. 한편 최근 발굴된 신규 유전자인 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG8* 유전자의 경우, GM 작물 개발에 있어서 특히 최소 회피 혹은 발달 단계에 대한 인위적 조절이 가능한 pCSEN 벡터에 유전자를 도입하여 형질전환용 벡터 construct를 제작하여 형질전환을 진행하고 있다(그림 74).

## 2. 콩 형질전환체 개발 및 기능 검정

본 연구팀은 상기 유전자에 대한 14종의 vector construct에 대한 콩 형질전환을 수행하고 있으며, 적용된 형질전환 기법 및 재분화 단계는 상기 연구 추진 방법에서 제시하고 있다. 우리는 현재 *ORE7*과 *AtSZF2* 유전자에 대한 포장시험을 수행하였으며, 그들에 대한 기능 분석을 통하여 2종 모두 생산성 증대 우량 형질전환체로서의 가치를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 형질전환체들은 추후 세대진전 및 GM 작물 안정성/위해성 평가 등을 통하여 생산성 증대 우량 형질전환체로 개발하고자 한다. 또한 우리는 2종의 8종의 유전자에 대해서는 형질전환을 수행하고 있으며, 이중 6종에 대해서는 형질전환체 선별 및 일차 형질전환체 기능 분석을 수행하고 있다. 적용 유전자에 대한 세부 연구 내용은 다음과 같다.

### 가. *ORE7*-soybean (생산성 증대 우량 형질전환체 개발)

① ***ORE7*-soybean 생산 및 형질전환체 확인:** 35S::*ORE7*으로 형질전환된 종자로부터 체초제 저항성 형질전환 식물의 분화 및 생육 단계를 거쳐 종자를 수확하였다(그림 75). 현재 35S::*ORE7* T0 형질전환체는 20 개체 이상 확보하고 있다. 35S::*ORE7*의 경우, T0 형질전환 식물에서 삽입 유전자 및 선별 유전자에 대한 PCR을 통하여 유용 형질 삽입에 대한 증명을 수행하였으며, 또한 삽입 유전자인 *ORE7*에 대한 RT-PCR을 통하여 삽입 유전자의 발현을 확인하였다(그림 76). 이러한 T0 형질전환 식물체로부터 T1, T2 형질전환 종자 수확을 완료하여 T2 transgenic line에 대한 노화 표현형을 조사하였다.



그림 75. *ORE7* 과발현 콩 형질전환체의 재분화 및 생산

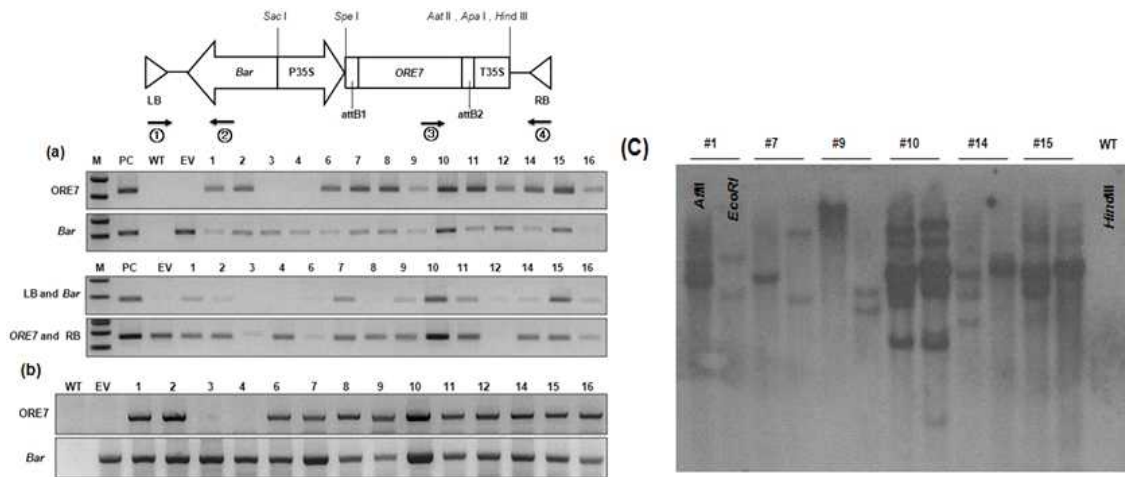


그림 76. *ORE7* 과발현 콩 형질전환체의 PCR(a), RT-PCR(b), Southern(c)을 통한 형질전환체 확인

② ***ORE7*-soybean 목표형질 분석:** 우리는 확보한 *ORE7* 과발현 T2 종자로부터 T2 transgenic plants를 V2-stage까지 생육시킨 후 2-node의 잎을 detach하여 암 상태에서 42일간 방치한 결과, 대조구(Wild type과 공벡터)에 비하여 transgenic 라인에서 잎의 노화 지연 표현형이 뚜렷하게 나타남을 알 수 있었다. 그리고 42일간 방치한 detach한 잎의 클로로필 함량을 측정된 결과, 대조구에 비하여 transgenic 라인에서 클로로필 함량이 높게 나타났다(그림 77). Detach한 잎뿐만 아니라, whole plants에서도 노화 지연 표현형을 나타내는지 알아보기 위해서 T2 transgenic plants를 V2-stage까지 생육시킨 후 whole plants를 암 상태에서 21일간 방치하였다. 그 결과, 대조구에 비하여 transgenic 라인에서 잎의 노화 지연 표현형이 뚜렷하게 나타남을 알 수 있고, 클로로필 함량과 광합성 측정에 있어서도 높게 나타났다(그림 78). 우리는 이러한 노화 지연 표현형을 가지는 변이체로부터 정상적인 생육과정(greenhouse) 중에서도 노화가 지연되는지에 대해 조사해보았다. 그 결과, 대조구에 비해서 transgenic 라인에서 잎의 노화가 지연되는 것을 알 수 있었고, 클로로필과 엽록소 함량도 높게 측정되었다(그림 79). 그리고 우리는 *ORE7*의 발현을 통하여 잎의 노화에 관련된 유전자 발현을 조사해 본 결과, 콩의 노화에 관련된 유전자 (*GmRbcL*, *Gmcab3*와 *GmSARK*)들의 발현이 증가하였음을 알 수 있었다(그림 80). 이러한 사실로 미루어보아 *ORE7* 유전자는 애기장대 뿐만 아니라 콩에서도 노화관련 유전자의 발현을 조절하여 노화 지연에 대한 표현형적 특징을 나타내는 것으로 판단된다.

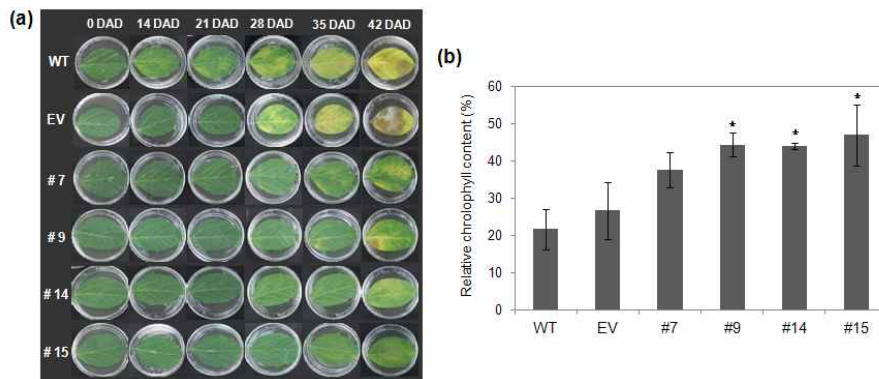


그림 77. *ORE7* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화동안 표현형적 특징(a) 및 클로로필 함량 측정, n=6(b)

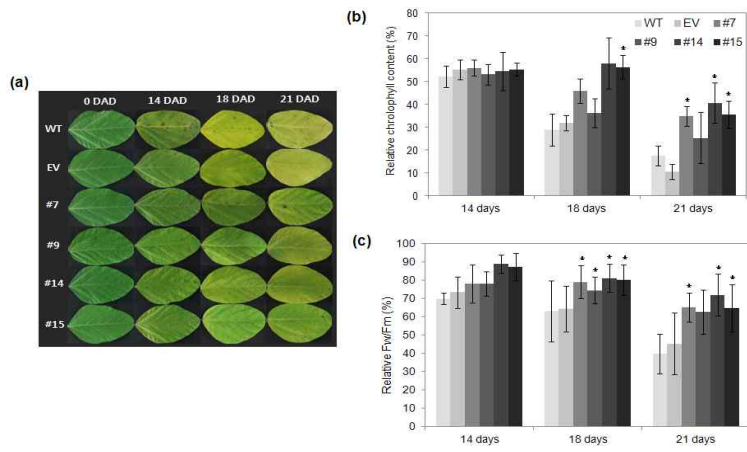


그림 78. *ORE7* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화동안 표현형적 특징(a), 엽록소 함량 측정(b) 및 광합성 함량 측정, n=6(c)

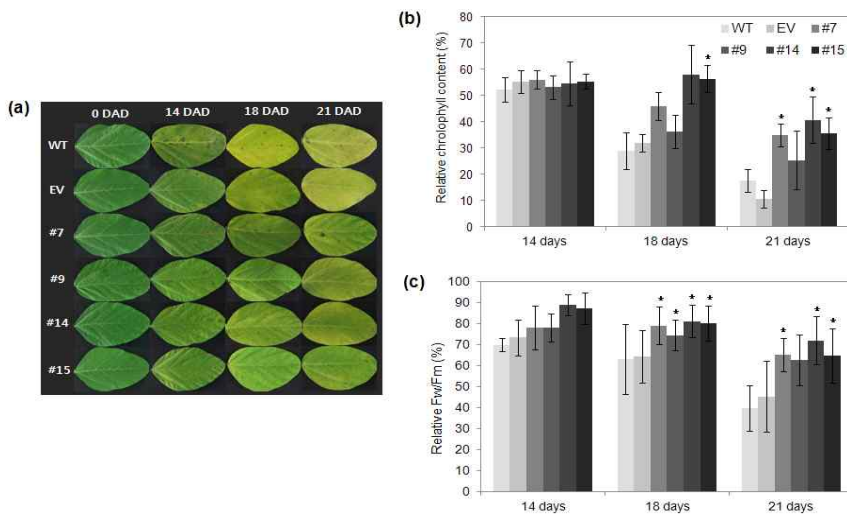


그림 79. *ORE7* 과발현 형질전환체의 age-dependent senescence동안 표현형적 특징(a), 엽록소 함량 측정(b) 및 광합성 함량 측정, n=6(c)

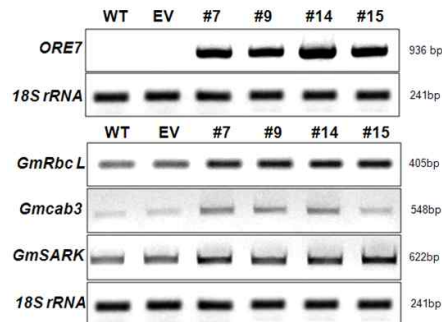


그림 80. *ORE7* 과발현 형질전환체의 노화 관련 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 18S rRNA

③ *ORE7*-soybean 농업형질 분석: 이러한 노화 지연의 표현형적 특징을 가지는 형질전환체의 생산성 증대 효과를 확인하기 위하여 대조구와 35S::*ORE7* transgenic T2 라인을 온실에서 생육하여 그들의 노화 지연과 생산성 증대에 대한 표현형적 특징을 분석하였다. 그 결과 35S::*ORE7* transgenic T2 라인, 특히 #9, #14, 그리고 #15 라인은 대조구에 비하여 노화 지연 및 생산성 증대에 대하여 특징적인 표현형을 가졌다(그림 81).

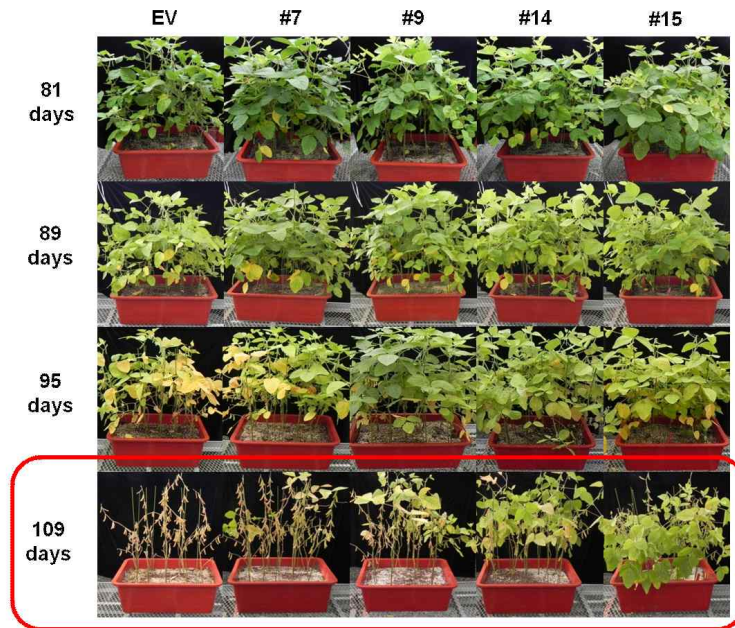


그림 81. ORE7 과발현 T2 형질전환체의 온실 조건에서 표현형적 특징. (a) EV, control; #7, #9, #14 and #15, T2 transgenic soybean lines. Note, #15 lines showed dramatic phenotypic characterization of yield increase and senescence delay.

온실 조건에서 노화 지연과 생산성 증대의 표현형적 특징을 가지는 형질전환체의 생산성 증대에 대한 농업적 형질을 확인하기 위하여 대조구와 35S::ORE7 transgenic 라인의 포장시험을 통한 농업적 특성을 조사하였다. 오창 생명공학연구원 GMO포장에서 대조구와 T2 transgenic 종자를 파종하여 6개월 뒤에 T3 종자를 수확하여, 생산성 증대 parameter에 대한 기능 분석을 수행하였다. 그 결과 형질전환 라인들은 모두 야생형에 비하여 높은 종자 생산율을 보였으나, 공벡터를 적용한 대조구에서는 야생형의 그것과 일부 차이를 가지고 있었다. #9와 #15 형질전환 라인은 전체적으로 대조구(야생형과 공벡터)에 비하여 높은 종자 생산율을 가지는 것으로 나타났다. 특히 #15 형질전환체는 야생형과 비교해 보았을 때 약 180%, 그리고 공벡터 대조구와 비교해 보았을 때 약 120%의 총 종자 생산율을 나타냈다(Table 3). 따라서 우리는 #15 형질전환 라인을 우량 형질전환 라인 후보군으로 선별하여 생산성 증대에 대한 형질을 확인하고자 2차 포장시험을 수행하였다. 그 결과, #15 형질전환 라인 117 개체 중에서 도입 유전자의 발현양에 따라 노화지연 형질을 보이는 64 개체와 생산량 증대를 나타내는 53 개체로 나뉘는 것을 알 수 있었다. 이러한 표현형적 특징은 삽입 유전자의 높은 copy 수에 의한 형질 미분리, 그리고 이로 인한 삽입 유전자 발현의 불안정 등에 기인하는 것으로 판단된다.

④ 생산성 증대 우량 ORE7-soybean 개발: 흥미로운 점은, 생산성 증대의 표현형질을 가지는 라인들은 대조구에 비하여 평균 130% 이상의 종자 수확량을 보였으며, 그 중 7 라인은 약 200% 이상의 종자 수확량을 가졌다(그림 82). 이러한 종자 수확량의 증가는 stem height, nod 수, 분지 수, pod 수, 총 과립 무게, 그리고 100개의 종자 무게에 대한 yield increase parameter로 분석한 결과 화기 형성 촉진으로 인한 pod의 수적 증가에 기인하는 것으로 나타났다(그림 83). 따라서 우리는 ORE7 콩 형질전환체가 생산성 증대라는 농업 형질을 가진 우량 형질전환체임을 결정하였고, 확보된 7 라인의 세대 확인을 통하여 생산성 증대 형질이 독립적으로 분리되고 안

정화된 우량 콩 품종 개발을 수행하고자 하며 이러한 연구는 바이오디젤 생산용 생산성 증대 우량 콩 품종 개발의 성공을 유도하리라 확신한다.

Table 3. 포장시험을 통한 대조구와 *ORE7* 과발현 형질전환 콩의 농업적 특성 비교, n=15

	Stem height (cm)	No. of Nods	No. of branch	No. of Pods	Ratio of 1 seeds per pod (%)	Ratio of 2-3 seeds per pod (%)	Sum of grain weight (g)	Fresh 100 grain weight (g)
WT	69.6±1.8	14.2±0.4	7.1±0.6	162.1±24.7	26.7±3.2	60.8±2.08	27.2±3.9	11.7±0.5
E.V	84.4±2.7	14±0.6	11.1±1.2	214.3±24.5	32.4±4.7	51.7±5.9	40.3±2.5	13±0.3
#7	78.4±3.2	14.7±0.6	8.4±0.7	197.9±23.9	18.9±2.9	58.6±7.2	32±5.6	12.8±0.7
#9	75.6±7.2	16±0.8	8.4±0.8	249.9±24.7	22.4±2.6	65.8±5.5	48.1±4	12.5±0.3
#14	81.5±4.4	15.1±0.2	9.9±0.7	211.6±13.4	21.4±1.8	65.3±4.2	38.2±4.3	12.5±0.4
#15	86.8±3.1	15.5±0.5	9.1±0.7	238.4±16.6	22.6±3.7	72.2±4.7	49.1±3.7	11.8±0.3

WT; wild type (Kwangankong), E.V.; empty vector (transgenic T1 plant for vector (only bar)), #7, 9, 14 and 15; transgenic lines.

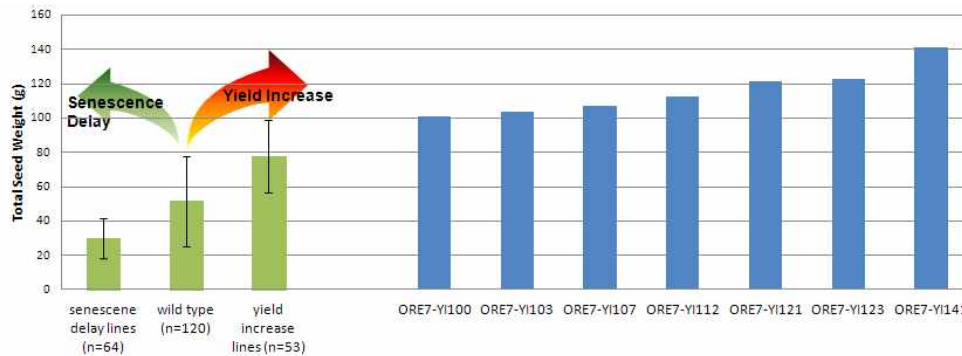


그림 82. 포장시험을 통한 대조구와 *ORE7* 과발현 형질전환 콩의 종자생산량 비교 그래프

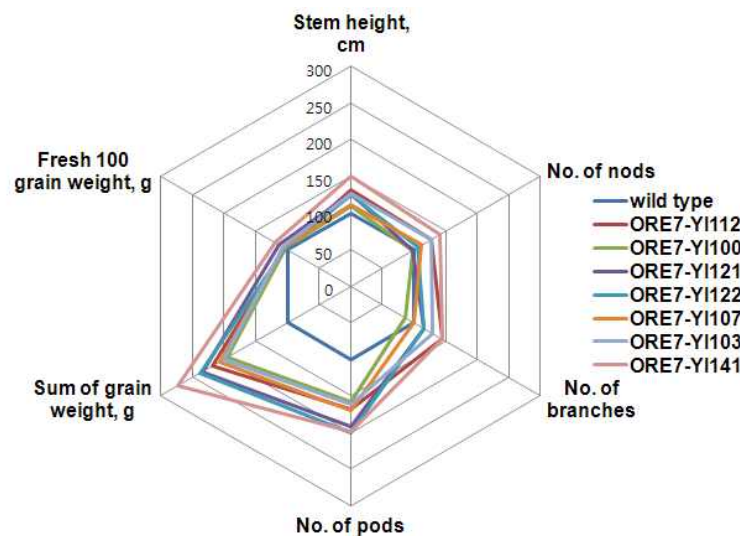


그림 83. *ORE7* 과발현 형질전환 T<sub>3</sub> 콩의 생산성 증대 지표 분석. ORE7YI-100, ORE7YI-103, ORE7YI-107, ORE7YI-112, ORE7YI-121, 1 ORE7YI-23 and ORE7YI-141: representative yield increase lines.



나. AtSZF2-soybean(생산성 증대 우량 형질전환체 개발, 부록 5-특허 10-2011-0084975)

① AtSZF2-soybean 생산 및 형질전환체 확인: 우리는 AtSZF2 유전자가 삽입된 형질전환 종자로부터 제초제 저항성 형질전환 식물의 분화를 거쳐 생육 단계를 거쳐 종자를 수확하였다. 현재 우리는 35S::AtSZF2 T0 형질전환체를 10 개체 이상 확보하고 있다(그림 84). 35S::AtSZF2의 경우, T0 형질전환 식물에서 삽입 유전자 및 선별 유전자에 대한 PCR을 통하여 유용 형질 삽입에 대한 증명을 수행하였으며, 또한 삽입 유전자인 AtSZF2에 대한 RT-PCR, 그리고 PCR과 Southern blot을 통하여 삽입 유전자의 발현 및 도입을 확인하였다(그림 85).



그림 84. AtSZF2 과발현 콩 형질전환체의 재분화 및 생산

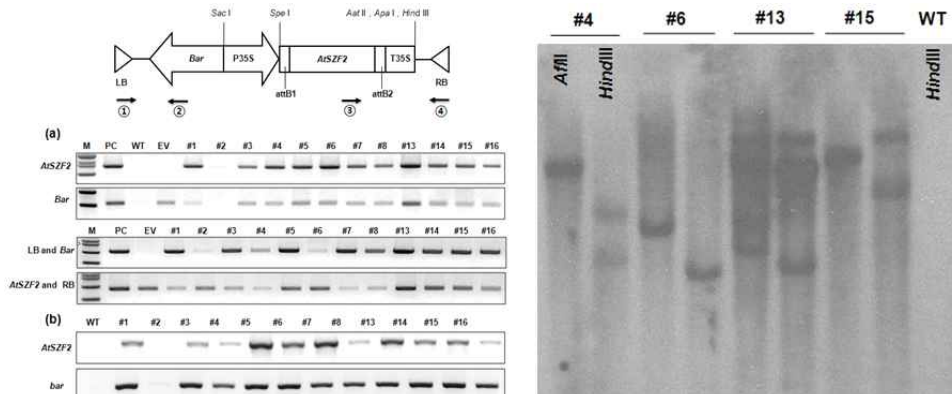


그림 85. AtSZF2 과발현 콩 형질전환체의 PCR(a), RT-PCR(b), Southern(c)을 통한 형질전환체 확인

② AtSZF2-soybean 목표형질 분석: 형질전환체의 *in vitro* 염분 스트레스에 대한 저항성을 확인하기 위하여 AtSZF2 과발현 T2 종자로부터 T2 형질전환 콩을 V2-stage까지 생육시킨 후 2-node의 잎을 detach하여 200 mM의 NaCl 스트레스 하에서 18일간 방치한 결과, 대조구에 비하여 #4와 #6 형질전환 라인에서 염분 스트레스에 대한 저항성 표현형을 강력하게 나타냈으며, 18일 동안 방치한 잎의 클로로필을 측정해 본 결과, 대조구에 비해서 #4와 #6 형질전환 라인에서 클로로필 함량이 높게 나온 것을 알 수 있었다(그림 86). 또한 형질전환체의 *in vivo* 염분 스트레스에 대한 저항성을 확인하기 위하여 락울을 이용하여 T2 형질전환 식물체를 200 mM의 NaCl 스트레스 하에서 10일간 방치하였다. 그 결과, *in vitro*의 결과와 마찬가지로 #4와 #6 형질전환 라인에서 염분 스트레스에 대한 저항성을 강하게 나타나는 것을 확인 할 수 있었고, 염

분에 의한 세포 사멸 정도를 알아보기 위해서 ion leakage를 측정해 본 결과, 대조구보다 #4와 #6 형질전환 라인에서 세포사멸 정도가 낮은 것을 알 수 있었다(그림 87). 그리고 우리는 *AtSZF2*의 발현을 통하여 염분 스트레스 저항성을 가지는 변이체의 염분 스트레스관련 유전자 발현을 조사해 본 결과, 콩의 염분 스트레스관련 유전자 중 대부분의 유전자(*GmDREB2*, *GmDREB3*, *GmOLPb*, *GmERF3*, *GmPHD2*, *GmGT-2A*, *GmGT-2B*, *GmbZIP62*, *GmWRKY54*) 발현이 증가하였음을 알 수 있었다(그림 88). 따라서 *AtSZF2*의 삽입을 통한 콩에서의 발현은 콩의 염분 스트레스관련 유전자의 발현을 증가시킴으로써 염분 스트레스에 대한 저항성을 제공할 것으로 추측된다.

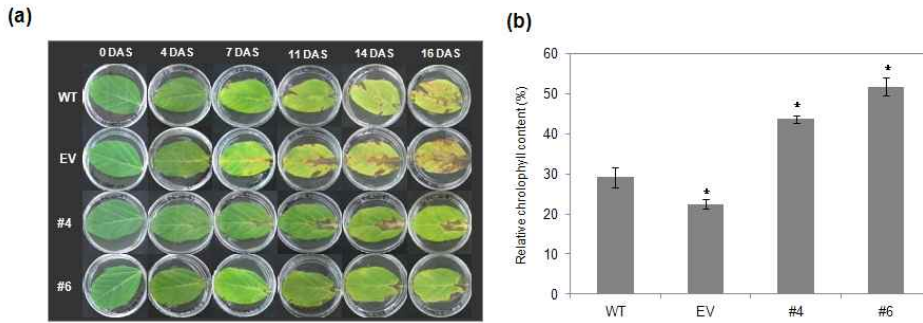


그림 86. *AtSZF2* 과발현 형질전환체의 200mM NaCl 처리에 의한 표현형적 특징(a), 클로로필 함량, n=6(b)

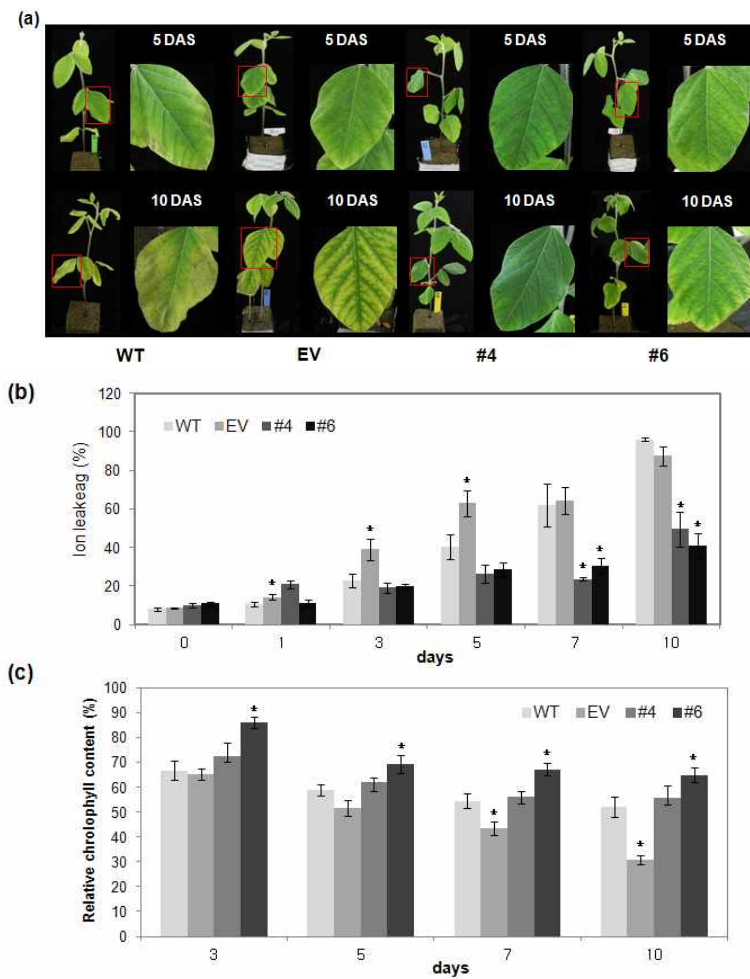


그림 87. *AtSZF2* 과발현 형질전환체의 200 mM NaCl 처리에 의한 표현형적 특징(a), ion leakage 분석, n=6(b)

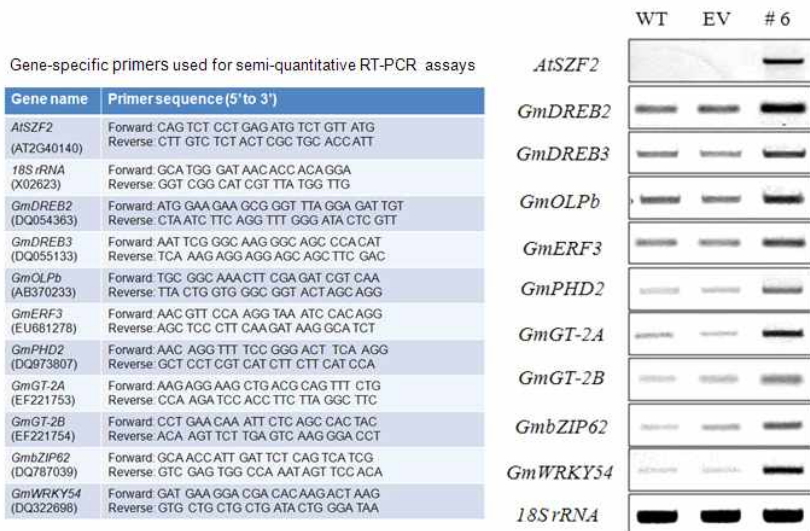


그림 88. *AtSZF2* 과발현 형질전환체의 salt 스트레스 관련된 콩 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 18S rRNA

③ **AtSZF2-soybean 농업형질 분석 및 생산성 증대 우량 AtSZF2 콩 형질전환체 개발:** 이러한 염분 스트레스에 대한 저항성의 표현형적 특징을 가지는 형질전환체의 생산성 증대 효과를 밝히기 위하여 대조구와 35S::AtSZF2 형질전환 라인의 포장시험을 통한 농업적 특성을 조사하였다. 오창 생명공학연구원 GMO포장에서 대조구와 T2 형질전환 종자를 파종하여 6개월 뒤에 T3 종자를 수확하여, 생산성 증대 parameter에 대한 기능 분석을 수행하였다. 그 결과 형질전환 라인들은 모두 야생형에 비하여 높은 종자 생산율을 보였으나, 공벡터를 적용한 대조구에서는 야생형의 그것과 일부 차이를 가지고 있었다. 이러한 결과는 추후 2차 포장시험 및 보다 심도 있는 스트레스 저항성 분석을 통하여 결과 분석이 필요로 할 것으로 보인다. #6와 #15 형질전환 라인은 전체적으로 대조구(야생형과 공벡터)에 비하여 높은 종자 생산율을 가지는 것으로 나타났다. 특히 #6 형질전환 라인은 앞선 염분 스트레스 저항성에서 뿐만 아니라 종자 수확량 증가에 있어서도 월등한 형질을 가지고 있었다. #6 형질전환 라인은 야생형과 비교해 보았을 때 약 200%, 그리고 공벡터 대조구와 비교해 보았을 때 약 140%의 총 종자 수확량을 나타냈다(Table 4). 따라서 우리는 유전자 삽입에 대한 목표형질과 농업형질을 모두 가지는 #6 형질전환체 라인을 생산성 증대 우량 AtSZF2 콩 형질전환체로 결정하였고, 추후 2차 포장시험 및 심도 있는 스트레스 저항성 조사를 통하여 생산성 증대에 대한 형질을 재확인하고자 하며, 또한 보다 많은 우량 형질전환체 후보를 확보하기 위하여 선별된 라인들에 대한 2차 포장시험 및 심도 있는 스트레스 저항성 조사를 함께 수행하여 우량 형질전환체 개발에 보다 집중하고자 한다.

한편 본 연구팀은 이러한 생산성 증대 우량 형질전환체 개발에 대하여 국내특허를 출원하였으며, 또한 본 연구에서 생산된 *AtSZF2* single copy 형질전환 라인을 생명공학연구원 정순천 박사 연구팀과 공동으로 이를 통한 GM 콩 작물 선별 키트 등의 이용 방법에 대한 국내특허를 출원하였다.

Table 4. 포장시험을 통한 대조구와 *AtSZF2* 과발현 형질전환체의 농업적 특성 비교, n=15

	Stem height (cm)	No. of Nods	No. of branch	No. of Pods	Ratio of 1 seeds per pod (%)	Ratio of 2-3 seeds per pod (%)	Sum of grain weight (g)	Fresh 100 grain weight (g)
WT	69.6±1.8	14.2±0.4	7.1±0.6	162.1±24.7	26.7±3.2	60.8±2.08	27.2±3.9	11.7±0.5
EV	84.4±2.7	14±0.6	11.1±1.2	214.3±24.5	32.4±4.7	51.7±5.9	40.3±2.5	13±0.3
#4	80.2±4.8	14.5±0.8	9.5±0.8	196.5± 22.1	19.9±1.9	69.4±4.3	36.9±1.9	13±0.4
#6	86.3±4.9	16.3±0.8	9±1.4	245.7±36	15.1±2.5	82.7±2	54.4±8.5	11.5±0.3
#13	74.4±1.7	15.4±0.2	10±1.1	209.4±41.2	26.7±1.8	63.6±4	37.9±2.6	12.5±0.4
#15	88.6±4	12.9±0.7	7.1±0.3	220.6±14	22.6±1.9	72.2±2.4	45.3±3.6	12.1±0.3

WT; wild type (Kwangankong), EV; empty vector (transgenic T1 plant for vector (only bar)), #4, 6, 13 and 15; transgenic lines.

#### 다. 그 외 유전자 도입 콩 형질전환체 개발

① 그 외 유전자 도입 콩 형질전환체 생산 및 형질전환체 확인: 바이오에너지 원료 작물로서 생산성 증대 우량 콩 품종을 개발하기 위하여 기능이 검증된 기확보 유전자 및 신규 유전자 등 총 8종에 대한 발현 construct를 제작하여 형질전환을 수행하였다. 적용 유전자는 *ORE15*, *ORE12*, *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8* 그리고 *GSDL2*이며, 최근 발굴된 신규 유전자인 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG8* 유전자의 경우, GM 작물 개발에 있어서 특히 최소 회피 혹은 발달 단계에 대한 인위적 조절이 가능한 pCSEN 벡터에 유전자를 도입하여 형질전환용 벡터 construct도 제작하여 형질전환을 수행하고 있다.

우리는 *ATHG1*, *GSDL2*와 *ORE15* 유전자가 삽입된 형질전환 종자로부터 제초제 저항성 형질전환 식물의 분화 및 생육 단계를 거쳐 T0 종자를 수확하였다. 반면, *ATPG3*와 *ATPG4* 유전자에 대해서는 삽입된 형질전환 종자로부터 제초제 저항성 형질전환식물체를 생산하였고 T0 종자를 수확할 계획이다.

현재 우리는 35S::ATHG1 T0 형질전환체를 9 개체를 확보하였다(그림 89). 그리고 T0 형질전환 식물에서 삽입 유전자 및 선별 유전자에 대한 PCR을 통하여 유용 형질 삽입에 대한 증명을 수행하였으며, 또한 삽입 유전자인 *ATHG1*에 대한 RT-PCR을 통하여 삽입 유전자의 발현을 확인하였다(그림 90).

마찬가지로 35S::GSDL2 T0 형질전환체는 6 개체를 확보하였다(그림 91). T0 형질전환 식물에서 삽입 유전자 및 선별 유전자에 대한 PCR을 통하여 유용 형질 삽입에 대한 증명을 수행하였으며, 또한 삽입 유전자인 *GSDL2*에 대한 RT-PCR을 통하여 삽입 유전자의 발현을 확인하였다(그림 92). 추후 노화 관련 실험을 위해서는 많은 종자가 필요하기 때문에 오창 생명공학 연구원 GMO포장에 파종을 하였고 T2 종자를 확보하였다. 이후 노화 관련 세부 조사를 수행할 예정이다.

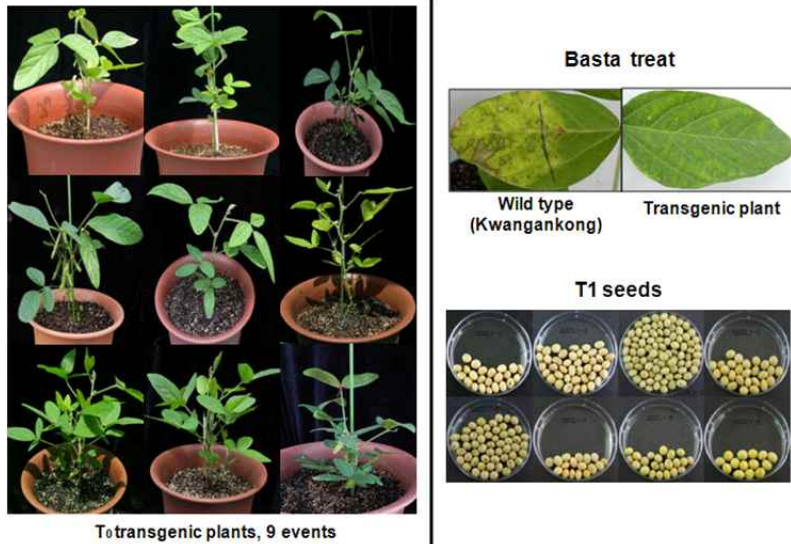


그림 89. *ATHG1* 과발현 콩 형질전환체의 생산 및 종자 수확

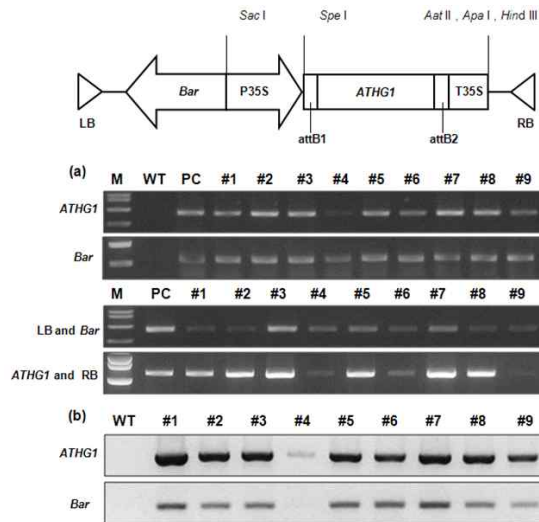


그림 90. *ATHG1* 과발현 콩 형질전환체의 PCR(a) 과 RT-PCR(b)을 통한 형질전환체 확인

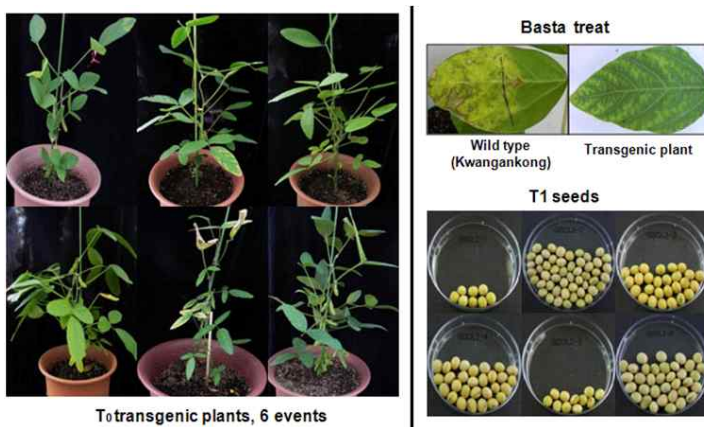


그림 91. *GSDL2* 과발현 콩 형질전환체의 생산 및 종자 수확

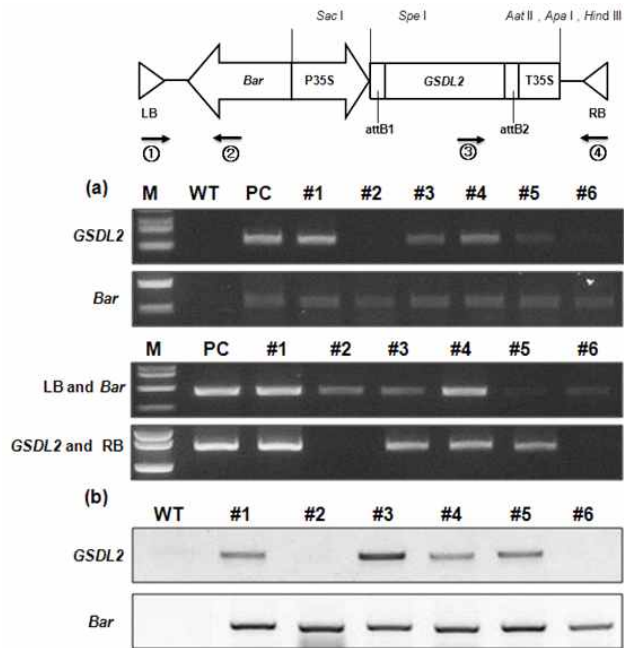


그림 92. *GSDL2* 과발현 콩 형질전환체의 PCR(a)과 RT-PCR(b)을 통한 형질전환체 확인

35S::ORE15의 경우, T0 형질전환체는 19개체를 확보하였다(그림 93). T0 형질전환 식물에서 삽입 유전자 및 선별 유전자에 대한 PCR을 통하여 삽입 유전자에 대한 증명을 수행하였다(그림 94). RT-PCR을 통한 유전자의 발현을 확인할 계획이며 T1 종자들은 올해 5월 파종시기를 맞추어 오창 생명공학연구원 GMO포장에 파종할 계획이다.

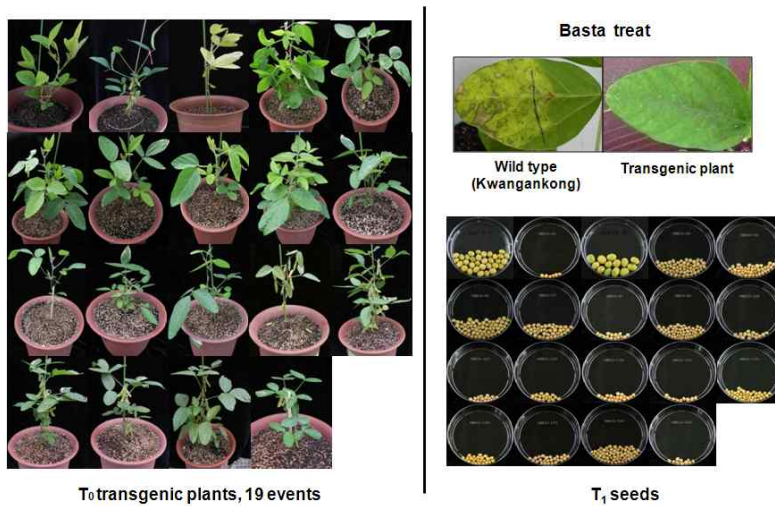


그림 93. *ORE15* 과발현 콩 형질전환체의 재분화 및 생산

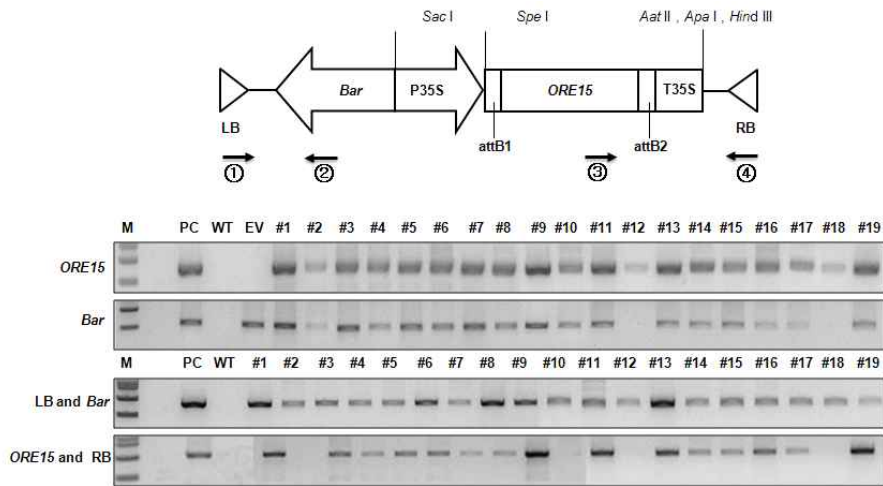


그림 94. *ORE15* 과발현 콩 형질전환체의 PCR을 통한 형질전환체 확인

35S::ATPG3와 ATPG4의 경우, T0 형질전환체를 생산 중이다. 현재 small pot에서 large pot로 옮겨져서 온실에서 재배 중이며 다른 형질전환체와 마찬가지로 도입 유전자 확인 및 유전자의 발현 여부를 위한 실험도 병행 할 계획이다(그림 95와 96).



그림 95. *ATPG3* 과발현 콩 형질전환체의 재분화 및 생산



그림 96. *ATPG4* 과발현 콩 형질전환체의 재분화 및 생산

## 제 4 절. 유채 형질전환체 개발

생산성 증대 우량 유채 형질전환체를 개발하기 위하여 본 연구팀은 기능성 유전자 연구를 통하여 기확보된 유전자 및 신규 유용 유전자에 대한 형질전환 벡터 construct를 제작, 형질전환, 형질전환체 선별 및 형질전환체 기능 검정을 수행하였다.

### 1. 유채 형질전환용 벡터 construct 제작

본 연구팀은 바이오에너지 원료 작물로서 생산성 증대 우량 유채 품종을 개발하기 위하여 기능이 검정된 기확보 유전자 및 신규 유전자 6종에 대한 발현 construct를 제작하여 형질전환을 수행하였다. 적용 유전자는 *ORE7*, *AtSIZ*, *ORE15*, *ORE12*, *ATHG1* 그리고 *GSDL2*이며, *ORE15*에 대한 construct는 pCAMBIA3301 벡터를, *ORE7*에 대한 construct는 4X 35S enhancer를 사용한 4X35SE 벡터를, *ORE12*와 *AtSIZ*에 대한 construct는 pNB96 벡터를, 그리고 *ATHG1*과 *GSDL2*에 대한 construct는 pCSEN 벡터를 사용하여 유용 유전자를 삽입하였으며 그 모식도는 그림 97에서 제시하고 있다.

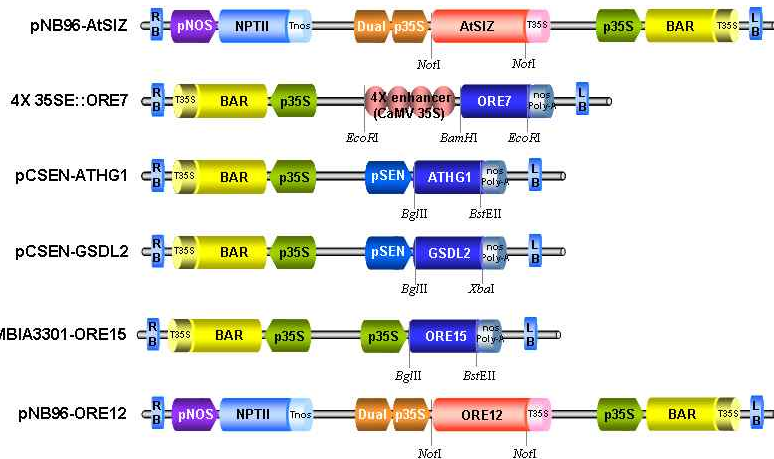


그림 97. 유채 형질전환용 벡터 construct. RB, right border; LB, left border; BAR, DL-phosphinothricin resistance gene; 35S, CaMV 35S promoter; pSEN, SEN1 promoter; T35S, terminator.

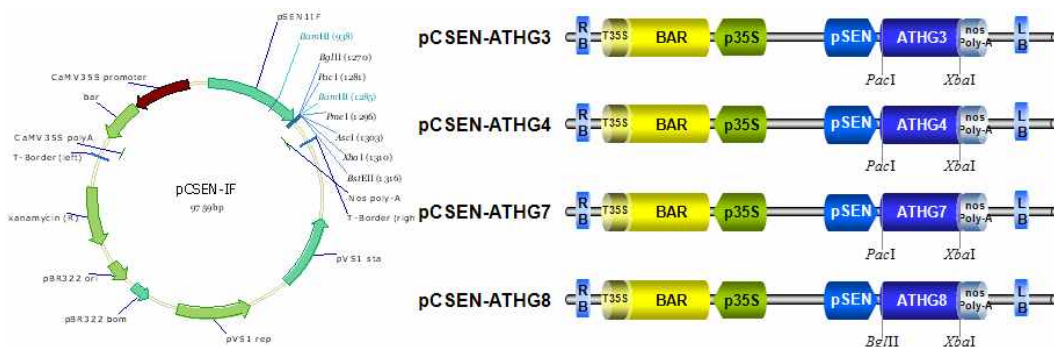


그림 98. pCSEN-IF 벡터 모식도(dhlsWHR)와 콩 형질전환용 벡터 construct. 1) pCSEN-ATPG3 벡터 construct, 2) pCSEN-ATPG4 벡터 construct, 3) pCSEN-ATPG7 벡터 construct and 4) pCSEN-ATPG8 벡터 construct. RB, right border; LB, left border; PPT, DL-phosphinothricin resistance; 35S, CaMV 35S promoter; T35S, terminator.



한편 최근 발굴된 신규 유전자인 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG8* 유전자의 경우, 콩에 서와 마찬가지로 GM 작물 개발에 있어서 특히 최소 회피 혹은 발달 단계에 대한 인위적 조절이 가능한 pCSEN 벡터에 유전자를 도입하여 형질전환용 벡터 construct를 제작하여 형질전환을 진행하고 있다(그림 98).

## 2. 유채 재분화 체계 확립

### 가. 유채 재분화 효율 개선 연구

① **형질전환 연구에 필요한 절편체 선발:** 유채의 경우 이미 선행연구를 통해 캘러스 유도, 증식 및 재분화 조건을 확립하였으나, 형질전환 연구에 적합한 절편체를 선발하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 타 작물과 비교하여 유채의 경우, 조직배양을 통한 식물체 재분화 및 형질전환 연구가 활발하게 수행되지 못하였고, 낮은 재현성과 효율로 인하여 본격적인 형질전환 식물체 생산에 어려움을 겪어 왔다. 본 연구에서는 재분화 및 형질전환 연구에 적합한 절편체를 선발하여 재분화 및 형질전환 효율을 조사하여 가장 우수한 절편체로 형질전환 연구를 수행 후, 안정적인 형질전환 식물체의 확보에 기여하고자 한다.

먼저, 유채 종자(영산과 유달 품종: 국립농업과학원 목포시험장으로부터 분양)로부터 실생묘와 배발생 캘러스를 유도하는 실험을 수행하였는데, 유달 품종의 경우, 40-60%의 저조한 발아율로 인하여 본 연구에서는 영산품종만 재분화 및 형질전환 최적화 실험에 사용하였다. 영산 품종의 종자를 발아배지(Germination medium; GEM)에 기내과종 후, 약 7-8일 경과한 실생묘의 유폐와 하배축을 절취하여 캘러스 유도배지(Callusing induction medium; CIM)에 치상하여 배발생 캘러스 발생율을 조사 및 비교한 결과, 배양 3-5주 안에 종자와 유폐에서는 15% 내외의 배발생 캘러스 형성율을 나타내었으나, 하배축 절편체에서 25%의 배발생 캘러스 형성율을 보여 주었다. 하지만 유폐에서 형성된 캘러스들은 2주정도 시간이 경과한 후, 갈변화가 30% 이상 발생하여 고사하는 현상이 관찰되었다. 세 가지 서로 다른 절편체에서 유도된 배발생 캘러스의 증식율은 서로 비슷하였으며, 유도된 배발생 캘러스(그림 99A)로부터 신초유도배지(shoot induction medium; SIM)에서 3-4주 배양 후, Fig. 2B에서처럼 신초원기들이 형성되기 시작하여 다시 2-3주 더 배양하면 그림 99C에서 보는 것처럼 자라는데 이때부터 신초증식배지(shoot elongation medium; SEM)로 옮겨 배양한다.

SEM배지에서 4-6주 배양 후에 99D의 신초가 형성되는데, 이로부터 2개월 정도 배양하면 그림 99E 단계까지 자라게 된다. 초장이 5-7cm 정도에 이르면 발근배지(rooting medium; RM)로 옮겨 발근과정을 거쳐 순화 후, 그림 99F 단계까지 자라게 된다. 배발생 캘러스를 거친 순화식물체들은 정상적으로 개화 및 결실을 보여 주었다(그림 99G-H). 하지만 배발생 유기에서부터 신초형성과 증식 그리고 발근과 순화과정을 거쳐 온실에 이르기까지 거의 6개월 이상 소요되는 단점 그리고 낮은 재분화율이 단점으로 지적되었다. 또한 하배축과 배발생캘러스로부터 신초 형성능을 비교한 결과, 하배축 절편체로부터 2배 이상의 높은 신초형성율을 보여주었다(그림 100). Table 5는 배발생 캘러스, 종자 및 하배축을 이용한 재분화 실험에 사용된 배지조성

을 요약한 표이다.

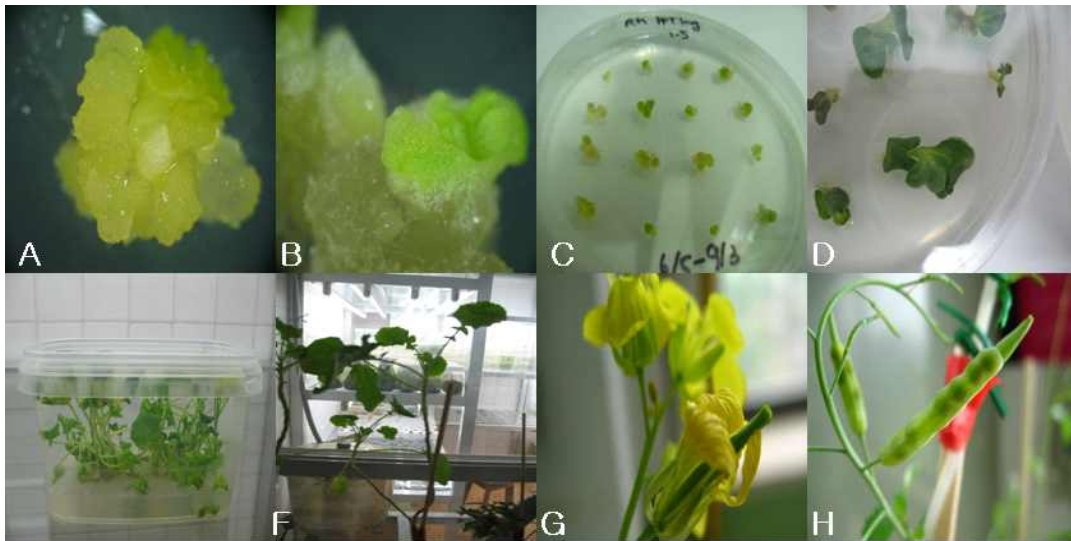


그림 99. 유채 “영산” 품종의 배발생 캘러스로부터 재분화 과정을 거쳐 유채 식물체가 생산되는 과정

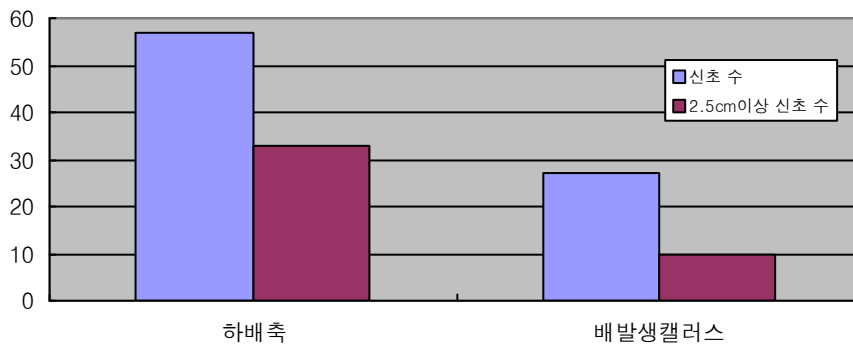


그림 100. 하배축과 배발생 캘러스 신초 형성능 비교

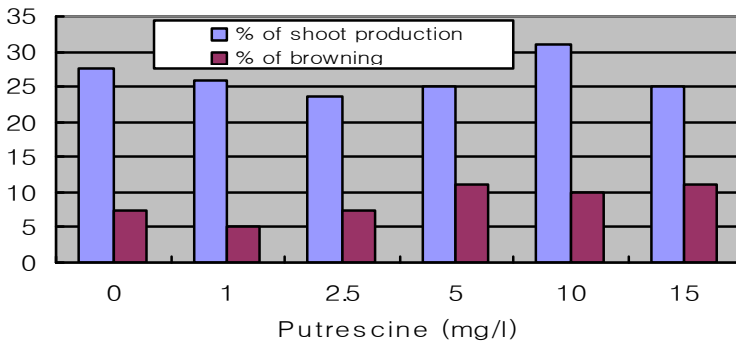
Table 5. 재분화 배지조성 요약

Medium		GEM	CIM	SIM	SEM	RM
Part I	Salts	MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS
	Vitamines	MS	B5	B5	1/2B5	1/2B5
	Sucrose (g/l)	20	30	30	10	10
	MES (mg/l), pH	500, 5.8	500, 5.8	500, 5.8	500, 5.8	500, 5.8
Part II (mg/l)	AgNO <sub>3</sub>			5		
	Zeatin			0.5		
	BAP		0.5	2		
	GA <sub>3</sub>			0.01		
	2,4-D		2			
	IBA					0.1
	Cefotaxime					
Vancomycin						
Part III	PPT					

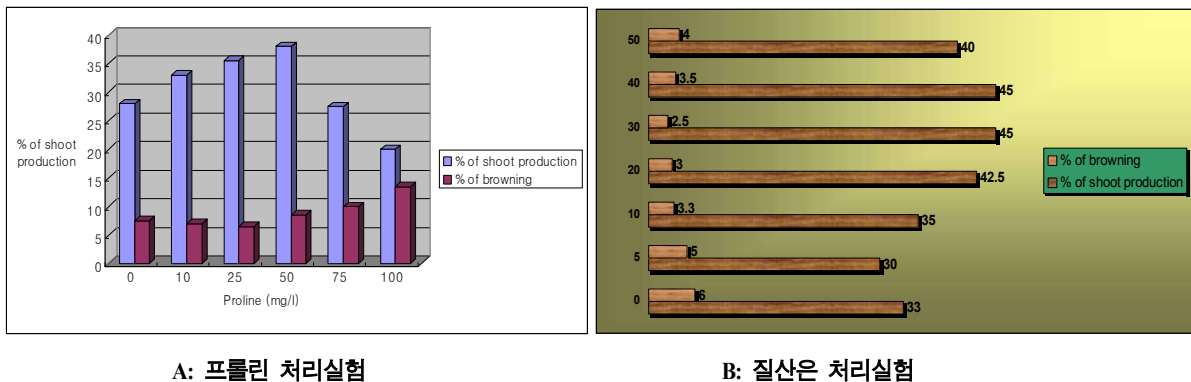
(GEM: germination medium, CIM: Callus induction medium, SIM: Shoot induction medium, SEM: Shoot elongation medium, RM: Rooting medium)

**나. 폴리아민류, 프롤린 및 질산은이 재분화 효율향상에 미치는 영향구명**

선행연구 및 1차년도 유채 식물체 재분화 관련 실험을 수행하면서 관찰된 문제점들이 크게 4가지가 있는데 첫 번째는 여전히 낮은 신초 형성율, 두 번째는 배양기간 중 배양식물체의 유리화 발생, 세 번째는 절편체에서의 갈변화 발생 그리고 마지막으로 낮은 발근율이 문제점으로 지적되었다. 본 연구에서 이러한 문제점을 해결하기 위해 적정 절편체로 선정된 하배축 절편체를 이용하여 신초형성율을 높이고 동시에 유리화를 줄이면서 발근율 향상 및 기간단축을 이루는 방법을 찾고자 하였다. 기존 배발생 캘러스로부터 일반적인 재분화 과정을 거쳐 순화식물체에 이르기까지 최소한 5개월이 소요되었으나, 종자를 발아시켜 실생묘로부터 재분화를 거치면 순화식물체까지 2-3개월로 단축되는 장점이 있다. 하지만 종자 실생묘는 대량의 재료 확보의 어려움, 형질전환 체계 확립의 어려움 및 유전적 변이로 인하여 형질전환 연구에 널리 사용되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서 종자 실생묘로부터 대량으로 절편체를 얻을 수 있고 신초형성 등 재분화 효율도 비교적 높으면서 형질전환 연구에 널리 이용되어 온 하배축 절편체를 이용하여 재분화 기간 단축 및 발근효율 향상에 관한 실험을 수행하였다. 이를 위하여 질산은, 프롤린 및 푸트레신 등의 첨가물들이 무첨가 처리구와 비교하여 신초형성율이 얼마나 증가되었는지를 조사하였는데, 폴리아민류의 일종인 푸트레신은 신초형성율 증가에 아무런 영향을 미치지 않았다(그림 101). 오히려 농도가 증가할수록 갈변율이 증가하는 현상이 관찰되었다.



**그림 101. 푸트레신이 신초형성 및 갈변율에 미치는 영향**



**A: 프롤린 처리실험**

**B: 질산은 처리실험**

**그림 102. 프롤린과 질산은이 신초형성 및 갈변율에 미치는 영향, 좌측: 프롤린 처리구, 우측: 질산은 처리구**

하지만, 프롤린 50mg/l 처리구에서는 무처리구와 비교하여 갈변율은 크게 감소하지 않았으나, 신초형성율이 20% 이상 증가하였고, 그 이상의 고농도 프롤린 처리구에서는 갈변화도 조금씩 증가하고 신초형성율도 오히려 감소하는 결과를 보여 주었다. 그러나 질산은 처리구에서는 무처리구와 비교하여 30-40 mg/L 농도에서 신초 형성율이 45%에 달하였고 반대로 갈변율은 절반 정도로 감소하는 효과를 보여 주었다(그림 102). 이러한 결과는 프롤린을 통한 스트레스 환경에 대한 저항성 증가 및 질산은에 의한 배지 및 절편체에 존재하는 에틸렌을 포함하는 노화 촉진호르몬 함량 감소 등으로 인해 신초 형성율이 증가하고 갈변율이 감소한 것으로 추측이 된다. 이러한 노화억제 및 스트레스 저항성 증가에 관여하는 물질 첨가 등을 통해 현재 유채 영산품종에서 하배축을 이용하여 재분화할 경우, 약 40-45%의 신초 형성율을 나타내어 형질전환 연구에 충분한 재분화 효율을 가지고 있다고 판단된다. 그러나 실제 재분화 및 형질전환 연구에 더욱 필요한 재분화 기간단축 및 순화 식물체 생존에 큰 영향을 미치는 발근을 향상시키기 위하여 기존 재분화 배지에서 SEM(신초증식배지)과 RM(발근배지)을 대체하는 배지를 개발하고자 하였다. 즉 하배축 절편체를 CIM(켈러스유도배지)에서 1주일간 유도 처리 후, SIM(신초유기배지)으로 옮겨 신초형성을 유도한 다음, 바로 신초증식과 발근을 유도할 수 있는 배지로 옮겨 재분화 기간단축에 기여하고자 하는 것이 목적이다. 이를 위하여 여러 호르몬을 시험하던 중 NAA 0.05 mg/L을 기존의 SEM 배지에 첨가한 결과, 발근율도 20% 이상 증가하였고, 신초형성에도 아무런 영향이 없었다. 또한 갈변화 또는 유리화 현상도 현저히 줄어드는 결과를 보여 주었다. 현재 하배축 유래 재분화 식물체는 모두 SPM(shoot proliferation medium)배지로 옮겨 증식 중이다(그림 103).

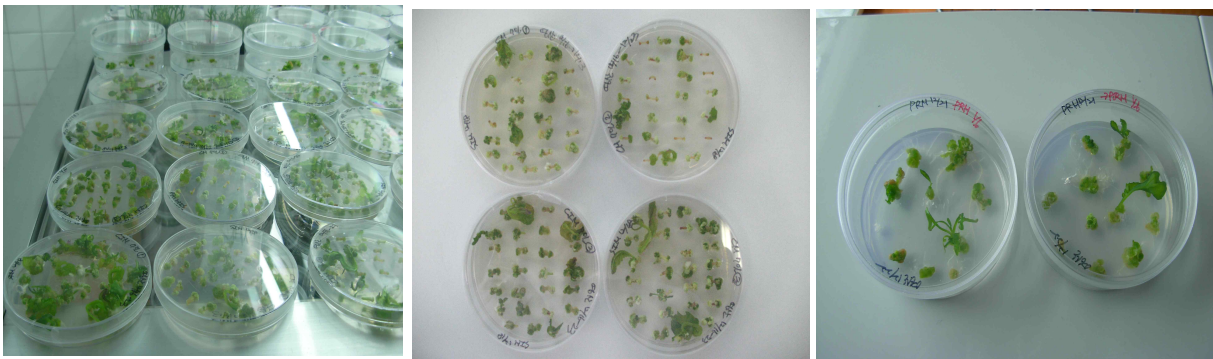


그림 103. 하배축 유래 재분화체 신초형성 및 증식과정

바이오디젤 개발의 주요한 형질인 생산성 증대 목적의 형질전환 유채 식물체의 대량 생산을 위하여 고효율의 재분화 체계 확립은 필수적이다. 1차년도 연구결과에서 배발생 켈러스, 하배축 및 종자 등의 절편체 중 하배축을 이용한 재분화 체계가 가장 형질전환 유채 생산에 효과적으로 이용될 절편체라는 결론을 얻었다. 하배축 이용 재분화 실험에서 질산은( $AgNO_3$ ) 30 mg/L 처리 시 약 45%의 신초 형성율을 기록하였고, 프롤린은 50mg/L 농도에서 약 35%를 약간 초과하는 신초 형성율을 나타내었다. 2차년도에서는 프롤린과 질산은의 각각 처리 또는 혼합 처리 시 신초 형성율과 갈변율에 미치는 영향을 조사한 결과, Table 6에서 나타나듯이 단독처

리구와 비교하여 유의성 있는 증가를 보이지 않았다. 따라서 하배축을 절편체로 한 재분화 체계에서 약 35-45%의 신초 형성율이 현 단계에서 획득한 최고 수율이라고 할 수 있다. 그림 104A는 하배축 절편체로부터 신초가 형성되는 과정이다.

Table 6. 질산은 및 프롤린의 단독 및 혼합처리가 유체 식물체 재분화 효율에 미치는 영향

	# of green spots / 50 explants	# of shoots / 10 green pots	# of shoots / 50 explants (%)	% of browning of explants
Control	22	3.4	13.7±2.1 (27.4)	6
AgNO <sub>3</sub> 30mg/l	24	3.8	17.5±2.3 (35.0)	4.5
Proline 50mg/l	21	3.8	18.2±3.1 (36.4)	5
Ag 30 + P 50	26.5	3.8	19.2±2.5 (38.4)	4

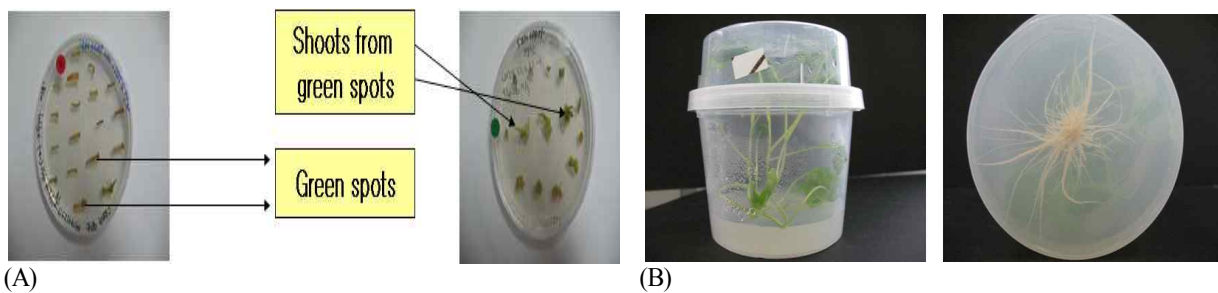


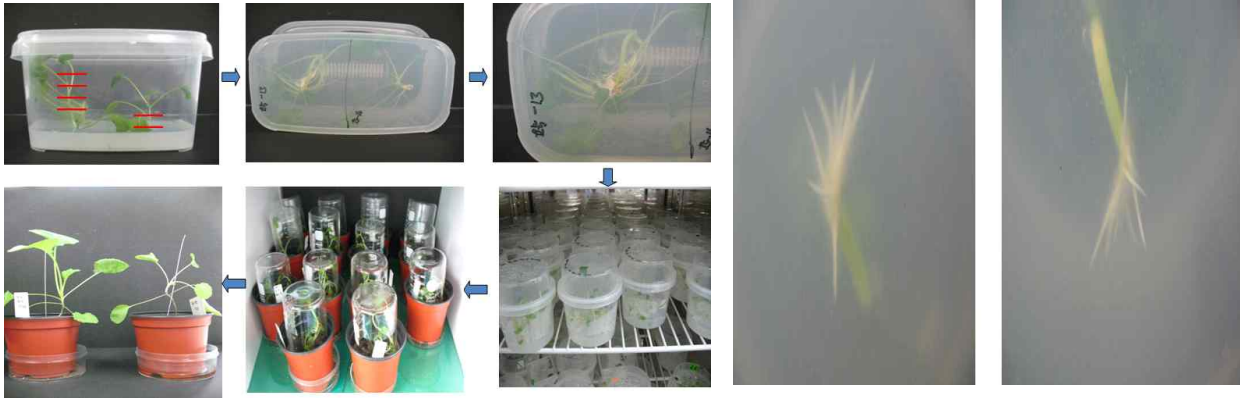
그림 104. 유체 재분화 모습 (유체 ‘영산’ 품종; A: 하배축 절편체에서 green spot과 green spot으로부터 신초가 형성되는 과정, B: SPM (신초증식배지) 도입에 의한 식물체 증식 및 발근)

#### 다. 배지조성 변경을 통한 재분화 효율 향상 및 재분화 소요기간 단축

① SPM (신초증식배지) 도입을 통한 재분화 기간 단축: 기존의 유체 재분화 과정은 4단계(캘러스 유도 - 신초형성 - 신초증식 - 발근)를 거쳐 절편체로부터 발근개체를 획득하기까지 약 15-16주의 기간이 소요되는데 기존의 신초증식배지에 NAA 0.5mg/L을 첨가한 결과, 신초 증식 중 발근도 동시에 발생하여 발근 식물체 획득기간을 기존대비 2-3주 정도 단축하였고, 발근율도 약 15-20%정도 향상되는 결과를 보였다. 그림 104B에 나타나듯이 이러한 SPM(신초증식배지에 NAA 0.5mg/l첨가)배지의 도입으로 인해 지상부 생육과 지하부 발근 모두 우수함을 보여주고 있다. 참고로 기존 재분화 시스템에서는 발근율이 45-50%였는데 SPM 배지 사용 시 70%까지 발근율이 향상되었다. 이러한 SPM 배지 도입으로 인하여 하배축 절편체로부터 순화단계의 식물체 상태에 이르기까지 약 11-12주 소요되는 결과를 얻었는데, 이러한 결과는 최근 10년간 발표된 유체 재분화 관련 논문에서 제시하는 결과들인 발근단계까지 대부분 8-12주정도 소요되는 걸 감안하면 상당히 우수한 결과라고 할 수 있다.

② 마디배양을 통한 대량증식 체계 확립: 상기 실험에서 SPM 배지 도입을 통해 재분화 기간 단축과 발근율 향상을 이루어 냈지만, 좀 더 효과적인 유체 식물체 증식 방법을 찾던 중 하배축에서 재분화 된 유체 식물체의 줄기에서 잎이 달려 있는 마디부분을 절취하여 발근검용 재분화 배지에 치상한 결과, 일정 비율로 뿌리가 형성되어 순화과정까지 이를 수 있다는 것을 발

견하였다. 일단 하배축을 이용하여 초장 3-6cm 정도의 기내 식물체가 발생하면 SEM 배지 상태에서 각 마디를 잘라 RPM 배지 등으로 옮겨주면 3주정도 지나 발근이 조금씩 시작되어 5-6주가 경과하면 상당 수 개체에서 발근과정이 이루어진다. 이 상태에서 약 4주가 지나면 소형 화분으로 순화를 할 수 있는 상태가 되고 다시 2주정도 순화 시킨 후, 온실로 옮기면 완전한 활착이 이루어진다.



A

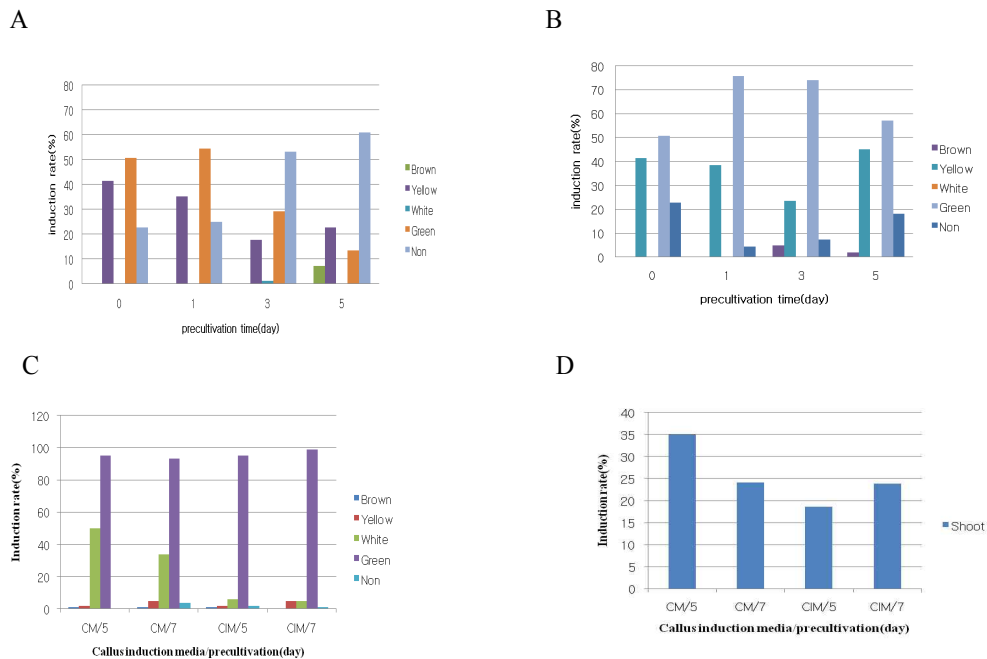
B

**그림 105. 마디배양 과정** (유채 ‘영산’ 품종; A: 유채 식물체의 마디를 잘라 배양하여 발근과정을 거친 후, 순화과정까지의 모습, B: 마디배양을 통한 발근 비교모습; 좌 - 일반 식물체, 우 - 형질전환체)

그림 105A에 마디배양을 통하여 식물체가 순화과정을 거쳐 활착된 식물체로 되는 과정이 잘 나타나 있는데, 일반 기내 배양묘 뿐만 아니라 형질전환 유채에서도 그림 105B의 우측에 나타나듯이 발근과정이 이루어짐을 관찰하였다. 하지만 일반 기내 배양묘와 비교하여 발근 및 순화과정까지의 기간이 2-3주정도 더 소요되고 그 효율도 낮았다. 20개체씩 5반복으로 실험한 결과, 평균 발근율은 약 65-70%정도이고, 10-15%의 개체는 지상부에서 황화현상이 발생하였다. 결론적으로 20개체의 마디 배양개체에서 약 60%정도는 순화과정을 거쳐 온실까지 이식이 가능한 식물체를 생산하는 것으로 관찰되었다.

#### 라. 액체배지 도입을 통한 식물체 재분화 효율 향상

본 연구에 사용된 하배축 이용 재분화 시스템은 우선 하배축에서 배발생 켈러스를 유도하여 신초 형성과정을 거쳐 재분화 식물체를 생산하는 체계인데, 첫 번째 단계인 배발생 켈러스 유도에 고체, 액체배지 그리고 각 배지별 전처리 효과 등을 통해 배발생 켈러스의 유도율이 향상 되는지 알아보았다.



**그림 106. 배지 종류 및 전처리를 통한 하배측으로부터 배발생 캘러스 형성을 및 싹 형성율에 미치는 효과 (A: 고체 배지에서 전처리 효과, B: 액체배지에서 전처리 효과, C: 캘러스 유도배지 종류에 따른 배발생 캘러스 발생효율 차이, D: 캘러스 유도배지 종류에 따른 싹 형성율 차이)**

그림 106A에서 보듯이 고체배지에서 하배측 절편체 배양 시 전처리 배지에서 1일정도 배양하면 무처리구와 대비하여 50%정도의 배발생 캘러스 형성을 획득할 수 있고, 액체배지에서 전처리 배양을 추가하여 역시 1일간 배양하면 고체배지에서 무처리구 대비 우수한 배발생 캘러스 형성을 보였던 전처리 배양기간 1일보다 더 향상된 75%의 배발생 캘러스 형성이 관찰되었다(그림 106B). 이 두 실험에서 배발생 캘러스 유도배지로 CIM배지(MS기본배지, B5비타민, sucrose 30g/L, MES 500 mg/L, 질산은 5mg/L, Zeatin 0.5 mg/L, BA 2 mg/L, 2,4-D 0.01 mg/L, pH 5.8)를 사용하였는데 이 배지를 변경한 CM 배지(MS기본배지, B5비타민, sucrose 30g/L, casein hydrolysate 100 mg/L, MES 500 mg/L, 2,4-D 2 mg/L, BA 1 mg/L, pH 5.8)와 배발생 캘러스 및 싹 형성율을 비교하였다. 전처리 배양기간 1일을 거친 후, CM과 CIM 배지에서 하배측을 배양한 결과, 배발생 캘러스 발생율이 그림 106C에서 보듯이 85-90%로 향상되었다. 그러나 두 배지간 그리고 CM 배지와 CIM 배지에서의 배양기간인 5일과 7일간에 유의성 있는 차이는 발견되지 않았다. 다시 그림 106D의 실험에서 보듯이 이 두 CM 배지와 CIM 배지에서 위에서와 같이 5일과 7일 배양한 후, SIM 배지로 옮겨준 결과, CM 배지에서 5일간 배양 후 SIM 배지로 옮겨 주었을 때 35% 이상의 재분화 효율을 보여 주었다.

재분화 실험을 요약하면 2차년도 연구결과에서 나온 조건들을 이용하면 하배측으로부터 배발생 캘러스는 약 85-90% 효율로 형성되어 이 배발생 캘러스로부터 35-45%의 재분화 효율을 얻는 것으로 나타났고, 이러한 과정을 거쳐 나타난 유체 싹 배양묘들은 SIM 배지로 옮겨 싹 형성 및 증식을 거친 후, 다시 싹증식 및 발근과정이 동시에 일어나는 SPM 배지에서 배양과정을 거치면 11-12주 후에 순화과정까지 이르게 된다.

#### 마. 적정 LED 광원조사가 유채 식물체 생육에 미치는 영향

최근 다양한 작물재배에 있어서 LED (Light-Emitting Diode; LED)광원이 널리 사용되고 있는데, 본 실험에서도 청색과 적색파장의 LED광원을 조사하여 일반 조식배양을 통해 생산된 유묘와 형질전환을 통해 생산된 유채 유묘생장에 어떤 영향을 알아보는지 검토하였다.

이를 위하여 적색광(660 nm), 청색광(470 nm), 암조건 그리고 대조군으로써 형광등(512nm)을 사용하였고, 광조건은 모든 광원에서 동일하게 명주기 16시간/ 암주기 8시간으로 설정하였다. 광도는 대략적으로 2,500-2,800 lux로 통일하고 온도는 25±1℃에 4주간 배양하였다. 종자를 표면 살균하여, GEM 배지에 치상한 후, 4주 후 유묘 개체를 기외로 꺼내 디지털 버니어캘리퍼스 (Mitutoyo Corp, Japan)를 사용하여 초장을 측정하였고, 생체중과 건물중은 저울을 이용하여 측정하였다. 건물중은 건조기를 45℃에 맞추고 6시간 건조처리를 한 후, 측정하였다.

그림 107에 나타나듯이 형광등에서 자란 유채 유묘상태와 적색광에서 자란 유묘는 비교적 큰 차이가 없었으나, 청색광에서 자란 유묘는 잎 발생도 더 많고, 건실한 생장을 보여 주었다.



그림 107. LED광원에 따른 유채 식물체 생육차이 (A: 일반 형광등 하에서 생육패턴, B: 적색 LED광원 하에서의 생육패턴, C: 청색 LED 광원 하에서의 생육패턴, D: 암배양 조건에서의 생육패턴)

지상부와 지하부 생육으로 나누어 관찰한 경우에도 그림 108에 나타나듯이, 청색광에서 좀 더 좋은 결과를 보여 주었다. 지하부 생육에 있어서도 대조구와 비교하여 적색광과 청색광 LED 광원 모두에서 우수한 생육을 보여 주었다. 그림 109는 상기 과정처럼 기내파종을 거쳐 나온 유묘들을 꺼내 건조시킨 후, 육안으로 비교한 사진인데 청색광에서 좀 더 많은 신초와 엽수를 관찰할 수 있었다. 이러한 유채 유묘들의 생육에서도 차이가 날 뿐만 아니라, 하배축에서 캘러스를 유도하는 과정에서도 대조구나 적색광 조건에 비해 청색광에서 재분화가 가능한 녹색의 배발생 캘러스 유도가 좀 더 효율적으로 되는 것을 관찰하였다(그림 110).



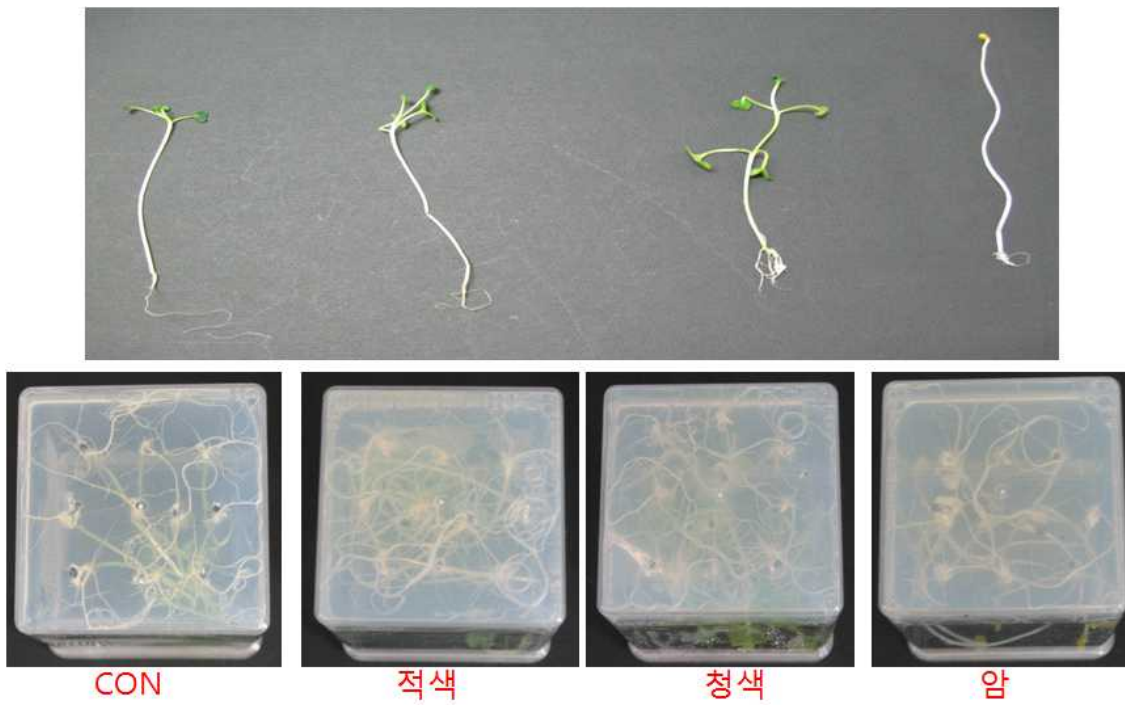


그림 109 . LED광원 차이에 따른 유채 식물체 생육차이 (위: 지상부 생육, 아래 지하부 생육)

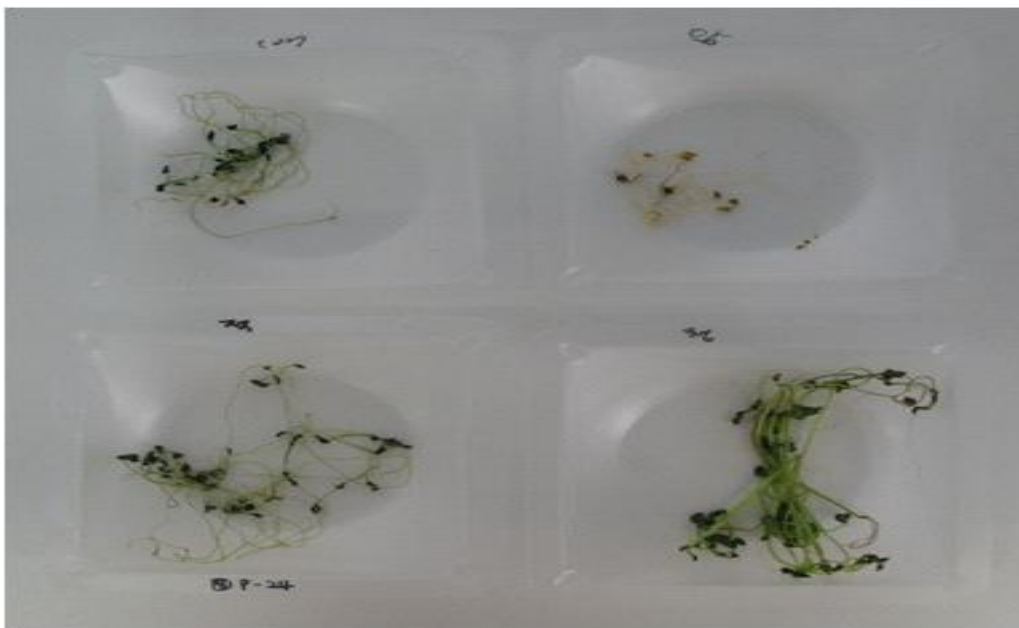


그림 110. LED광원 차이에 따른 유채 식물체의 생체중 차이 (상부 좌측: 대조구, 상부우측: 암조건, 하부 좌측: 적색광, 하부 우측: 청색광)

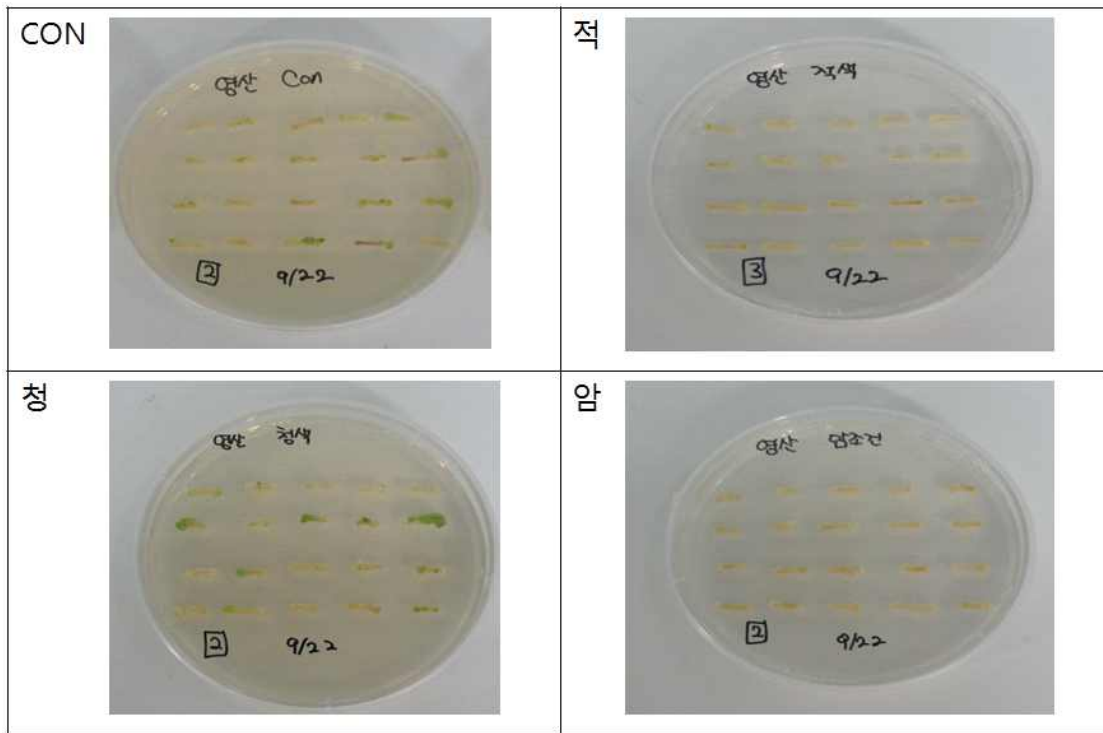


그림 111. LED광원 차이에 따른 유채 식물체에서의 켈러스 및 신초발생 효과

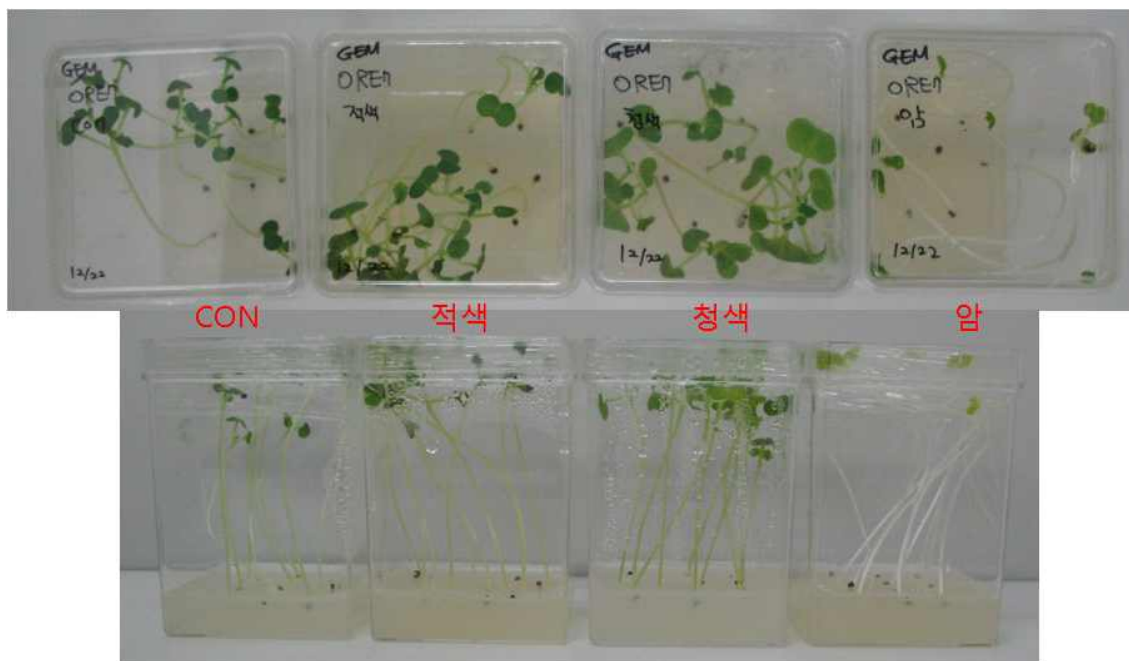


그림 112. LED광원 차이에 따른 형질전환 유채 식물체에서의 생육차이

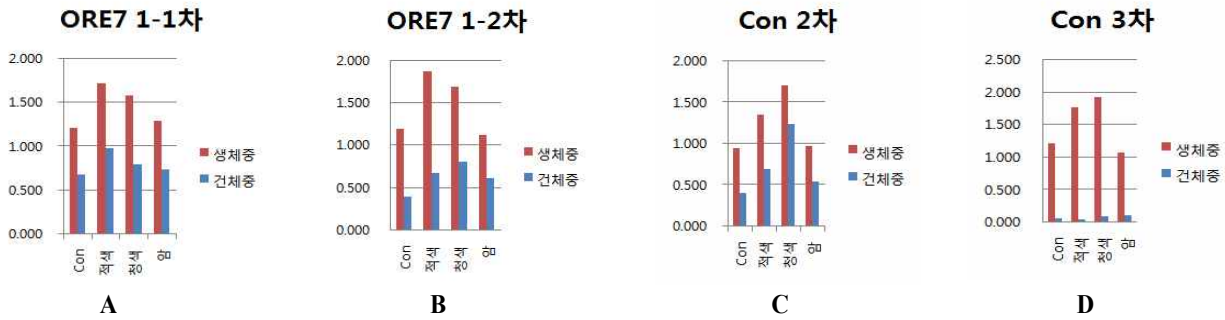


그림 113. LED광원 차이에 따른 형질전환 유채 식물체에서의 생체중과 건물중 차이비교 (A와 B: ORE7 형질전환 유채 유묘, C와D는 일반 기내파종을 통해 생산된 유채 유묘)

기내파종을 통해 나온 조직배양 유채 유채유묘 뿐만 아니라 형질전환을 거쳐 생산된 유채 유묘들의 성장에도 LED광원 효과가 있는지 실험하였는데, 그림 113에 나타난 것처럼 형질전환 개체들은 일반 기내파종에서 나온 유묘들과 다르게 적색광 조건 하에서 생체중과 건물중 모두 높은 경향을 보여 주었다. 반면 일반 기내 유채 유묘들은 청색광에서 우수한 생체중과 건물중이 관찰되었는데, 이러한 차이가 형질전환이라는 스트레스 조건 하에서 생육양상에 있어서 다르게 반응이 나타난 건지에 대한 추가 실험이 필요하며, LED 광원의 조사를 통하여 기존의 조직배양 및 형질전환 체계를 통해 생산된 유채 식물체의 보다 건실한 성장과 발육에 기여하리라 기대하고 있다.

### 3. 유채 형질전환 체계 확립

#### 가. 표준벡터(pCAMBIA3301)를 이용한 유채 형질전환 체계 확립

본 연구팀은 선행연구에서 유채 종자에서 유도된 배발생 캘러스를 절편체로 이용하여 Bar 유전자와 리포터 유전자로 GUS를 포함하는 pCAMBIA3301 벡터를 형질전환 조건 확립을 위한 표준벡터로 이용한 아그로박테리움 및 유전자총 형질전환을 시도하여 형질전환 유채 식물체 생산체계를 에 관한 기본 과정을 확립하였다. 이 형질전환 과정에 사용된 선발배지에 대한 요약이 Table 3에 나와 있다. 아그로박테리움과 유전자총 이 두 가지 방법을 이용하여 형질전환 기초실험을 하여 GUS 유전자가 발현되는 모습을 관찰하였고(그림 114), 종자에 유전자총과 아그로박테리움을 이용하여 형질전환 유채 소식물체 단계까지 생산하는데 성공하였다(그림 115).

선행연구에서 배발생 캘러스를 절편체로 하여 형질전환 체계를 확립하려고 했으나, 배발생 캘러스의 형질전환 효율도 0.5% 미만으로 매우 낮고, 형질전환이 된다 하더라도 재분화 과정이 하배축이나 실생묘를 형질전환 재료로 이용하는 것과 비교하여 6-8주 이상 추가로 소요되는 단점이 발견되어 형질전환 체계 확립 실험에 하배축과 실생묘를 절편체로 이용하였다. Table 7에 나타난 것처럼 아그로박테리움을 이용한 경우, 종자실생묘는 2배 이상 형질전환 효율이 높았고, 하배축의 경우도 유전자총과 비교하여 40% 이상 높은 결과를 보여 주었다. 종자실생묘와 하배축 등 절편체 종류에 따른 형질전환 효율은 아그로박테리움에서는 큰 차이가 없었으나,

유전자총을 이용한 형질전환에서는 하배축을 이용한 경우가 우수한 결과를 보여 주었다.

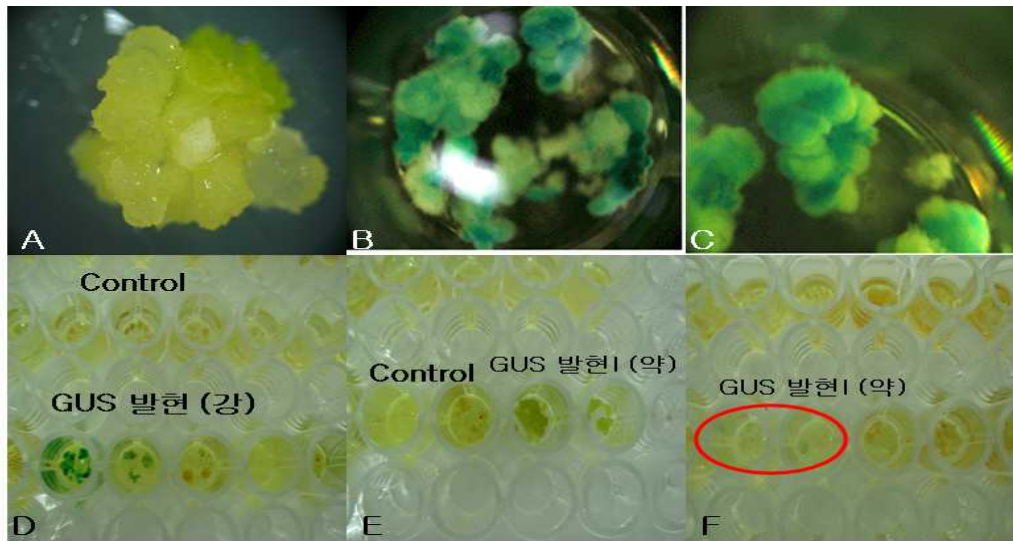


그림 114. 배발생캘러스를 이용한 아그로박테리움과 유전자총 형질전환 (유체 ‘영산’). A: 배발생캘러스 B-C: 배발생캘러스의 진한 GUS발현 (아그로박테리움), D-F: 다양한 GUS발현 (유전자총 이용 형질전환)

Table 7. 형질전환 과정에 사용된 선발배지조성 요약

	Medium	GEM	1차 선발 SIM	2차 선발SIM	SEM	RM
Part I	Salts	MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS
	Vitamines	MS	B5	B5	1/2B5	1/2B5
	Sucrose (g/l)	20	30	30	10	10
	MES (mg/l), pH	500, 5.8	500, 5.8	500, 5.8	500, 5.8	500, 5.8
Part II (mg/l)	AgNO <sub>3</sub>			5		
	Zeatin			0.5		
	BAP		0.5	2		
	GA <sub>3</sub>			0.01		
	2,4-D		2			
	IBA					0.1
Part III	Cefotaxime*	200	200	200	200	100
	PPT (mg/l)	10	10	5	5	5



A(유전자총 형질전환)

B(형질전환체 선발)

C(아그로박테리움)

그림 115. 종자 절편체로부터 형질전환 유체 식물체 생산

Table 8. 유전자총과 아그로박테리움 형질전환에 있어서 종자와 절편체의 선발 및 형질전환 효율 차이

형질전환 방법	Explant Type	# Of PPT저항성 개체 / Inoculated explant (B)	# of putative transgenic explants with shoots (A) 2.5cm 이상 신초	Transformation efficiency (A/B: %)
유전자총	종자	53 / 557 (9.5%)	8	1.4
	하배축	67 / 650 (10.3%)	13	2.0
아그로박테리움	종자	72 / 495 (14.5%)	16	3.2
	하배축	92 / 621 (14.8%)	18	2.9

다만 종자실생묘를 절편체로 사용하여 형질전환 실험을 수행한 경우, 형질전환 효율 자체는 크게 차이가 나지 않고 오히려 재분화 기간이 단축되고 실험과정도 간편한 장점도 있기는 하나, 하배축 절편체와 비교하여 escape 발생비율이 3배정도 높은 것이 단점으로 발견되었다. 반면 하배축을 이용한 경우, 형질전환 효율은 높지 않으나, escape 발생율이 10% 미만이고, multiple 신초군 형성 및 대량의 절편체 확보가 가능한 점 그리고 재분화 기간도 비교적 단기간이라는 점들이 하배축이 절편체로서 유용하다는 것을 보여 준다고 할 수 있다. 표준벡터, pCAMBIA3301을 이용하여 유전자총과 아그로박테리움 그리고 종자와 하배축 이 2가지 절편체의 차이를 비교한 결과가 Table 8에 나와 있는데, 유전자총과 아그로박테리움 비교에서는 아그로박테리움이 보다 높은 효율을 보여 주었고, 형질전환 실험용 절편체로서 종자와 하배축의 비교에서는 유전자총을 이용한 형질전환 실험에선 하배축이 우수하였으나, 아그로박테리움 이용 형질전환에서는 종자와 하배축이 비슷한 효율을 보여 주었다. 상기 표준벡터를 이용하여 아래와 같이 아그로박테리움과 유전자총에 있어서 기본적인 조건을 확립하였다.

☞ 유채 형질전환 식물체 생산조건 확립 (아그로박테리움)

- 절편체: 하배축과 종자실생묘 모두 유사함
- 박테리아 배양기간: 36시간 (O.D<sub>600nm</sub> = 0.4-0.6), 접종시간은 20분,
- 접종농도 (박테리아 pellet 5ml + 액체 MS배지 25ml 희석)
- 접종방법 (침봉, 유리구슬, 원심분리 및 일반 무처리구 간 효율차이 없음)
- 공동배양기간 : 4일과 5일 (28℃에서 암배양)
- Acetosyringone 20mg/L농도가 효과적임.
- 수세과정 (1차와 2차로 나누며, 1차는 액체 MS배지에 cefotaxime 300mg/L에서 2시간, 2차 수세는 동일배지에 cefotaxime을 150mg/L 농도로 감소시켜 3시간 수세함)

☞ 유채 형질전환 식물체 생산조건 확립 (아그로박테리움)

- 절편체: 하배축이 가장 우수함.
- Gold입자 크기 : 1.0µm와 1.6µm
- 목표물과의 거리 : 6cm
- 압력: 1,100 psi와 1350psi 비슷함.
- 발사횟수: 2회 발사가 유전자 형질전환에 효율적이거나, 물리적 피해를 고려해야 함.
- 삼투압 조절제 처리: Mannitol과 Sorbitol 각각 0.2M 첨가한 배지에서 유전자총 형질

- 전환 실험 수행하기 전 3-5일정도 배양 후, 형질전환이 효과적임.  
 - DNA코팅 시 농도: 유의성 있는 차이가 발견되지 않음.

**나. 유채 형질전환 식물체 선발조건 확립 (아그로박테리움)**

일반적인 작물형질전환 시 형질전환 실험 후, 바로 선발배지로 옮겨지는 경우가 많은데, 본 연구에서 선발약제가 포함되어 있지 않은 일반 배지에 형질전환 시킨 식물체를 1주, 2주 및 4주간 배양 후, 선발약제 PPT(Phosphinotricin 5mg/L)가 들어간 배지로 옮겨 선발하는 방법이 형질전환 식물체 생존과 효율 향상에 효과적인지 알아보았다. Table 9에 나와 있듯이, 형질전환 후 바로 선발배지로 옮긴 개체들은 9주 후, 4%정도의 생존율 및 저항성을 보여 주었는데 4주간 PPT가 없는 일반 배지에서 배양한 후, 선발 배지로 옮긴 개체들은 9주 후에 아그로박테리움의 경우 26%, 유전자총의 경우도 20%정도의 개체가 생존해 있었다. 다시 8주간의 선발과정 후에는 아그로박테리움과 유전자총 모두 4-5% 내외의 개체들만 생존해 있었지만 형질전환 직후, 바로 선발배지로 옮긴 개체들은 추가로 8주간의 선발을 시행한 경우, 오직 0.5%만이 생존하여 형질전환체로 선발되었다. 이를 통하여 형질전환 후, 바로 선발배지로 옮기는 것보다는 선발약제인 PPT가 들어있지 않은 일반 배지에 4주간 배양 후, 옮겨 주는 것이 더 효과적이란 결과를 보여 주었다. 또한 순화온실로 옮기기 직전 PPT 5mg/L의 농도조건 하에서 선발하는 것보다는 강한 선발이라고 할 수 있는 PPT 20mg/L가 첨가된 선발배지에서 4-6주간 배양을 거쳐 순화 식물체를 생산하게 되면 escape 빈도도 줄일 수 있는 선발방법이라고 생각된다. 이러한 선발과정을 거친 형질전환식물체들은 본격적인 외부환경에 노출되기 전 그림 116에서처럼 순화과정을 거친 후, 그림 117에서 보는 식물체로 생육하게 된다.

Table 9. 유전자총과 아그로박테리움 형질전환에 있어서 선발 및 형질전환 효율 차이

선발방법	형질전환 방법	# of PPT저항성 개체 / 100 종자 (B) (3주 후)	# of PPT저항성 개체 / 100 종자 (B) (6주 후)	# of PPT 저항성 개체 (9주 후)
<b>Control</b> [형질전환 후 바로 선발배지로 이동]	아그로	19	14	4
	유전자총	13	6	4
<b>1주</b> [1주 후 선발배지로 이동]	아그로	21	16	11
	유전자총	14	9	5
<b>2주</b>	아그로	25	17	12
	유전자총	21	16	10
<b>4주</b>	아그로	56	35	26
	유전자총	31	24	20



ORE 7	pCAMBIA3301	AtSIZ
-------	-------------	-------

그림 116. 각 유전자별 형질전환 유체 식물체 순화과정

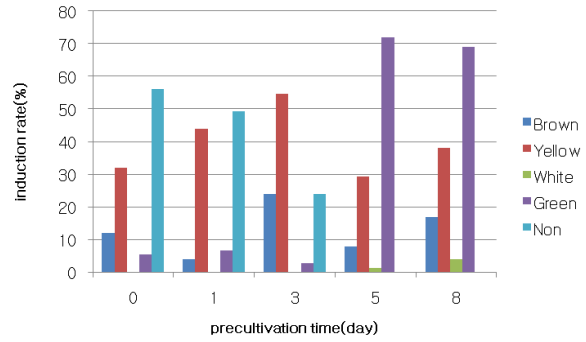
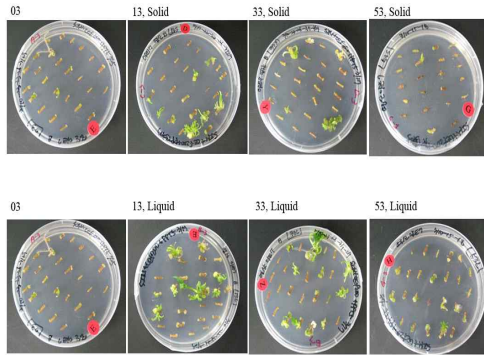


ORE 7	pCAMBIA3301	AtSIZ
-------	-------------	-------

그림 117. 각 유전자별 형질전환 유체 식물체

#### 다. 고효율의 유체 형질전환 체계 확립

① 전처리 배양을 통한 아그로박테리움 이용 형질전환 유체 식물체 생산: 재분화 연구에서 얻어진 배발생 캘러스 및 신초형성율은 달리 형질전환 실험에서는 다소 낮은 재분화 효율이 문제시 되어왔다. 따라서 아그로박테리움 형질전환 전에 전처리 배양기간을 달리하여 이러한 기간의 차이가 배발생 캘러스 및 신초 형성율에 미치는 영향을 알아보았다. 그림 118에 나타나듯이 액체배지가 고체배지보다 더 낮은 신초 형성 패턴을 보여 주었고, 0, 1, 3 그리고 5일간의 배양기간에서는 1일과 3일에서 좋은 신초 형성율을 보여 주었다. 그러나 배양기간을 좀 더 늘린 결과, 8일차에서 높은 배발생 캘러스 형성율을 나타내어 추가 실험을 진행하였다. 그 결과, Table 10에 보듯이 전 처리 배양을 8일간 수행한 결과, 32%의 높은 신초 형성율을 나타내었다. 이러한 과정개선을 통한 일반적인 아그로박테리움 과정은 그림 119에 나타나 있다.



A: 액체배지와 고체배지의 신태형성 패턴

B: 전처리 배양기간에 따른 배발생캘러스 유도

그림 118. 배지 종류 및 전처리 배양기간 차이에 따른 배발생 캘러스 형성을 및 신태 형성에 미치는 효과

Table 10. 배양기간 차이에 따른 형질전환 유체 식물체의 재분화 효율 비교

pre-culture	Total	Shoot	Regeneration efficiency(%)
0	75	0	0
1	75	0	0
3	75	1	1.4
5	75	10	13.4
8	100	32	32

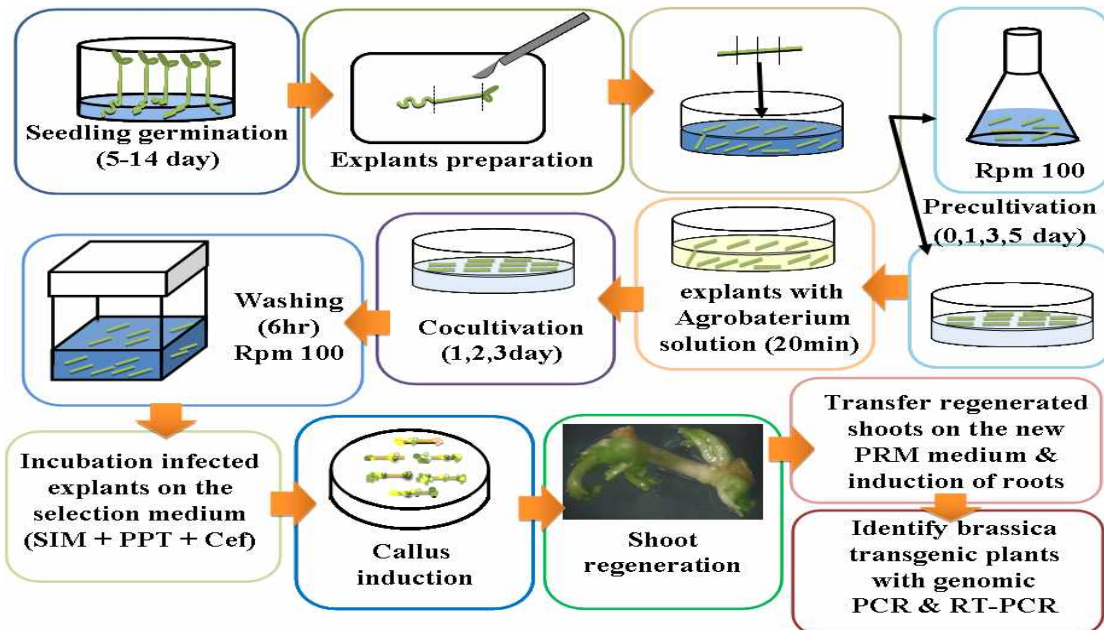


그림 119. 본 연구에 사용된 하배축 이용 아그로박테리움 형질전환 과정



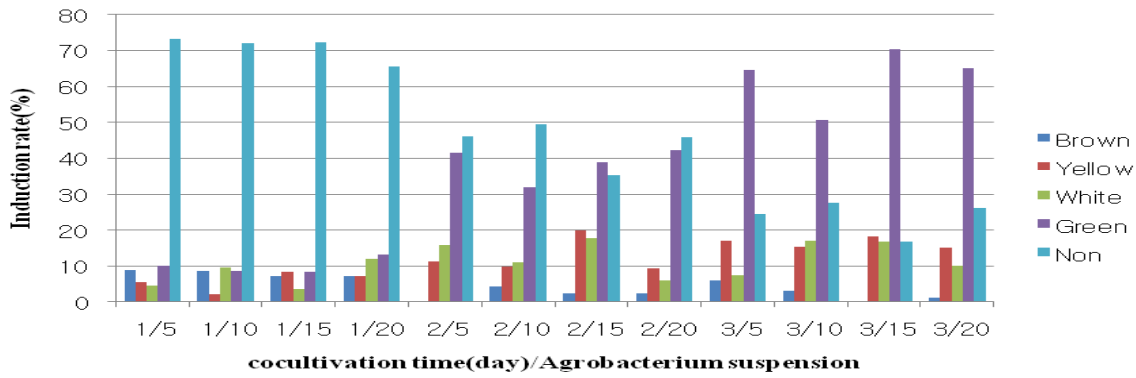


그림 120. 공동배양 기간 및 아그로박테리움 배양액 농도에 따른 배발생 캘러스 형성을 차이

② 아그로박테리움 조건 확립을 통한 유채 형질전환 식물체 생산: 1차년도에서는 종자를 절편체로 이용할 경우의 아그로박테리움 형질전환 조건을 확립하였는데, 하배축 절편체를 이용한 아그로박테리움 형질전환 역시 조건 확립이 요구되는 실정이다. 따라서 2차년도에서 조건 확립 실험을 수행한 결과, 그림 120에 나타나듯이 공동배양기간 3일에 아그로박테리움 배양액 15 ml에 첨가하여 접종할 때 약 70%의 배발생 캘러스 형성을 보여 주었다. 이렇게 확립된 아그로박테리움 형질전환 체계를 바탕으로 다음 형질전환 실험을 수행 하였다. 유전자 총의 경우는 종자를 절편체로 이용하는 경우와 형질전환 조건에 있어서 차이를 보이지 않아서 기존 유전자 총 형질전환 조건을 이용하였다.

③ 유전자 및 형질전환 방법별 형질전환 효율비교 (종자 절편체 이용): 우선 유전자별로 형질전환 차이가 발생하는 지 여부를 실험한 결과, 기존의 *ORE7* 유전자는 유전자총 이용 시 3.5-4%의 형질전환 효율을 나타내는데, Table 11에 나타나듯이 *GSDL1(ATHG1)*과 *ORE12*는 다소 낮은 1.5-1.7%의 효율을 나타냈으나, *AtSIZ*는 5.5%의 비교적 높은 효율을 보여 주었다. 형질전환 방법끼리의 비교에서는 아그로박테리움이 전반적으로 높은 형질전환 효율을 보여 주었다 (Table 12 참조). *AtSIZ* 유전자가 들어간 벡터는 유전자총과 아그로박테리움 모두에서 가장 좋은 효율을 보여 주었다. 또한 그림 121에서처럼 각 유전자별로 생산된 형질전환 식물체들은 1회용 페트리디쉬 내에서의 초기 신초 발생 및 생육이 다소 부진하였으나, 일단 순화되고 나면 대조구와 비교하여 비슷한 생육패턴을 보여 주었다.

Table 11. 유전자 종류에 따른 유채에서의 형질전환 효율 비교 (영산 품종 사용 시)

Gene	No. of bombarded seeds	No. of survived plants	Transformation efficiency(%)
<i>GSDL1</i>	961	17	1.7
<i>ORE12</i>	955	15	1.5
<i>AtSIZ</i>	822	46	5.5

Table 12. 유전자 종류 및 형질전환 방법에 따른 형질전환 효율 비교

유전자총 효율				아그로박테리움 효율			
Gene	No. of bombarded seeds	No. of survived plants	Transformation efficiency(%)	Gene	No. of infected seeds	No. of survived plants	Transformation efficiency(%)
GSD L1	961	17	1.7	GSDL 1	855	22	2.6
ORE 12	955	15	1.5	ORE1 2	871	23	2.6
AtSI Z	822	46	5.5	AtSIZ	839	53	6.3

#### 4. 유채 형질전환 식물체 생산 현황 및 PCR과 RT-PCR을 이용한 도입유전자 검정

##### 가. 1차년도 형질전환 유채 식물체 생산 현황

본 연구팀에서 1차년도 연구기간동안 각 유전자별로 유전자총과 아그로박테리움을 이용하여 형질전환 유채 식물체를 생산하였는데 Table 13에 나타나듯이 종자실생묘를 이용한 형질전환 실험에서는 *ORE 7* 유전자가 도입된 식물체는 14개체, *AtSIZ* 유전자가 도입된 식물체는 8개체, pCAMBIA3301 벡터가 도입된 식물체는 6개체를 생산하였고, 하배축을 절편체로 이용한 형질전환 실험에서 *ORE7* 유전자가 도입된 식물체는 10개체 그리고 *AtSIZ* 유전자가 도입된 식물체는 모두 8개체였다(Table 14). 따라서 두 절편체 모두를 종합하면 *ORE7* 유전자가 도입된 유채 형질전환식물체는 24개체, *AtSIZ* 유전자가 도입된 식물체는 모두 16개체, 선행연구에 사용되었던 pCAMBIA3301 벡터가 도입된 식물체는 6개체 그리고 대조구로서 형질전환이 아닌 일반 실생묘와 배발생 캘러스 유래 재분화체에서 나온 순화묘들이 27개체가 화분에서 증식 중이다. 이 형질전환 개체들은 대상으로 유전자 도입 분석을 실시하였는데, 목적 유전자 도입여부는 PCR 검정을 통해 수행하였는데, 대조구인 조직배양 실생묘와 형질전환 유채식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 *ORE7* 유전자 및 *AtSIZ* 유전자의 primer를 이용하여 PCR 검정을 수행한 결과, 형질전환 유채에서 도입 유전자가 존재함을 확인하였다(그림 121과 122). 이들 개체들 외에도 Table 13와 14에 나타나 있듯이 각 유전자당 20-30개체 정도의 식물체들이 순화과정 전에 있으므로 이들을 향후 순화과정을 거쳐 유전자 도입 유무 및 발현을 분석할 예정이다. *ORE7* 및 *AtSIZ* 유전자 외에도 본 연구팀은 1차년도 하반기에 유전자총을 이용하여 노화억제 기능을 나타내는 *ORE12* 및 *ATHG1* 유전자 형질전환을 실시하였는데 현재 *ORE12*의 경우는 7회 실험동안 2,752개의 종자를 형질전환 시켜 현재 124개체의 PPT 저항성 개체(4.5%)를 증식 중이고, *ATHG1* 유전자의 경우 9회 실험을 거쳐 3,514개의 종자를 형질전환 시켜 84개체의 PPT 저항성 개체(2.4%)를 증식 중에 있다. 평균적으로 2.4%와 4.5%의 형질전환 효율을 나타내는 두 유전자를 각각 포함하는 형질전환 개체들은 향후 유전자 도입과 발현 검정 및 기능분석을 위해 더 많은 형질전환 유채 식물체를 확보하기 위해 실험을 수행 중이다.

Table 13. 형질전환 식물체 생산현황 (종자 실생묘 이용)

Transgene type	Transformation methods	#of independent transgenic lines	#of putative transgenic shoots (above 2.5-5cm in length) in vitro container	#of transgenic plants in pots
ORE7	Agrobacterium	5	19	8
	Genegun	4	14	6
AtSIZ	Agrobacterium	6	12	5
	Genegun	3	8	3
pCAMBIA 3301	Agrobacterium	5	22	3
	Genegun	4	12	3
Control	N.A	4	20	12

Table 14. 형질전환 식물체 생산현황 (하배축 이용)

Transgene type	Transformation methods	#of independent transgenic lines	#of putative transgenic shoots (less than 1cm in length)	#of transgenic shoots with roots
ORE7	Agrobacterium	12	23	8
	Genegun	3	6	2
AtSIZ	Agrobacterium	5	14	5
	Genegun	2	5	3
Control	N.A	5	65	15

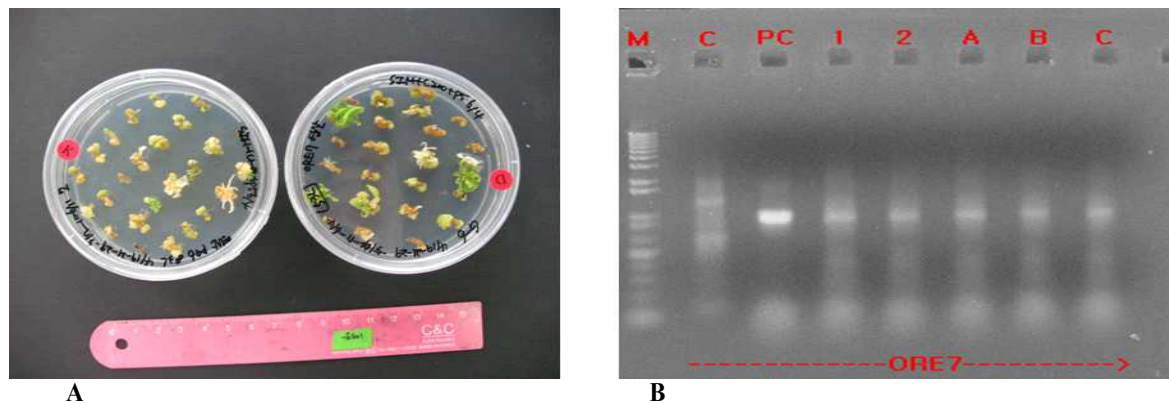


그림 121. 하배축 이용 형질전환 식물체 및 PCR 검정 (A: 하배축 유래 형질전환 기내 식물체, B: 하배축 유래 형질전환 식물체 PCR 검정 - ORE7 유전자: 936 bp)

NC PC 1 2 3 4 6 7 NC 1 3 7 8 11 13 14 PC



그림 122. 형질전환 유체 PCR검정 (좌측: *AtSIZ* 하배축 유래 형질전환체; 우측: *ORE7* 하배축 유래 형질전환체, NC: negative control, PC: positive control, #1-14: 형질전환 계통, *ORE7* 936 bp; *AtSIZ* 1,794 bp)

### 나. 2차년도 및 3차년도 형질전환 유체 식물체 생산 현황

① **형질전환 유체 식물체 생산 현황:** 신규 유전자인 *GSDL1*과 *ORE12*유전자를 형질전환 시켜 기내 선발과정(그림 123)을 거쳐 2차년도에 기내상태에서 독립적인 형질전환 계통으로 *ORE7* 형질전환체는 45계통 200여 개체, *AtSIZ* 형질전환체는 35계통 200여 개체 그리고 *GSDL1(ATHG1)* 형질전환체는 15계통 115개체를 증식하였으며, 상기 형질전환 과정을 거쳐 생산된 형질전환 유체식물체들은 실내 순화실을 거쳐 온실에서 이식되어 개화과정까지 정상적인 생육이 이루어졌다(그림 124). 그러나 모두 증식 및 유지하여 순화과정까지 가기에는 온실 및 기타 여건으로 인하여 어려움이 있었다. 따라서 최종적으로 T1 세대진전 및 유전자의 후대검정을 위해서 온실에서 *ORE7* 형질전환 식물체는 13계통 50개체, *AtSIZ* 형질전환 식물체는 8계통 20 개체, *GSDL1(ATHG1)* 형질전환 개체는 4계통 15개체, *ORE12* 형질전환 유체는 3계통 10 개체 그리고 대조구도 10여 계통 20개체만 제한적으로 증식하여 다음 후대검정을 위해 증식 중에 있다.

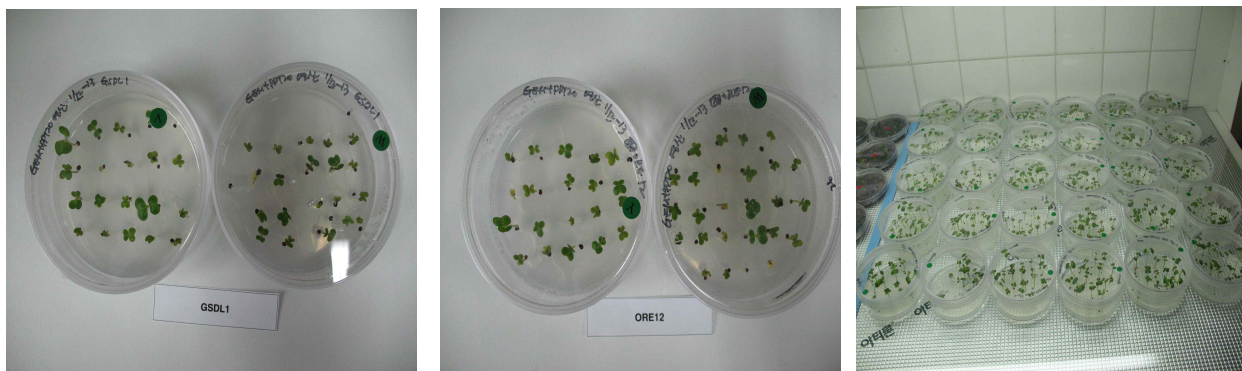


그림 123. 형질전환 유체 증식 과정 (좌측: *ATHG1* 종자실생묘 유래 형질전환체; 중간: *ORE12* 종자 실생묘 유래 형질전환체, 우측: PPT 5mg/L이 포함된 선발배지에서 증식 중인 *ORE12* 및 *ATHG1* 종자실생묘 유래 형질전환 식물체)



그림 124. 형질전환 유채 증식

#### 다. PCR 검정을 통한 형질전환 유채식물체(T0 및 T1개체) 유전자 삽입 확인 및 T1 종자 수확

① **하배축 이용 형질전환 효율:** 2차년도에서의 실험결과, 종자를 이용한 형질전환 시 평균적으로 1.5-6.3%의 형질전환 효율을 보여 주었는데, 하배축을 이용한 형질전환의 경우, 아그로박테리움을 이용한 경우, 12-13.5%의 비교적 높은 형질전환 효율을 나타내었다. 그러나 유전자 총을 이용한 형질전환에서는 1.5% 미만의 낮은 효율을 나타내어 하배축을 절편체로 이용하는 경우는 주로 아그로박테리움을 이용하여 형질전환 실험을 수행하고 있다. 본 연구에서 형질전환 유채 소식물체 생산효율 기준으로는 15%까지도 형질전환 효율이 증가하나, 발근 및 순화과정에서 생육 부진 또는 고사하는 부분을 제외하면 아직까지 최종 형질전환 효율은 2-3%대에 머문다고 할 수 있다.

② **형질전환 유채 PCR 검정 (유전자총과 아그로박테리움 비교):** 하배축을 이용하여 유전자총과 아그로박테리움을 이용하여 생산된 형질전환 유채 식물체들의 ORE7 유전자 도입여부를 PCR 기법을 사용하여 검정한 결과, 그림 125A의 유전자총 결과보다 아그로박테리움을 이용한 방법이 더 효율적으로 영산유채에 도입되었음을 알 수 있었다. 즉, 유전자총을 이용하여 선발된 21계통 중 13계통을 임의로 선정하여 PCR 검정을 수행한 결과, 13계통 중 8계통(#1, 2, 6, 9, 10, 11, 12, 13)만 도입이 확인된 반면, 아그로박테리움을 이용하여 선발된 계통 10계통 중 5계통을 임의로 선정하여 PCR 검정을 수행한 결과, 유전자 도입이 모든 계통에서 확인되었다(그림 125).

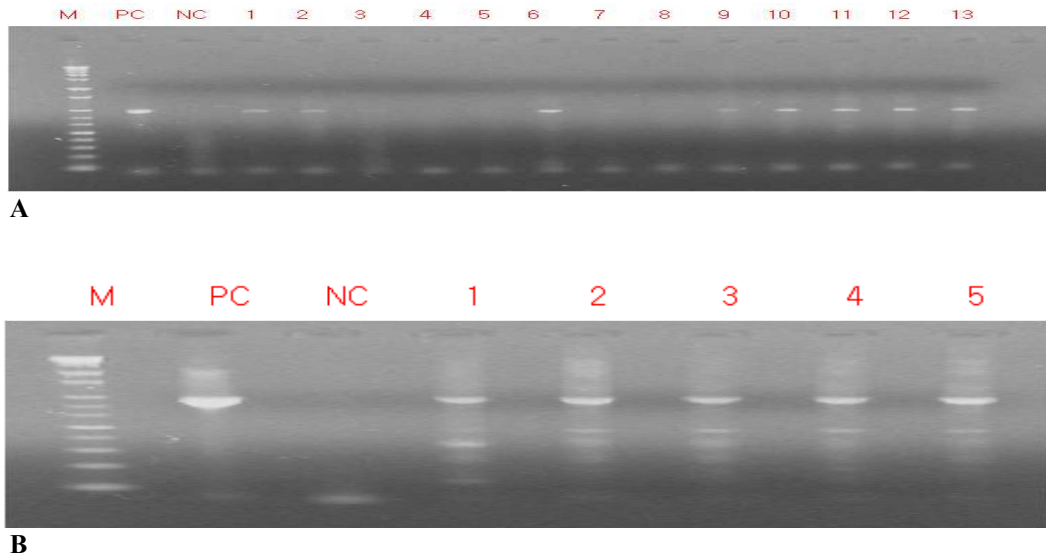


그림 125. 형질전환 유체 PCR 검정 (A: 유전자총, B: 아그로박테리움 유래 형질전환체, NC: negative control, PC: positive control, #1-13: 형질전환 계통, *ORE7* - 936bp)

#### 라. T1 종자 수확 및 개체 선발

*ORE7* 및 *AtSIZ*의 T0 형질전환 식물체에서 삽입 및 선발 유전자의 도입 여부를 PCR 검정을 통해 확인하였으며(그림 121과 122 참조), 이렇게 PPT 선발과 PCR 검정을 거쳐 선발된 형질전환 유체식물 개화주로부터 T1 형질전환 종자 수확을 하였다. 수확된 종자들로부터 발아된 T1 형질전환 계통들에 대한 *BAR* 유전자 발현여부를 선발제초제인 PPT 10 mg/L 첨가된 발아배지에서 저항성 여부를 관찰하여 확인하고, 향후 노화, 염분 및 내건성 스트레스를 조사할 예정이다. 대조구인 비형질전환 유체 식물체의 1개 개화주에서 400-550개의 종자를 획득하였으며, 1개 꼬투리 당 4.5-5.0개의 종자가 결실되었다. 소형 꼬투리는 30 mm 정도의 크기였고 종자가 10개 가까이 들어있는 대형 꼬투리는 길이가 거의 70 mm를 넘는 양상을 보였다. pCAMBIA3301 형질전환 식물체는 개화 수나 꼬투리 숫자가 대조구와 비슷하거나 약간 많았으나, *ORE7* 형질전환 식물체는 개화 수에서도 1.5-2배정도 많았고, 전체 종자 수 및 꼬투리 당 종자결실수도 1.3-2.2배 정도 높은 경향을 보였다. 그림 126에서처럼 형질전환 유체식물체 약 20 개체에서 개화가 시작되었는데 강추위 및 기타 기상 이변으로 인하여 실내온도 유지의 어려움으로 개화 시기 조절 및 개화 발생에 어려움이 있었다. 그럼에도 불구하고, 그림 127에서처럼 결실 과정을 거쳐 T1 형질전환 유체 종자수확을 완료할 수 있었다. 아그로박테리움과 유전자총을 이용하여 T1 종자들을 발아시켜 유묘까지 성장시켜 선발과정을 거친 개체들을 대상으로 한 결과, 두 방법을 이용한 형질전환 유체 T1 세대에 *ORE7*과 *BAR* 유전자가 도입되어 T0세대로부터 유전되었음을 확인하였다(그림 128). 그림 126의 A와 B처럼 대조구와 *AtSIZ* 형질전환 개화양상은 비슷하였으나, 대조구의 개화모습(그림 126C)와 비교하여 *ORE7* 형질전환 유체(그림 126D와 E)는 비교적 많은 수가 개화하는 현상이 관찰되었다. 그러나 대조구와 형질전환 식물체 모두에서 인공교배 후, 정상적으로 개화(그림 126F)하였으며, 꼬투리 형성, 성숙패턴 및 종자형태도 변이없이 비슷한 양상을 나타내었다 (그림 127 참조).

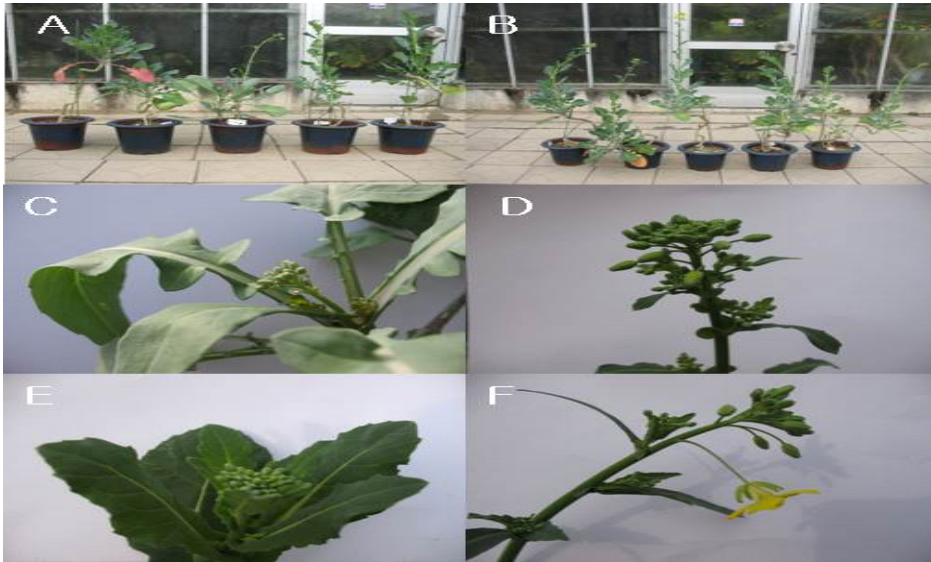


그림 126. 대조구 식물체 및 형질전환 유체 개화 비교 (A: *ORE7* 형질전환개체 개화모습, B: pCAMBIA3301 및 *AtSIZ* 형질전환 유체개화, C: 대조구 식물체 개화모습, D-F: *ORE7* 형질전환체 개화모습)

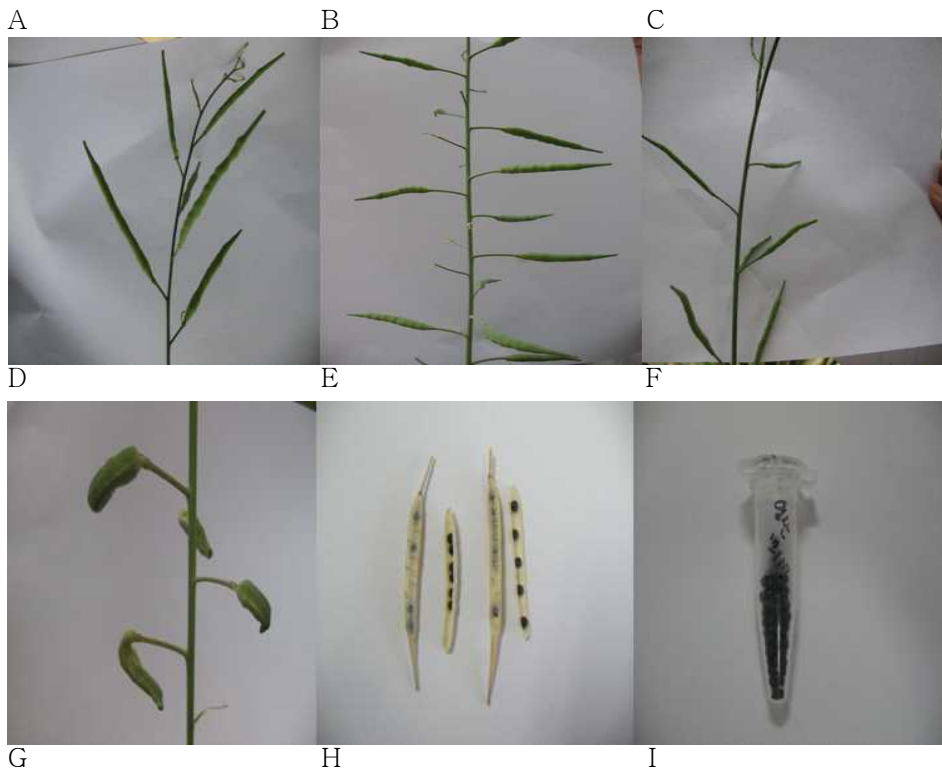


그림 127. 개화 후 대조구 및 형질전환 유체 식물체 T1 종자 성숙과정 (A: 대조구 식물체 개화, B: *AtSIZ* 형질전환 개화, C: *ORE7* 형질전환체 개화, D-F: 형질전환 유체 꼬투리 성숙과정, G: 형질전환 개체에서 비정상 꼬투리 발생, H: 종자성숙, I: 종자수확)

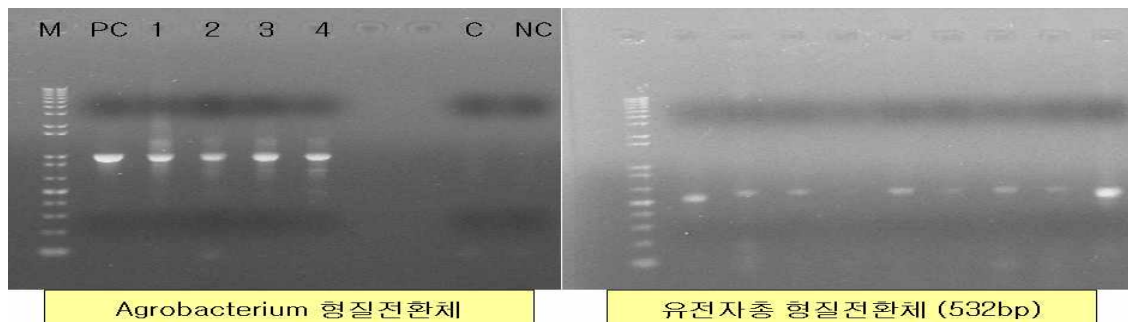


그림 128. T1종자의 삽입유전자 확인 PCR 검정 (좌측: *ORE7* 유전자 (936 bp), 우측: *BAR* 유전자 (552 bp), C: non-transformed plants, NC: negative control)

수확한 종자들 중 일부를 임의로 선별하여 삽입유전자 *ORE 7*과 선발유전자 *BAR*가 삽입되었는지 PCR 검정을 통해 확인하였으며(그림 128), 이 T1 종자들은 13 mL 1회용 튜브에 저장하였고, 발아실험과 제초제 검정 및 NaCl 저항성 용도의 종자들은 1회용 페트리디쉬에 보관 중이다(그림 129). 발아 시험에서도 대조구의 100%보다 다소 낮은 75% 발아율을 보이는 T1 개체도 있었지만 평균적으로 85% 전후의 양호한 발아율을 나타내었다(그림 130).

이렇게 선별된 유묘를 가지고 향후, 내염성, 내건성 및 노화 지연 등에 관한 기능성 검정을 할 예정이다. 또한 생육 중인 T1 유채 유묘들의 생육조사 그리고 보다 많은 형질전환 개체들의 종자평균 무게, 종자수량 등의 조사를 통해 실제 수량 증대의 목적이 달성되었는지에 대한 여부를 검정하고자 한다.

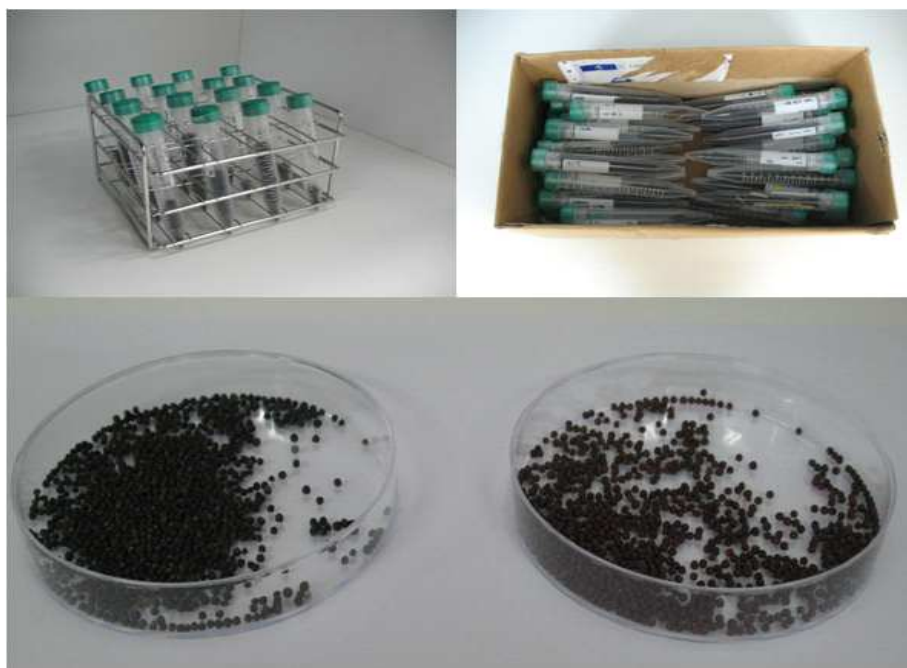


그림 129. 수확된 T1 종자 및 보관



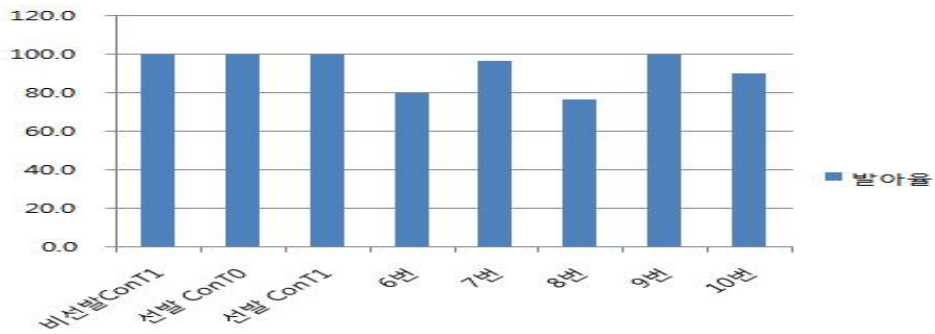


그림 130. 일반 유채종자와 T1종자의 발아율 비교시험 (비선발 con: non-transformed plants, 6번-10번: ORE7 T1 형질전환체)

#### 마. Reverse transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석

본 연구에서 생산된 형질전환 유채 식물체들의 ORE7 유전자의 발현여부를 검정하기 위해 RT-PCR 검정을 아래 방법을 사용하여 수행하였다. 형질전환 추정 식물체의 신선한 잎을 채취, 분리하고 액체질소를 이용하여 미세한 가루로 분쇄한 후 RNA Purification kit (FavorPrep PLANT Total RNA Purification Mini kit, Favorgen Biotech)를 이용한 RNA 분리 방법에 따라 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron Biotechnology)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였으며, PCR에서 사용하였던 primer set(Table 15 참조)를 이용하여 RNA의 발현을 확인하였다. 식물체 내에서 항상 일정하게 발현되는 유채 ACTIN 유전자(ACT)를 이용하여 각 RNA의 양을 비교하는 대조구로 사용하였고, forward primer로서 5'-TGG GTT TGC TGG TGA CGA T-3', reverse primer로서 5'-TGC CTA GGA CGA CCA ACA ATA CT-3'을 이용하였다. 증폭 후, 1.0% agarose gel에 50V, 60분 동안 전기영동을 실시하였다. RT-PCR 수행 전에 본 연구에서 생산된 ORE7 T1 형질전환 계통 13계통 중 10계통을 임의로 선별하여 다시 PCR로 검정하여 ORE7 유전자가 도입되었음을 확인한 후(그림 131 참조), RT-PCR 검정을 수행하였는데 그림 132에 나타나듯이 10 계통 모두 ORE7 유전자가 발현됨을 보여주었다. RT-PCR 검정결과에서 #7과 #9 계통은 다소 약한 발현양상이었고, 나머지 8계통은 강한 발현양을 나타내었는데 이런 RT-PCR 검정에서의 발현량과 생육조사에서 나타난 실제 형질발현과의 차이를 차후 연구에서 여러 세대에 걸쳐 집중적으로 밝히고자 한다.

Table 12. Primer sequences for RT-PCR analysis

Gene	Primer	
ORE7	forward	5'-ATG GAA GGC GGT TAC GAG CAA G-3'
	reverse	5'-TTA AAA AGG TGG TCT TGA AGG TG-3'
ACTIN	forward	5'-TGG GTT TGC TGG TGA CGAT-3'
	reverse	5'-TGC CTA GGA CGA CCA ACA ATA CT-3'

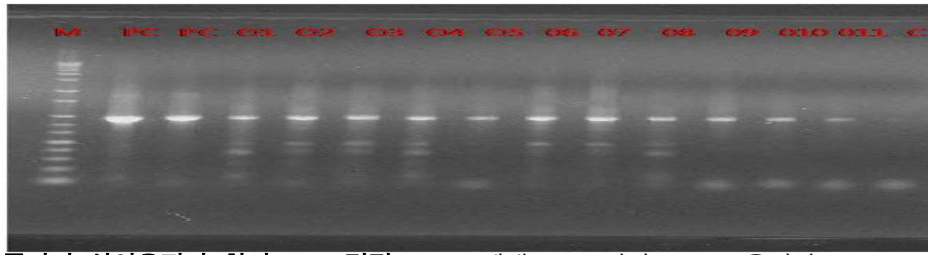


그림 131. T1종자의 삽입유전자 확인 PCR 검정 (A: T1세대 PCR 검정; *ORE7* 유전자 936 bp, C: Non-transformed plants, PC: positive control, M: size marker, #1-11 transgenic lines)

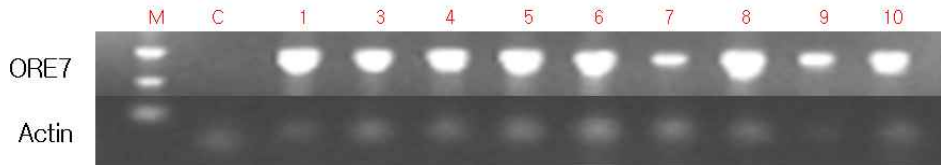


그림 132. T1종자의 삽입유전자 발현용 RT-PCR 검정 (PCR positive계통 11계통 중 #1-10계통 RT-PCR 수행; C: Non-transformed plants, M: size marker, #1-10 transgenic lines, Actin: internal control)

#### 마. 내염성 검정과 형질전환 유체 생육조사를 통한 생산성 증대 기능검정

본 연구에서 생산된 형질전환 유체 식물체에 도입하려고 하는 수량증대 및 복합환경 저항성 유전자가 제대로 작용하는지 확인하기 위해서 내염성 검정과 형질전환체와 대조구 개체의 생육 조사를 수행하였다.

① 1차년도에 생산된 *AtSIZ* 유전자를 포함하는 유체 형질전환 식물체 기능 검정: 본 실험에서 생산된 *AtSIZ* 유전자를 포함하는 유체 형질전환 식물체를 순화하여 화분에서 재배하고 있고, 순화과정까지의 재분화 과정에서 선발표지로 포함된 제초제 PPT 저항성에 대한 개체만을 선발하였는데, 이 개체들을 염 스트레스 저항성에 대한 표현형 분석을 실시하였다. 이 분석을 위하여 NaCl 0-200 mM을 일반 조직배양 실생묘의 잎과 재분화 식물체에 처리한 결과, 그림 133에 나타나듯이 150 mM 이상의 농도에서 2주 후에는 엽조직이 백화됨을 관찰하였다. 이 농도를 배지에 첨가하여 일반 조직배양 유체식물체에 처리한 결과, 3주 정도 지나서 엽조직이 모두 고사하는 결과를 보여 주었다 (그림 133). 이러한 결과를 바탕으로 *AtSIZ* 유전자를 포함하는 유체 형질전환체의 기내선발 과정 뿐만 아니라 순화식물체 표현형 분석에도 NaCl 200mM의 농도가 *AtSIZ* 유전자의 내염성 기능검정 여부를 판단하기에 적합한 농도임을 알 수 있었다.

상기 예비실험을 거쳐 NaCl 150 mM을 *AtSIZ* 유전자를 포함하는 유체 형질전환체의 잎을 채취하여 표현형 분석을 수행한 결과, 일반 대조구와 비교하여 다양한 염 농도에서 스트레스 저항성을 가졌으며, 특히 2번, 3번과 4번 형질전환 계통이 저항성을 나타내는 것으로 관찰되었다 (그림 134). 하지만 분석을 시행한 형질전환 개체 수가 다소 부족하여 더 많은 형질전환 개체 (1회 처리당 10개 계통이상, 각 계통당 5개체)를 생산한 후, 분석할 필요가 있다고 판단된다. 현재 이들은 *ORE7* 유전자와 더불어 더 많은 형질전환체 확보를 위해 추가 실험 및 증식 중에 있다.

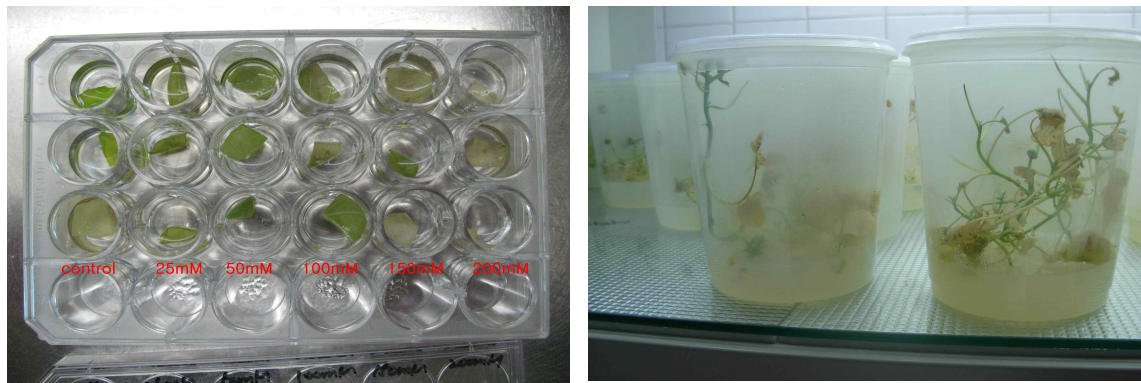


그림 133. 염 스트레스 저항성 실험 시 적정농도 선발실험 (좌측: 적정농도 선발실험 (0-200 mM NaCl), 우측: NaCl 150 mM 일반 유채 재분화 식물체에 처리 3주 후 사진)

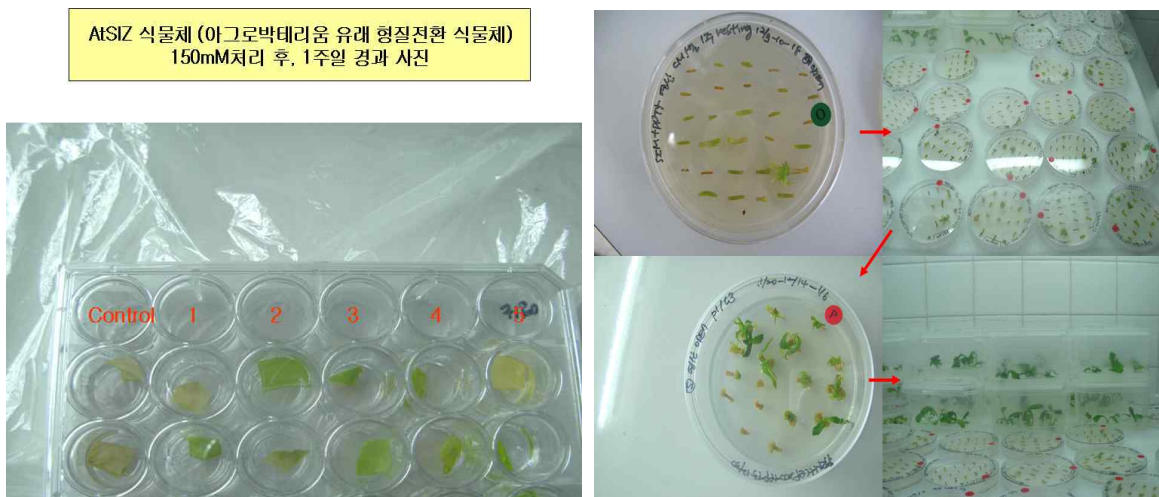


그림 134. 염 스트레스 저항성 실험 (좌측: 200 mM NaCl 형질전환식물체 처리실험, 우측: 하배축을 이용한 아그로박테리움 이용한 형질전환 *AtSIZ* 식물체 생산과정, 화살표는 최초 하배축에서 나온 신초단계에서 증식을 거쳐 순화 상태의 유묘까지의 전개과정을 표시함)

② *AtSIZ*-유채 형질전환체 목표형질 발현 기능 검증 ( $\text{NaCl}$  및 엽록소 측정; 2차년도와 3차년도): 선발 및 증식 중인 *AtSIZ* 형질전환 유채 식물체 중 무작위로 13 개체의 엽을 채취하여  $\text{NaCl}$  200 mM 용액이 들어있는 평판플레이트에 침지 후, 10일간 경과한 후 그림 135A에서 나타나듯이 적색 원이 표시된 계통에서  $\text{NaCl}$ 에 대한 저항성을 나타내었다. 2주 후, 다시 13개체의 엽을 무작위로 채취하여 동일한 처리를 한 후, 7일이 경과하고 나서, 각 계통 및 대조구의 엽록소 a 함량을 조사한 결과, 그림 135B에서 나타나듯이 대조구의 엽록소 함량은 크게 감소하는데 비해 #3, #4, #10 그리고 #13 계통에서 엽록소 함량이 감소하지 않거나, 약간 감소 또는 엽록소 함량이 증가하는 양상을 나타내었다. 특히 #10 계통은 육안 관찰과 다르게 대조구 대비 8배 이상, 타 형질전환 계통들보다도 적게는 2배에서 크게는 7-8배 이상의 높은 엽록소

함량을 나타내어 *AtSIZ* 유전자가 실제 기능을 잘 나타내고 있음을 보여 주었다. 1차년도와 2차년도에서 생산된 *AtSIZ* 유전자가 형질전환 된 20 여 계통 중 9계통을 임의로 선정하여 추가로 NaCl 검정을 한 경우에도 60%가 넘는 6계통이 NaCl 처리에 저항성을 보여 주었다(그림 136). *AtSIZ* 유전자가 형질전환 된 T0 세대 개체의 형질이 제대로 전달되었는지 판단하기 위해 T1 세대개체를 대상으로 내염성 검정을 하였는데, 임의로 선발한 T1 형질전환체 11계통 중 7 계통에서 강한 내염성이 나타남을 관찰 하였다(그림 137). 이를 통하여 *AtSIZ* 도입 유채 형질전환체는 염 스트레스 저항성이라는 목표 형질이 발현되고, 또한 후대에까지 목표형질이 전달됨을 알 수 있었다. 따라서 우리는 *AtSIZ*-유채 형질전환체를 스트레스 저항성 우량 형질전환체로 결정하였고, 이들이 생산성 증대라는 농업형질을 획득하는지 확인하기 위하여 우리는 포장에서 세대진전을 시켜 농업형질을 분석할 예정이다.

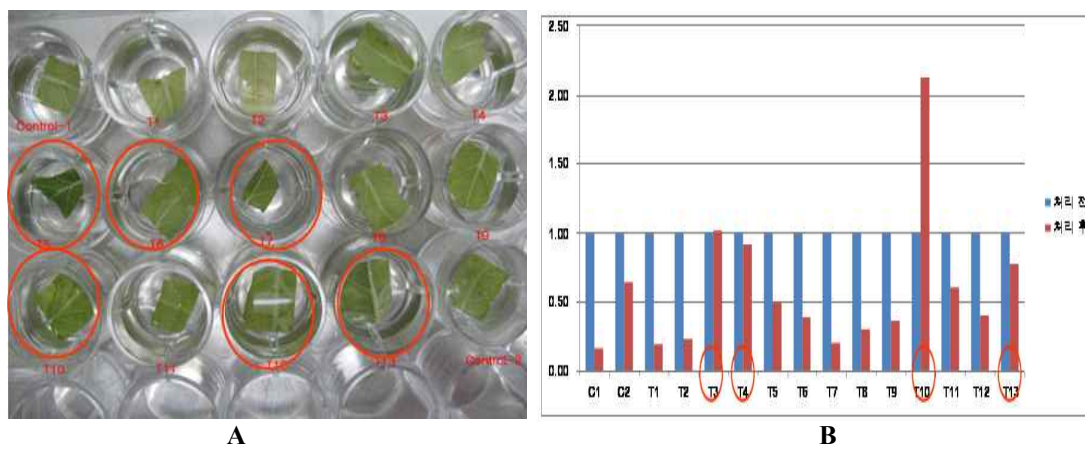


그림 135. *AtSIZ* 형질전환 T0 식물체의 NaCl 검정 및 엽록소 측정 (A: NaCl 200 mM 처리 후 10일, B: NaCl 200 mM 처리 후 7일 경과 후 엽록소 함량 측정)

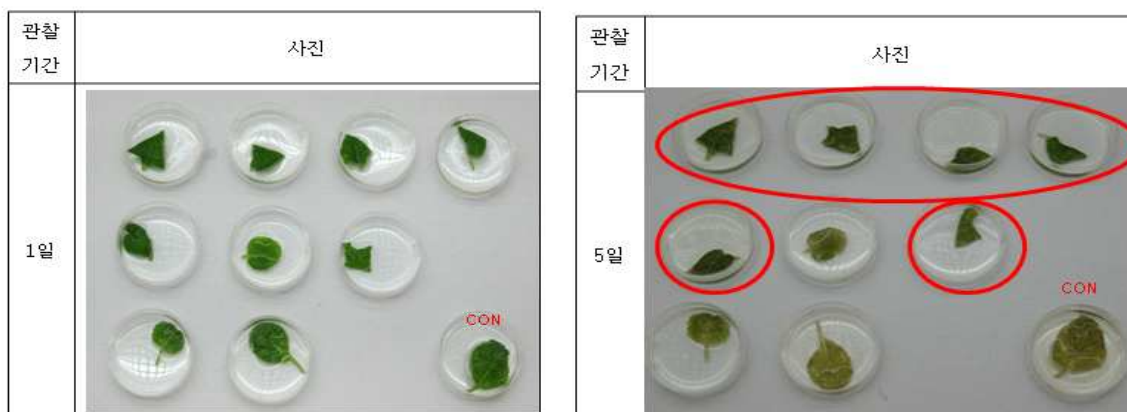


그림 136. NaCl 200 mM처리 5일 후, *AtSIZ* 형질전환체의 엽절편체의 내염성 비교

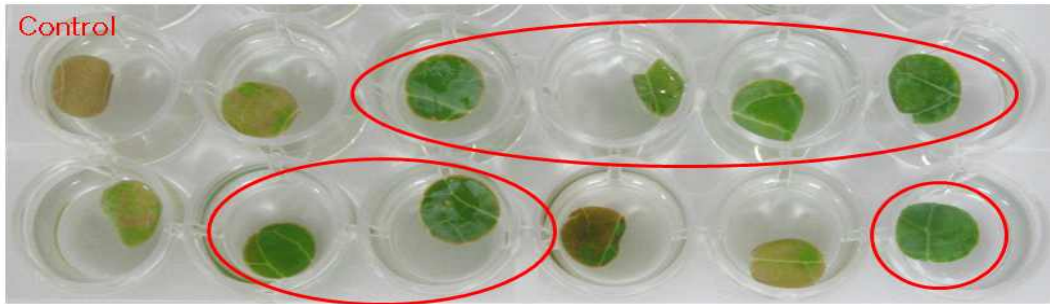


그림 137. NaCl 200 mM처리 5일 후, *AtSIZ* 형질전환 T1 유체 식물체의 내염성 비교

③ T1 종자의 Basta 검정: *ORE7* 및 *AtSIZ* 유전자 형질전환에서 벡터에 선발유전자로서 *BAR* 유전자가 포함되어 선발과정이 효율적으로 수행되었는데, 이러한 선발유전자도 제대로 후대에서 발현되는지도 조사할 필요가 있어서 Basta 처리를 통하여 제초제 저항성 여부를 조사하였다. 이를 위하여 Basta 처리에 필요한 적정농도를 알아내기 위하여 0, 0.1, 0.2 그리고 0.5%의 Basta 처리를 하여 일정 기간 후에 고사하는 비율을 관찰하여 적정농도를 조사한 결과, 0.2% 농도에서 바스타 처리 7일 후, 80% 이상 고사하였고, 0.5% 바스타 처리구에선 100% 고사하는 결과를 나타내어 향후 바스타를 이용한 제초제 저항성 개체 선발에 적합한 농도라고 결론지었다(그림 138 참조).

후대에 제초제 저항성이 정상적으로 전달되어 발현되는지 알아보기 위해 T1 종자를 기내와 기외 실험으로 나누어 발아시켜 조사하였는데, 우선 T1종자를 기내 PPT 20 mg/L가 첨가된 발아용 배지에 파종하고 또 다른 그룹은 화분에 파종 후, 발아 후 1주일 뒤에 바스타 0.5%를 3일 간격으로 2회 처리하였다. 그 결과, 기내 발아실험에서도 일부 개체는 PPT에 저항성을 가지지 않아 고사하였지만, 저항성 개체들은 생존하였다(그림 139 좌측사진 참조). 또한 기외 화분에 파종한 T1 종자들도 발아 후, 0.5%의 비교적 강한 바스타를 3일 간격으로 2회 처리 했음에도 불구하고 생존하여 바스타 저항성이 T0 세대뿐만 아니라 후대인 T1 세대에도 올바르게 전달됨을 알 수 있었다.



그림 138. Basta 적정농도 처리실험 결과 (좌측: 처리기간과 농도에 따른 고사율 조사, 우측: 처리 기간 경과에 따른 유체 식물체 고사모습)

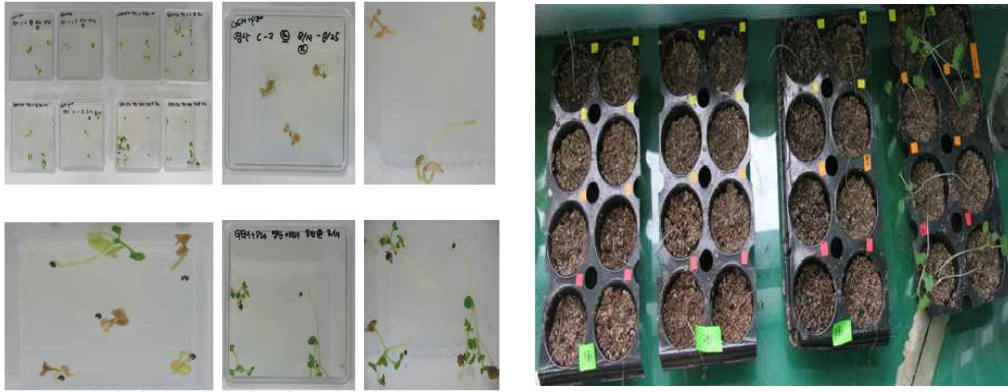


그림 139. T1 세대에서의 제초제 저항성 실험 (좌측: 기내 실험 (PPT 20 mg/L), 우측: 바스타 0.5% 처리 후 10일 경과)

④ **ORE7-유체 형질전환체 농업형질 기능검정:** 본 과제 of 목표인 생산성 증대 우량 형질전환 유체 식물체 개발에 있어서 앞서 제시한 선발과정에서의 형질전환 효율, *ORE7* 및 *BAR* 유전자 도입 및 발현여부 그리고 바스타 처리를 통한 T1 세대에서의 제초제 저항성 발현 등도 의미있는 데이터이긴 하지만, 무엇보다 이번 연구를 통해 생산된 형질전환 유체 식물체들이 바이오디젤 생산에 있어서 주요한 방법 중의 하나인 수량증대 형질발현을 통하여 본 과제목표를 달성하는데 기여할 자료가 더욱 중요하다고 판단된다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 2차년도와 3차년도에 걸쳐 *ORE7* 형질전환 개체를 대상으로 아래와 같은 방법으로 생육조사를 실시하였다. 형질전환 유체식물체가 있는 온실에서 줄자를 이용하여 개체의 초장을 측정하였고, 꽃 크기와 꼬투리 길이 측정에는 디지털 버니어캘리퍼스(Mitutoyo Corp, Japan)를 이용하였다. 형질전환 개체와 대조구 개체의 성숙한 꼬투리를 무작위로 10개씩 추출하여 길이와 무게를 측정하였고, 꼬투리를 절개하여 꼬투리 당 종자개수와 종자무게를 3반복으로 조사하였다.

그 결과, *ORE7* 유체 형질전환체는 대조구에 비하여 개체 크기나 화기 크기에 있어서는 약간 감소하는 경향을 나타내었으나 꼬투리 크기 증가, 꼬투리당 종자 수 증가, 그리고 꼬투리와 종자 무게 증가라는 생산성 증대에 대한 농업형질에 있어서는 뚜렷한 증가 현상을 나타내었다 (그림 140과 141). 생산성 증대에 대한 농업형질의 분석에 있어서 가장 중요한 식물체당 종자 수확량에 대한 분석 결과, *ORE7* 유체 형질전환체는 대조구에 비하여 약 130% 이상의 종자 수확량 증가를 나타내었으며, 그 중 *ORE7-1*, *ORE7-8* 그리고 *ORE7-9* 라인은 150% 이상의 종자 수확량 증가를 나타내었다(그림 142). 따라서 우리는 **ORE7-유체 형질전환체를 생산성 증대라는 농업형질을 가진 우량 형질전환체로 결정**하였고, 이 중 *ORE7-1*, *ORE7-8* 그리고 *ORE7-9* 라인은 세대 확인을 통하여 생산성 증대 형질이 독립적으로 분리되고 안정화된 우량 유체 품종 개발에 적용하고자 하며 이러한 연구는 바이오디젤 생산용 생산성 증대 우량 유체 품종 개발의 성공을 유도하리라 확신한다.

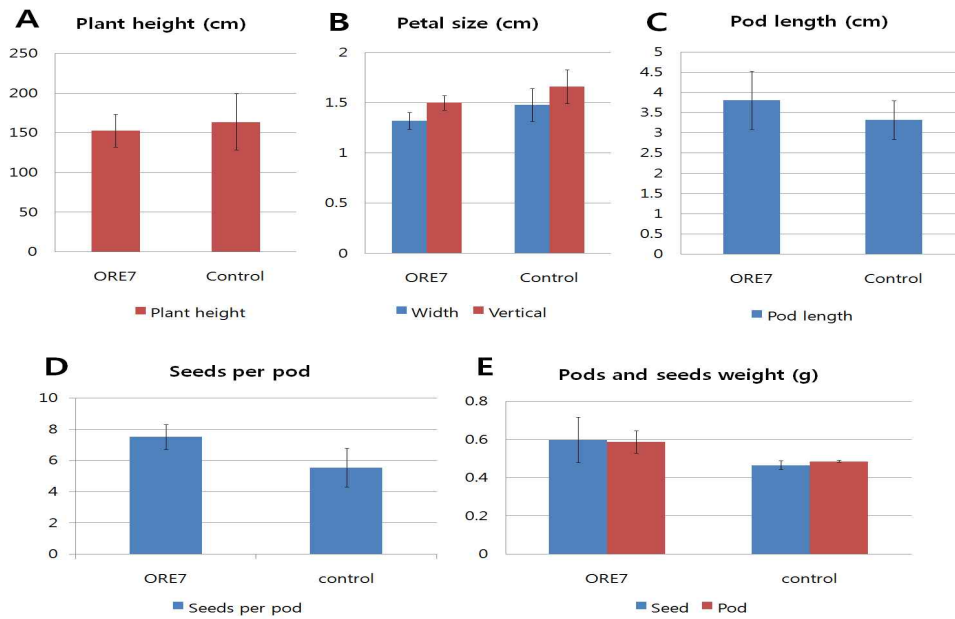


그림 140. 형질전환 유체의 생산량 증대관련 형질조사 비교, n=30 (A: 초장, B: 화기 크기, C: 꼬투리 길이, D: 꼬투리당 종자 수, E: 종자와 꼬투리 중량)

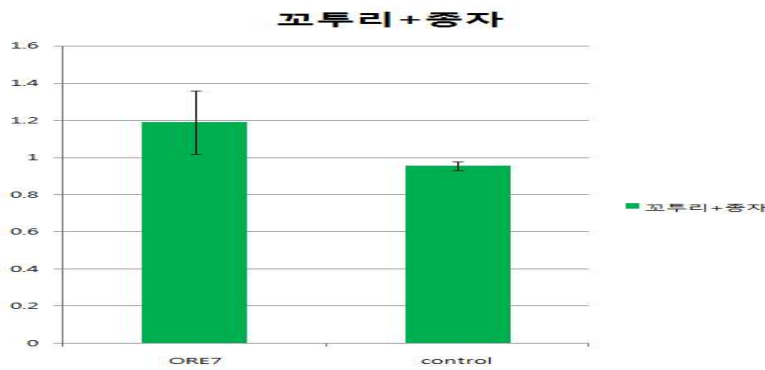


그림 141. ORE7과 비형질전환 영산유체와의 꼬투리와 종자무게에서의 증가량 비교, n=30

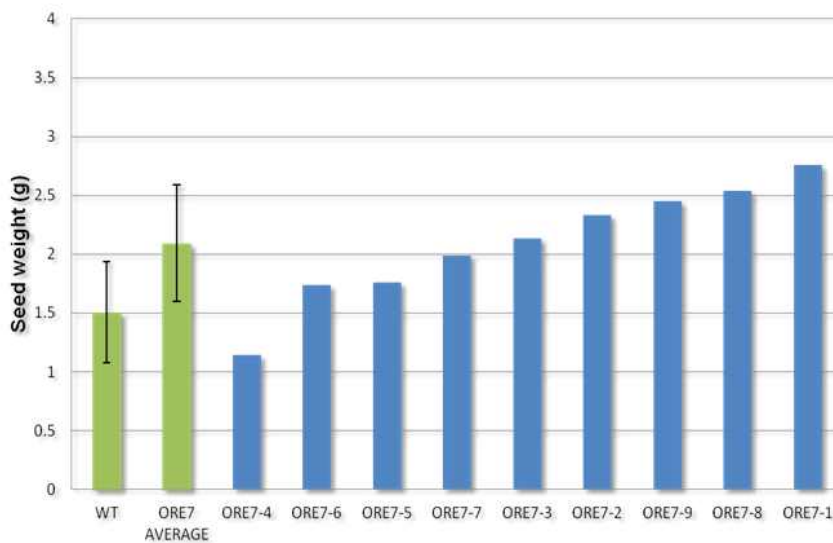


그림 142. ORE7 유체 형질전환체의 종자 수확량 (WT, n=9; ORE7 average, n=9; ORE7 #1-9, T1 형질전환 계통)

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절. 목표 달성도

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1차 연도 (2009)	<b>생산성 증대 관련 유용 유전자 발굴</b> - 노화 지연, 환경 스트레스 저항성 등에 대한 유전자의 기능 재 검정 (총 4건)  - 녹화 연장 혹은 다양한 환경 스트레스 저항성 유전자 등 신규 유전자 (신규1, 2) 발굴 및 기능 검정 (2종)	- 4종의 유전자에 대한 기능 재 검정 · 노화 지연: <i>ORE7</i> , <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> · 환경 스트레스 저항성: <i>AtSIZ</i> - 2종의 신규 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 · <i>ATHG1</i> : 노화 지연, 스트레스 저항성 · <i>GSDL2</i> : 노화 지연, 스트레스 저항성	100  100
	<b>생산성 증대 우량 콩 형질전환체 개발</b> - 녹화 연장 유전자인 <i>ORE7</i> 과 환경 스트레스 저항성 유전자인 <i>AtSIZ</i> 가 도입된 형질전환 콩 개발 진행 중 (2건)  - 기확보 유전자 나머지 2종에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 (2건)  - 기확보 유전자 2종에 대한 형질전환 및 형질전환체 선별 (4건)	- 기확보 유전자 <i>ORE7</i> 과 <i>AtSIZ</i> 가 도입된 형질전환 콩 개발 및 기능 검정 · <i>ORE7</i> 과발현체: 노화 지연 · <i>AtSIZ</i> 과발현체: salt 스트레스 저항성 - 기확보 유전자 <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 - 신규 유용 유전자 <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 - 기확보 유전자 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> 완료 - 기확보 유전자 <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> 및 신규 유용 유전자 2종에 대한 형질전환 및 형질전환체 선별 (총 6건)	100  200  150
	<b>생산성 증대 우량 유채 형질전환체 개발</b> - 유채 재분화 및 형질전환 체제에 대한 최적화 - 녹화 연장 유전자인 <i>ORE7</i> 이 도입된 형질전환 유채 개발 진행 중 (1건)  - 기확보 유전자 나머지 2종에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 (2건)  - 기확보 유전자 2종에 대한 형질전환 및 형질전환체 선별 (3건)	- 재분화 기간 단축 및 발근을 향상 - 유전자총과 아그로박테리움 최적 조건 확립 - 녹화 연장 유전자인 <i>ORE7</i> 및 스트레스 저항 유전자인 <i>AtSIZ</i> 가 도입된 형질전환 유채 개발 진행 중 (2건) - 기확보 유전자 <i>AtSIZ</i> , <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 - 신규 유용 유전자 <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 - 기확보 유전자 2종 <i>AtSIZ</i> 와 <i>ORE12</i> , 그리고 신규 <i>ATHG1</i> 에 대한 형질전환 및 형질전환체 선별 (4건)	100  200  200  125
	- 지적소유권 확보 · 특허출원/등록 2건, 비SCI 논문 1건	- 국내 특허출원 2건, 국제 특허출원 1건	100



구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
2차 연도 (2010)	<b>생산성증대 관련 유용 유전자 발굴</b> - 녹화 연장 혹은 다양한 환경 스트레스 저항성 유전자 등 신규 유전자(신규3) 발굴 및 기능 검정 (총 신규 3종, 1-2차년도)	- 5종의 신규 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (1차년도 2종, 2차년도 3종) · <i>ATHG1</i> : 노화 지연, 스트레스 저항성 · <i>GSDL2</i> : 노화 지연, 스트레스 저항성 · <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> : 노화지연/생산성 증대	160
	<b>생산성 증대 우량 콩 형질전환체 개발</b> - 신규 유전자 3종 중 2종에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 (2건) (총 4건, 1-2차년도)  - 신규 유전자 2종에 대한 형질전환 및 형질전환체 선별 (2건) (총 6건, 1-2차년도)  - 기확보 유전자에 대한 형질전환체 1차 기능 분석	- 기확보 유전자 <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 - 신규 유용 유전자 <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 (총 4건) - 기확보 유전자 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> 완료 - 기확보 유전자 <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> 및 신규 유용 유전자 <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> 에 대한 형질전환 및 형질전환체 선별 (총 6건) - 기확보 유전자 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> 완료 - 기확보 유전자 <i>ORE15</i> 및 신규 유용 유전자 <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> 에 대한 1차 기능 분석 (총 5건) - 기확보 유전자 <i>ORE7</i> 과 <i>AtSIZ</i> 가 도입된 형질전환 콩 2차 기능 검정 및 포장시험 · <i>ORE7</i> : 노화 지연, 생산성 증대 · <i>AtSIZ</i> : salt 스트레스 저항성, 생산성	100  100  200
	<b>생산성 증대 우량 유채 형질전환체 개발</b>  - 기확보 유전자 1종 및 신규 유전자 3종 중 2종에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 (3건) (총 6건, 1-2차년도)  - 기확보 유전자 및 신규 유전자 2종에 대한 형질전환 및 형질전환체 선별 (총 6건, 1-2차년도)  - 기확보 유전자에 대한 형질전환체 1차 기능 분석	- 형질전환 체계 확립 및 대량 증식 · 형질전환 식물체 유전자별 20개체 이상 생산 · 아그로박테리움과 유전자총 이용 형질전환 체계 확립 - 기확보 유전자 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> , <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 - 신규 유용 유전자 <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 (총 6건) - 기확보 유전자 3종 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> 와 <i>ORE12</i> , 그리고 신규 <i>ATHG1</i> 에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 (4건) - 기확보 유전자 <i>ORE15</i> 와 신규 <i>GSDL2</i> 에 대한 형질전환 및 형질전환체 선별 중 (2건) - 기확보 유전자 3종 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> 와 <i>ORE12</i> , 그리고 신규 <i>ATHG1</i> 에 대한 1차 기능 분석 - <i>ORE7</i> 및 <i>AtSIZ</i> 에 대한 2차 기능 검정 진행 중	추가 진행  100  100  150
	- 지적소유권 확보 · 특허출원/등록 1건, · SCI 논문 1건, 기타 1건	- 국내 특허출원/등록 2건, 국제 특허출원 1건 - 비SCI 논문 게재 1건	130

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
최종 평가 (2011)	<b>생산성증대 관련 유용 유전자 발굴</b> - 노화 지연, 환경 스트레스 저항성 등에 대한 유전자의 기능 재 검증 (총 4건) - 녹화 연장 혹은 다양한 환경 스트레스 저항성 유전자 등 신규 유전자(신규3) 발굴 및 기능 검증 (총 신규 3종, 1-2차년도)	- 4종의 유전자에 대한 기능 재 검증 · 노화 지연: <i>ORE7</i> , <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> · 환경 스트레스 저항성: <i>AtSIZ</i> - 7종의 신규 유용 유전자 발굴 및 기능 검증 (1차년도 2종, 2차년도 3종, 3차년도 2종) · <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> : 노화 지연/스트레스 저항성 · <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> , <i>ATPG2</i> : 노화지연/생산성 증대	100 230
	<b>생산성 증대 우량 콩 형질전환체 개발</b> - 형질전환용 벡터 construct 제작 (6건)	- 기확보 유전자 <i>ORE7</i> , <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> 그리고 <i>AtSIZ</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 - 신규 유용 유전자 <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 - <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> 에 대한 특허 회피 형질전환용 벡터 construct 제작 (총 12건)	200
	- 콩 형질전환체 생산 (6건)	- 기확보 유전자 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> 완료	130
	- 콩 형질전환체 기능 분석 (4건 이상)	- 기확보 유전자 <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> 및 신규 유용 유전자 <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> 에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 (총 8건)	170
	- 생산성 증대 우량 콩 형질전환체 개발 (1종 이상)	- 기확보 유전자 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> 완료 - 기확보 유전자 <i>ORE15</i> 및 신규 유용 유전자 <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> 에 대한 기능 분석 (총 7건) - 기확보 유전자 <i>ORE7</i> 과 <i>AtSIZ</i> 가 도입된 형질전환 콩 포장시험을 통한 생산성 증대 우량 형질전환체 개발 (2종)	200
	<b>생산성 증대 우량 유채 형질전환체 개발</b> - 유채 재분화 및 형질전환 체제에 대한 최적화 - 형질전환용 벡터 construct 제작 (6건)	- 재분화 기간 단축 및 발근율 향상 - 유전자총과 아그로박테리움 최적 조건 확립 - 형질전환 체계 확립 및 대량 증식 - 기확보 유전자 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> , <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 - 신규 유용 유전자 <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> 에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 (총 10건)	100 160
	- 유채 형질전환체 생산 (6건)	- 기확보 유전자 3종 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> 와 <i>ORE12</i> , <i>ORE15</i> 그리고 신규 <i>ATHG1</i> , <i>GSDL2</i> 에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 (총 6건)	100
	- 유채 형질전환체 기능 분석 (3건 이상)	- 기확보 유전자 3종 <i>ORE7</i> , <i>AtSIZ</i> 와 <i>ORE12</i> , 그리고 신규 <i>ATHG1</i> 에 대한 기능 분석 (총 4건)	130
	- 생산성 증대 우량 유채 형질전환체 개발 (1종 이상)	- <i>ORE7</i> 및 <i>AtSIZ</i> 에 대한 목표 형질 및 농업 형질 분석을 통한 생산성 증대 우량 <i>ORE7</i> 유채 형질전환체 개발 (1종 이상)	150
	- 지적소유권 확보 · 특허출원/등록 5건, · SCI 논문 3건, 기타 3건	- 국내 특허출원/등록 9건, 국제 특허출원 2건 - SCI 논문 3건 투고 예정, 기타 1건 게재 및 2건 심사 중	110

## 제 2 절. 관련분야에의 기여도

### 1. 활용방안

본 연구를 통하여 획득한 제노마인(주)의 chromatin architecture 조절기술을 통한 생산성 증대 관련 유용 유전자의 발굴 및 기능 검정을 통해 지적소유권을 확보하고, 본 유전자들에 대한 기술이전을 통하여 경제적 이익을 추구할 것이다. 이때 유전자의 기능을 강화하기 위하여 관련 전공자(식물 생리·생화학자 등)와의 공동연구를 적극 추진할 것이며, 이러한 연구 결과는 유용 유전자의 기술이전에 있어서 보다 부가가치를 높일 것이다.

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

**신품종 혹은 신기능성 작물 개발:** 본 사업을 통해 개발된 우량 형질전환체에 대한 품종 개발은 GM 작물 실용화 연구를 통하여 사업화를 추진하고자 하며, 본 사업동안의 추진한 단계인 생산성 증대에 대한 농업형질 획득은 이후 GM 작물 실용화에 있어서 기획, 형질전환체 개발, 우수 이벤트 선발 및 안정성 평가를 추진할 예정이다. 이러한 사업 추진전략은 단기적으론 우량 형질전환체에 대한 기술이전, 그리고 장기적으론 종자 생산으로 인한 종자 산업화의 활성화 및 고부가 가치 창출이 가능할 것으로 예측된다. 또한 본 사업에서 발굴되는 유전자는 생산성 증대 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능할 것이다.

**국가 농업 경쟁력 확보:** 본 사업을 통하여 확보된 생산성 증대 바이오디젤 원료 작물들을 간척지, 휴경농지 등 국가 비농지에 재배하여 농가 소득 증대 및 국내 농업 경쟁력 확보에 일조할 것이다.

## 2. 기대성과

### [기술적 측면]

본 연구를 통해 확보된 Chromatin architecture 조절기술을 통한 생산성 증대 관련 유용 유전자는 유전자의 발현 조절에 따라 생산성 증대와 녹화 연장의 두 가지 뚜렷한 표현형적 특징을 제공한다. 따라서 작물 개발에 있어서 본 유전자의 적용은 녹화 연장 형질, 그리고 생산성 증대 형질 등을 적용 작물의 특성에 따라 개발할 수 있다는 장점을 제공한다. 따라서 생산성 증대 유용 유전자에 대한 지적소유권의 확보는 다양한 작물의 개발이 가능하게 하고, 경제적으로 고부가 가치 창출이 가능하게 할 것이다. 또한 생산성 증대관련 유용 유전자에 대한 지적소유권 확보는 향후 국가 생명공학 산업화의 경쟁력을 가지는데 일조할 것이다.

국가 기간산업으로 그 위치를 공고히 해온 국내 농업이 존재의 위기를 맞고 있는 열악한 상황에서 작물의 생산성 증대 및 농업의 고부가가치화를 통하여 농촌 및 농업 기반을 새로이 구축할 필요가 있다. 따라서 생산성 증대 바이오디젤 원료 작물 개발을 통하여 고부가 가치 작물을 생산함으로써 우선 국가 에너지 안보 및 바이오에너지 수입대체 효과를 제공할 수 있을 뿐 아니라 국가 국내 농가에 경제적 이익을 제공하여 귀농 의지의 고취 및 국가 기반 사업인 농업 활성화에 일조할 것이다. 또한 형질전환 기술을 이용한 바이오에너지 문제 접근에 대한 모델을 제시함으로써 타 바이오에너지 작물 개발에 대한 초석이 될 것이다.

세부적으로 보면 chromatin architecture 조절 관련 유용 유전자의 발굴은 식물의 노화 현상과 생산성 증대에 대한 상관관계를 밝히는데 대한 분자적 기작 해명의 전기를 만들고, 다른 작물의 개발 형질에 따라 노화 조절, 스트레스 저항성 조절, 혹은 생산성 증대 조절기술의 개방 등 광범위한 파급 효과가 있을 것이다.

그리고 본 사업을 통하여 확보되는 고효율 형질전환 기술 및 우량 형질전환체는 관행 교잡 육종에 생명공학기법을 접목한 새로운 분자유종기술의 기초로 활용할 수 있을 것이다.

### [경제·산업적 측면]

한정된 화석 에너지의 고갈로 에너지 문제는 국가 안보차원의 위협요인이 되고 있다. 따라서 바이오에너지 원료 작물 개발은 바이오에너지 생산의 기반 기술 확보로 인하여 에너지 안보문제에 있어 국가의 경쟁력 확보 뿐 만 아니라 막대한 에너지 수입 대체 효과 및 고부가 가치 창출이 가능할 것이다. 또한 개발된 바이오에너지 원료 작물을 통한 대차에너지 개발은 이산화탄소 감축으로 환경오염을 줄일 수 있으리라 판단된다.

세계적으로 재생 에너지 중 많은 부분을 차지하고 있는 바이오에너지는 2005년 기준 세계 바이오에탄올 및 바이오디젤의 생산은 각각 1,707만 톤과 291만 톤으로 연평균 13-28%의 증가율을 보이고 있다. 이러한 바이오에너지 생산 증가는 농산물 원료에 대한 수요 증가로 이어져 바이오에너지 원료 작물 개발은 경제적으로 고부가 가치 창출이 가능하게 할 것이다. 한편 바이오에너지는 원료 생산에서 제조 공정, 유통, 소비에 이르는 과정에서 많은 산업이 복합적으로 연계된 고부가 가치 산업으로, 고용 확대와 경제 활성화에 유용한 전략산업으로 육성이 가

능하리라 판단된다. 이러한 바이오에너지 산업의 육성은 국내 농업의 고령화와 경제 환경 문제에 대한 새로운 방향을 제시하여 농업 활성화에 기여할 수 있다.

최근 20년간의 형질전환기술에 있어서 유전자 재조합 및 형질전환 식물체 개발에 대한 특허 출원 현황을 조사해 보면, 우리나라는 최근 많은 건수의 특허출원을 하였지만 여전히 미국의 약 10% 정도에도 미치지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 과제의 생산성 증대 형질 제공에 있어 탁월한 기능을 가지는 유용 유전자의 발굴은 일차적으로 식물 유전자를 독점하여 세계 식물 생명공학 사업을 독점적으로 운영하고자 하는 다국적 기업을 견제할 수 있으며, 식물 생명공학에 대한 국가 간의 경쟁력을 강화시키는데 일조할 것이다. 유전자 변형 작물 재배규모가 1996년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있고 최근의 바이오에너지 작물 개발이 지속적으로 진행된다면 그 시장 규모는 기하급수적으로 증가할 것으로 추정된다. 따라서 식물의 생산성 증대 관련 유용 유전자를 통한 바이오디젤 원료 작물 개발은 유전자의 잠재 시장과 신품종 혹은 신기능성 작물 시장, 두 가지 분야에 모두 관여 할 수 있기 때문에 엄청난 경제적 이익을 제공할 것이다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절. 연구개발 성과

#### 1. 연구성과 목표 및 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭 등록	품종 수입 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	2					1		1	
	달성	3								
2차년도	목표	1						1	1	
	달성	2	1						1	
3차년도	목표	2		1				2	1	
	달성	5								
계	목표	5		1			1	3	3	
	달성	10	1						1	

#### 2. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Current status of tissue culture and genetic transformation systems in oilseed rape plants ( <i>Brassica napus</i> L.)	이상일, 김윤혜, 이동희	김종보	이유미, 박서준	J. of Plant Biotechnology	37: 379-387	국내	비SCI
2012	ORE7-originated leaf senescence delay confers yield increase through maintenance of chromatin structure in active form	김미진	정영수	이동희 등	Nature Biotech.	투고 예정	국외	SCI
2012	The CCCH-Type Zinc Finger Proteins AtSZF2 increases salt tolerance in transgenic soybean	김미진	정영수	이동희 등	Plant Cell Report	투고 예정	국외	SCI
2012	Optimization of <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation system in oilseed rape plants	이상일, 이이레	김종보	이동희, 노희선	J. of Plant Biotechnology	심사 중	국내	비SCI급
2012	Production of transgenic oilseed plants via particle bombardment	이상일	김종보	이이레, 노희선, 이동희	Korean Journal of Plant Resources	심사 중	국내	비SCI급
2012	Transient <i>gus</i> gene expression in oilseed rape plants	이강과, 이상일	김종보	이이레, 노희선, 이동희	Scientia Horticulturae	5월 투고 예정	국외	SCI급

### 3. 특허출원/등록 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2010년 2월	식물의 <sup>a)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2010-0011652					
2010년 2월	ATHG1 <sup>b)</sup>	제노마인(주)	PCT(국제)	PCT/KR2010/000767					
2010년 4월	식물의 <sup>c)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2010-0030394					
					2010년 11월	두 가지 <sup>d)</sup>	동아대학교 /한국화학 연구원	대한민국	10-2010-0994443
2011년 1월	AtSIZ <sup>e)</sup>	한국생명공학연구원	대한민국	10-2011-0007862					
2011년 1월	식물의 <sup>f)</sup>	제노마인(주)	PCT(국제)	PCT/KR2011/000593					
2011년 8월	식물의 <sup>g)</sup>	동아대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0084975					
2011년 4월	식물의 <sup>h)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2011-0038929					
2011년 4월	식물의 <sup>i)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2011-0038932					
2011년 10월	식물의 <sup>j)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2011-0110593					
2012년 2월	식물의 <sup>k)</sup>	제노마인(주)	대한민국	10-2012-0016951					

<sup>a)</sup>식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

<sup>b)</sup>ATHG1 Protein Delaying Senescence and Providing Stress Tolerance of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use

<sup>c)</sup>식물의 수명 연장 기능 및 스트레스 내성 기능을 가지는 GSDL2 단백질, 그 유전자 및 이들의 용도

<sup>d)</sup>두가지 제초제에 대하여 저항성을 가지는 항생제 마키프리형질전환 콩 식물체

<sup>e)</sup>AtSIZ 형질전환 콩 6번 사상의 도입 유전자 위치 및 이의 이용 방법

<sup>f)</sup>식물의 수명 연장 기능 및 스트레스 내성 기능을 가지는 GSDL2 단백질, 그 유전자 및 이들의 용도

<sup>g)</sup>식물의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 AtSZF2 유전자 및 이의 용도

<sup>h)</sup>식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

<sup>i)</sup>식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

<sup>j)</sup>식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

<sup>k)</sup>식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

#### 4. 학술대회 발표

- 1) MJ Kim, EH Jeon, JH Pak, HY Lee, HJ Kim, DH Lee and YS Chung. Production of soybean transgenic lines with various functions using highly efficient soybean transformation system. 2009. Plant biology 2009. 미국 하와이, 7/18-22 (포스터)
- 2) JH Lee, MJ Kim, EH Jeon, JH Pak, HJ Kim, DH Lee and YS Chung. Ectopic Expression of ORE7 and AtSIZ from Arabidopsis in Soybean. 2009. Bioprocess and Biosystems Engineering. 중국 상하이, 8/3-6 (포스터)
- 3) MJ Kim, EH Jeon, JH Pak, HJ Kim, DH Lee and YS Chung. Development of soybean transgenic lines with multiple functions using highly efficient soybean transformation system. 2009. 한국식물학회-식물생명공학회 광주, 4/30-5/1 (포스터)
- 4) MJ Kim, EH Jeon, JH Pak, HJ Kim, DH Lee and YS Chung. Development of soybean transgenic lines with various functions using highly efficient soybean transformation system. 2009. 한국육종학회, 대전, 7/1-3 (포스터)
- 5) 이상일, 이유미, 김윤혜, 이강파, 이동희, 김종보. Development of transformation system with *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment using hypocotyl and seed explants in *Brassica napus* plants. 2009. 한국식물과 학협의회 초록 p106. 제4회 한국식물과학협회의 정기학술대회, 서울교육문화회관, 10/26-27 (포스터)
- 6) MJ Kim, EH Jeon, JH Pak, DH Lee, YS Chung. Production of soybean transgenic lines with three genes, Ore7, AtSIZ and SMV CP-RNAi using highly efficient soybean transformation system. 2010 작물기능유전체학 국제심포지엄 제주도, 4/14-16 (포스터)
- 7) MJ Kim, EH Jeon, JH Pak, DH Lee, SC Jeong, YS Chung. Development of soybean transgenic plants with three genes, ORE7, AtSIZ and SMV CP-RNAi using highly efficient soybean transformation system. 2010. 21st International Conference on Arabidopsis Research 요코하마, 일본 6/6-10 (포스터)
- 8) MJ Kim, EH Jeon, JH Pak, HJ Kim, DH Lee, SC Jeong, SH Ha, YS Chung. Production of soybean transgenic plants with three genes, ORE7, AtSIZ and PAC using Agrobacterium-mediated transformation. 2010. 한국 육종학회 대전, 7/8-9 (구두)
- 9) MJ Kim, EH Jeon, JH Pak, HJ Kim, DH Lee, SC Jeong, SH Ha, YS Chung. Analysis of soybean transgenic plants with three genes, ORE7, AtSIZ and PAC using Agrobacterium-mediated transformation. 2010. 한국 육종학회 대전, 7/8-9 (포스터)
- 10) 이상일, 이유미, 노희선, 김윤혜, 박태호, 이동희, 김종보. 유전자총을 이용한 환경복합저항성 형질전환 유채 개발. 2010. 한국육종학회 대전, 7/8-9 (포스터, 42권 별책 p112)
- 11) 김윤혜, 이상일, 이유미, 이이레, 이동희, 김종보. Development of an efficient transformation system using *Agrobacterium tumefaciens* from the hypocotyl explants in oilseed rape plants. Korean Journal of Horticultural Science & Biotechnology 대전, 10/22-23 (포스터, 28권 별책 p133)
- 12) MJ Kim, JH Pak, HJ Kim, HN Hong, QN Thi, DH Lee, SC Jeong, YS Chung. Arabidopsis AtSZF2 in transgenic soybean increases tolerance to salt stress. 2011 한국생명공학회, 대전컨벤션센터, 4/28-29 (포스터)
- 13) MJ Kim, JH Pak, HJ Kim, HN Hong, QN Thi, DH Lee, SC Jeong, YS Chung. Arabidopsis ORE7, AT-hook protein, in transgenic soybean delays leaf senescence with increased chlorophyll content. 2011 한국생명공학회, 대전컨벤션센터, 4/28-29 (포스터)
- 14) MJ Kim, JH Pak, HJ Kim, HN Hong, DH Lee, SC Jeong, SH Ha, HK Choi, HW Jung, YS Chung. Improvement of agricultural traits of soybean by genetic transformation with ORE7, AtSZF2, and PAC using highly efficiently soybean



- transformation system. 2011. 한국생명과학회 20주년 기념 국제학술대회, 부산 해운대 벅스코, 10/27-28 (포스터)
- 15) IC Lee, KJ Kim, HS Jang and DH Lee. Enhancement of yield and delay senescence through the control of ATPH7 expression. 2011. 한국식물학회 정기학술대회, 부산대학교, 11/4-5, (포스터, 초록집 p88)
- 16) 김윤혜, 이상일, 이유미, 이이레, 노희선, 이동희, 김종보. 켈러스 타입별 재분화 패턴조사 및 비타민 처리에 의한 형질전환 유채 식물체 생산 효율 증대. 2011. 한국육종학회, 부영덕유산리조트, 7/7-8 (포스터, 43권 별책 1호 p108)
- 17) 이이레, 이상일, 노희선, 김예솔, 이동희, 김종보. 수량증대 형질전환 유채의 생육패턴 분석 및 유전자 발현. 2011. 한국식물생명공학회, 충남대, 11/17-18 (포스터, 초록집 p84)

## 5. 인력활용/양성 성과

### 가. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
9		7	2		3	6			9

## 제 2 절. 성과활용 계획

### 1. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

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

### 2. 연구성과 활용 계획

본 연구를 통하여 획득한 제노마인(주)의 chromatin architecture 조절기술을 통한 생산성 증대 관련 유용 유전자의 발굴 및 기능 검정을 통해 지적소유권을 확보하고, 본 유전자들에 대한 기술이전을 통하여 경제적 이익을 추구할 것이다. 이때 유전자의 기능을 강화하기 위하여 관련 전공자(식물 생리·생화학자 등)와의 공동연구를 적극 추진할 것이며, 이러한 연구 결과는 유용 유전자의 기술이전에 있어서 보다 부가가치를 높일 것이다.

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

**신품종 혹은 신기능성 작물 개발:** 본 사업을 통해 개발된 우량 형질전환체에 대한 품종 개발은 GM 작물 실용화 연구를 통하여 사업화를 추진하고자 하며, 본 사업동안의 추진한 단계인 생산성 증대에 대한 농업형질 획득은 이후 GM 작물 실용화에 있어서 기획, 형질전환체 개발, 우수 이벤트 선발 및 안정성 평가를 추진할 예정이다. 이러한 사업 추진전략은 단기적으론 우량 형질전환체에 대한 기술이전, 그리고 장기적으론 종자 생산으로 인한 종자 산업화의 활성화 및 고부가 가치 창출이 가능할 것으로 예측된다. 또한 본 사업에서 발굴되는 유전자는 생산성 증대 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능할 것이다.

**국가 농업 경쟁력 확보:** 본 사업을 통하여 확보된 생산성 증대 바이오디젤 원료 작물들을 간척지, 휴경농지 등 국가 비농지에 재배하여 농가 소득 증대 및 국내 농업 경쟁력 확보에 일조할 것이다.

### 3. 연구성과 산업화 계획

본 과제의 목표는 생산성 증대 관련 유용 유전자 도입이 가능한 콩과 유채 형질전환 기법을 적용하여 바이오디젤 원료 작물 개발에 있으며, 세부적 산업화 방안으로는 생산성 증대 우량 콩 및 형질전환체를 개발하고, 개발된 우량 형질전환체의 GM 작물 실용화를 통한 산업화이다. 발굴된 유전자와 개발된 우량 형질전환체의 산업화는 우선 유전자 혹은 형질전환체에 대한 지적소유권을 확보한 후, 지적소유권의 기술이전이라는 단기 사업 전략과 신품종 개발 및

종자 생산이라는 장기 사업 전략으로 나눌 수 있으며 그 내용은 다음과 같다.

① **연구산물의 지적소유권 확보:** 본 과제를 통해 확보되는 유전자 혹은 형질전환체에 대한 지적소유권의 확보를 우선으로 한다. 유전자에 대한 지적소유권은 본 사업에서 적용하는 콩과 유채뿐만 아니라 타 바이오에너지 작물 혹은 식량, 원예, 화훼 작물 등 폭 넓은 적용 스펙트럼을 가지므로 그 부가 가치는 엄청날 것으로 판단된다. 지적소유권의 기술이전에 대한 기술 마케팅은 사업의 신속성 등을 고려하여 주관기관인 제노마인(주)에서 사업화를 우선 진행할 것이다.

② **기술이전:** 본 과제를 통하여 발굴된 생산성 증대 관련 유전자와 바이오디젤 생산용 우량 작물 형질전환체에 대한 지적소유권에 대한 기술이전은 우선적으로 SK, (주)창해 등과 같은 국내 바이오에너지 기업을 대상으로 한다. 국외로는 BASF, 몬산토, 신젠타 등과 같은 다국적 종자 기업 및 에너지 기업을 대상으로 한다. 국외에 대한 기술이전은 공동연구와 함께 기술이전이라는 package project로 추진하는 것이 보다 효율성이 높아 이에 대해 중점적으로 기술 마케팅을 수행할 예정이다. 최근 본사에서 진행한 다국적 기업인 BASF와의 유용 유전자에 대한 기술이전 협약은 본 사업에의 연구산물에 대한 기술이전에 있어 훌륭한 모델이 될 것으로 확신한다.

③ **생산성 증대 신품종 개발 및 종자 생산:** 본 사업에서 개발된 우량 형질전환체는 GM 작물 실용화 연구를 통하여 종자 생산 시스템까지 구축하고자 한다. 이러한 시스템의 구축까지는 장시간의 개발 기간이 소요되지만, 대체에너지 개발 시스템 구축으로 인한 국가 에너지 경쟁력 확보 및 고부가 가치 창출 산업이라는 경제적 효용가치로 매력적인 산업이 될 것이다. 하지만 이러한 시스템 구축을 통한 바이오디젤 작물 종자 생산은 장시간의 기술 개발 기간과 많은 개발 자금이 소모되므로 벤처기업인 제노마인(주)에서 감당하기엔 힘든 상황이다. 따라서 본사는 GM 작물의 실용화 연구에서 이벤트 선발 및 안정성/위해성 평가에 대한 부분은 국내 바이오에너지 기업과의 공동 연구를 통하여 바이오디젤 생산용 우량 품종 개발을 수행하고자 한다. 이러한 사업 추진은 고부가 가치 창출과 더불어 국내 에너지 회사의 원료 수급에 대한 자생력을 제공함으로써 국내 에너지 산업 및 농업 발전에 일조할 수 있을 것으로 판단된다.

④ 이러한 사업화 계획을 종합해보면 지적소유권의 확보를 통한 기술이전과 더불어 공동연구를 추진하는 project packaged가 가장 타당한 형태의 사업화가 될 것으로 판단된다.

#### **cf. 생산성 증대 형질의 기술개발에 대한 사업화 타당성 분석:**

- 미국의 경우, 바이오디젤 직접 생산비(자본 비용과 수익을 포함)의 대부분은 원료비로써 콩으로 바이오디젤 1갤런을 생산하기 위해서는 파운드당 20센트인 공기를 7.3 파운드가 필요하며, 콩으로 만든 바이오디젤의 원료비는 갤런당 적어도 \$1.5 수준
- Soybean oil을 주원료로 바이오디젤을 생산하는 미국의 바이오에너지 회사, SoyMor Biodiesel 사의 연간 바이오디젤 생산능력은 삼천만(30,000,000)갤런
- 미국의 바이오에너지 회사, SoyMor Biodiesel 사의 연간 바이오디젤의 원료비는 \$45,000,000

#### **본 사업을 통해 130%이상의 종자수확량 증가 콩 품종을 개발,**

- 130%의 종자수확량 증가를 가지는 형질전환체의 개발은 약 77%의 원료비 절감 효과를 가짐
- 따라서 미국의 바이오에너지 회사, SoyMor Biodiesel 사의 연간 바이오디젤의 원료비는 \$34,650,000
- 원료비 절감 효과는 연간 \$10,350,000
- 또한 단위면적당 수확량의 증가는 생산 면적의 감소와 수확 및 수송 비용 등의 생산비 절감 효과를 가짐. 그러므로 원료비 절감 효과는 보다 클 것으로 예상

**본 개발기술의 사업화는 충분한 타당성과 고부가가치 창출이 가능하리라 판단됨**

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

### 제 1 절. 바이오에너지 개발의 전 세계 기술 및 시장 동향

- 바이오에너지 시장은 2010년 약 200억 달러 규모에서 2030년 약 2,000억 달러 규모로 전체 에너지 시장의 18%까지 확대되고(TRM, [www.energy.go.kr](http://www.energy.go.kr)), 바이오에너지 수요는 2007년에 707억 리터에서 2030년경에는 56,995억 리터 수준으로 증가하여 연평균 20% 이상 성장할 것으로 전망(그림 6-1).

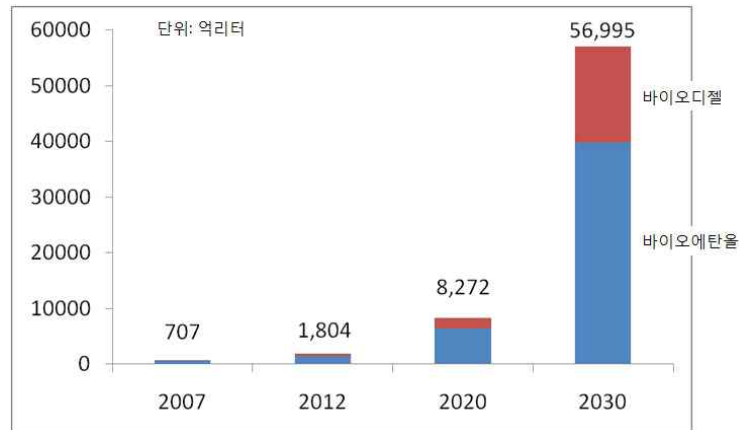


그림 6-1. 전 세계 바이오연료 수요 전망 (TRM, [www.energy.go.kr](http://www.energy.go.kr))

- 바이오디젤은 유럽이 472만 7,900톤으로 사용량이 가장 많으며, 미국이 112만 6,000톤, 아시아는 94만 4,500톤의 사용량을 기록하고 있으며, 국가 정책 추진전략이나 기술 및 연구개발 동향을 살펴보면 향후 소비량을 충족시키기 위하여 생산량을 확대할 것으로 전망됨. 바이오디젤은 에탄올과 반대양상으로 북미가 가장 적은 생산과 소비를 할 것으로 예상되며 EU는 가장 많은 생산을 하지만 수요량을 충족시키지 못할 것으로 예상됨(그림 6-2). 이러한 바이오디젤의 기하급수적 수요 증가에 따른 수요량의 부족은 향후 GM 바이오디젤 작물 개발이 이를 해결하는데 일조할 것임.

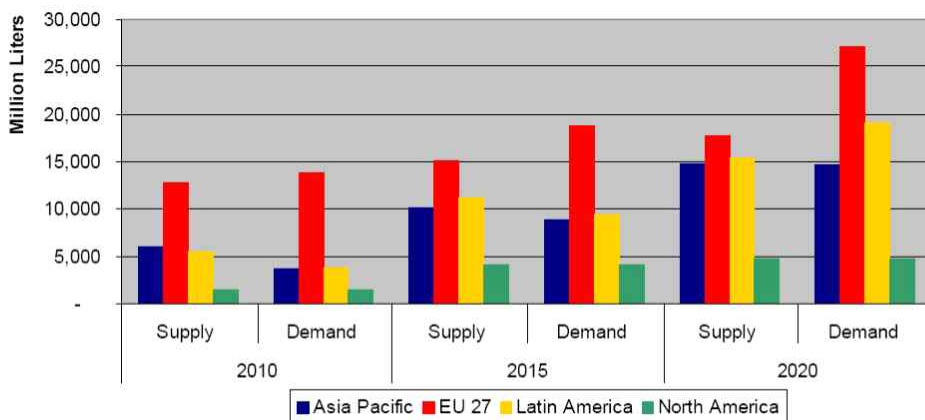


그림 6-2. 세계 바이오디젤 수급과 전망(Hart's Global Biofuel Center(2010), 신재생에너지 의무혼합제도(RFS) 도입방안 (한국석유관리원, 2010.12.17))

Country	Production [M]
DE Germany	3255 31%
US United States	1703 16%
FR France	982 9%
ID Indonesia	760 7%
BR Brazil	730 7%
IT Italy	409 4%
CN China	338 3%
AT Austria	301 3%
PT Portugal	197 2%
ES Spain	189 2%
BE Belgium	187 2%
AR Argentina	180 2%
GB United Kingdom	169 2%
MY Malaysia	150 1%
GR Greece	113 1%
- Others	898 9%
- TOTAL	10561 100%
- of which EU	6435 61%
- of which Switzerland	10 -

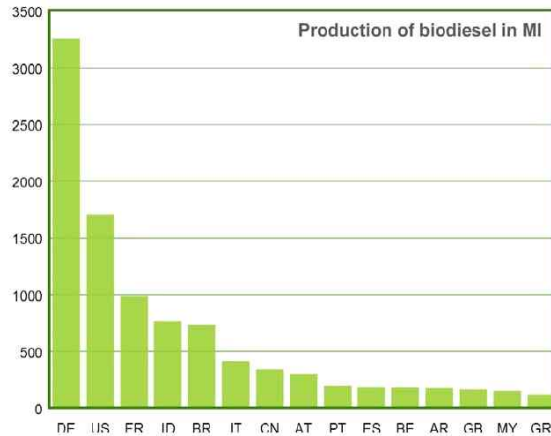


그림 6-3. 전 세계 바이오디젤 생산 동향, 주요국의 바이오에너지 산업 및 정책 동향 (2009) 이종규, 바이오인

- 바이오디젤 주요 국가별 시장 규모를 보면 독일, 미국, 프랑스, 그리고 인도네시아 순이며 (그림 6-3), 주목해야할 점은 독일의 바이오디젤 생산에 대한 정책임. 최근 독일은 2021년 까지 원자력 발전을 폐지하고 신재생에너지로 유채를 이용한 그린 에너지 사업에 집중 및 해외로 확대하여 자국의 에너지 수요 충족 및 해외 에너지 수출을 추진할 예정. 이러한 독일의 정책은 국내의 바이오디젤 생산이 어려운 현실 극복을 위하여 벤치마킹할 필요가 있을 것으로 판단됨.

**주요국 신 재생(Renewable)에너지 정책**

**영국**

2005년 4.9%인 신재생에너지 비율을 2010년 10.4%로

**호주**

정부가 가정·건물에 태양광 발전 시 1W당 4호주달러 지원

**독일**

2050년까지 신재생에너지 비율 50% 달성

**일본**

바이오에탄올을 세금감면 등 담은 '신연료이용확대기본법' 추진

**덴마크**

매년 신재생에너지 비중 늘려 2025년 30% 달성

**미국**

향후 10년간 휘발유 소비20% 감축하고 석유 소비의 15%를 에탄올 등으로 교체

그림 6-4. 전 세계 주요국의 신 재생에너지 정책

- 최근 세계 각국들은 자국의 바이오에너지 산업에 대한 세금감면, 배출가스 규제, 녹색가격 제도(green price system), 생태세(eco-tax), 화석연료부담금(fossil fuel levy tax), 재생에너지의 무할당구입제(renewables portfolio standard), 재생가능에너지 인증제(renewable certificate) 및 기후변화부담금(climate change levy) 등의 정책으로 바이오에너지 활성화를 독려하고 있으며, 주요국의 신재생 에너지 정책을 그림 11에서 소개.

○ 세계 주요 기업 및 최근 업체 동향

- VeraSun Energy Corp.와 US BioEnergy Corp.가 공동으로 투자한 벤처기업이 현재 최대 규모의 회사임. 현재 가동 중인 9개와 건설 중인 7개 등 총 16개의 바이오에탄올 생산 설비를 보유하여 2008년 말에는 바이오연료 생산량이 16억 갤런이 달함
- 스페인 식용유 및 조미료 생산기업인 Acesur사는 2007년 1,500만 유로를 투자하여 Cuenca 지방의 바이오에탄올 생산 설비를 연 5만 톤 규모로 확충함. 이에 경쟁사인 SOS Cuetara사는 2007년 자사의 식용유 공장에 연간 20만 톤 규모의 바이오디젤 설비를 도입함
- 캐나다의 IGPC(Integrated Grain Processors Co.)사는 연방정부로부터 2008년 12월 1,580만 캐나다달러를 보조받아 온타리오주 Aylmer에 바이오에탄올 공장을 설립. IGPC사의 공장은 1억5,000리터 바이오에탄올 생산이 가능하며, 이는 캐나다 연방정부의 연간 생산목표의 11%에 달하는 생산규모임
- 미국의 Exxon Mobile사는 미세조류 바이오연료 개발에 향후 5년간 6억 달러 투자계획 발표('09.07). 그 이유는 석유연료와의 유사성, 기존 인프라스트럭처 활용 가능성, 상업적 대량 생산 가능성, 탄소 배출 절감, 세계 식량난 영향 최소화 때문임
- 미국기업 Ferro Fuels사는 멕시코 Coahuila주의 Torreon시에 2억불을 투자하여 에탄올 연료와 퇴비를 생산하기로 결정함 옥수수과 사탕수수 시럽(당밀)에서 에탄올을 추출하고 남은 당밀과 찌꺼기는 소의 사료로 사용하여 복합적인 친환경 에탄올 연료와 바이오가스 생산시설을 세우겠다는 것이 최종 목표임. 이 프로젝트로 연간 3억 8,700만 리터의 에탄올을 생산할 계획임
- 조류 바이오연료를 개발하는 것에 대해 2008년 빌게이츠가 소유한 Cascade Investment가 Sapphire Energy에 1억 달러 규모의 투자 의사를 밝혔고, 2009년에는 미국 석유 메이저 Exxon Mobile이 Synthetic Genomics와 공동연구를 위해 6억 달러를 투자함. 투자를 받은 두 회사는 모두 조류를 이용해 연료를 생산하는 신생 바이오 연료 벤처기업임
- 미국, 유럽, 일본 등 선진국을 중심으로 조류로부터 바이오 연료를 개발하는 신생기업들이 늘어나는데 이어, Exxon Mobil을 포함하여 BP, Chevron, Dow와 같은 대형 기업들의 투자가 본격화 됨

○ 국내 주요 기업 및 최근 업체 동향: 바이오디젤의 증가하는 보급량에 따라 생산 업체도 증가하여 2010년 5월에는 23개 업체가 제조업을 등록하였으나 2010년 현재 정유사에 납품하는 회사는 7개사에 불과한 실정이다: SK 케미칼, 애경유화, JC 케미칼, BDK, 단석, 엠에너지, 에코솔루션. 최근 바이오에너지 개발에 대한 국내 기업의 동향은 다음과 같음.

- 삼성물산: 인도네시아에 서울시 면적의 40%인 대규모 팜 농장을 인수하고 바이오디젤 사업에 본격 진출. 인도네시아의 팜 기업인 아테나 홀딩스와 합작법인을 설립하고, 농장 인수를 위해 5,500만달러를 투자, 브라질 국영 에너지기업인 페트로브라스와 바이오에탄올 사

업협력을 위해 양해각서(MOU)를 체결

- SK 케미칼: 중국에 현지법인을 설립 자트로파 재배사업 시작, 국내 생산업체 등록을 마치고 바이오디젤 생산과 공급 시행, SK에너지와 에스오일에 바이오디젤을 제공
- GS 칼텍스: 2009년 차세대 바이오연료인 바이오부탄올 생산 균주 개발 등 가시적인 성과
- (주)에너지: 2009년 전라남도 ‘바이오유전 개발 프로젝트’의 추진을 위해 투자협약. 2013년까지 미세조류 배양장 및 오일 추출공장 등 시설투자에 635억원을 투자
- 바이오시스템즈(주): 2012년까지 연간 120만 리터의 해조류 바이오에탄올을 생산하기 위해 전남 고흥에 파일렛 플랜트를 구축 중
- 효오롱 건설: 신재생에너지 사업 강화에 나서서 국내외에서 바이오에탄올 관련 프로젝트 수주역량부터 키울 계획
- (주)창해에탄올: 바이오에탄올 생산을 위해 파푸아뉴기니에 진출하여 농장을 개발하고 있으며, 2013년에 총 12만톤의 바이오에탄올을 생산하려고 농장을 확대하고 있음
- (주)한택엔지니어링: 막분리 기술을 이용하여 고속의 바이오에탄올 발효기술과 에너지를 크게 절감시키는 바이오에탄올 농축기술을 개발하여 해외 플랜트 수출. 아시아에서 원료유 확보를 위한 농장 진출 예정

## 제 2 절. 바이오디젤 원료 작물 개발의 전 세계 기술 및 시장 동향

- 콩은 전 세계 대표적 주요 작물 중 하나로 전 세계 수출입 시장 규모는 2008년 기준 약 35,132,368천불(수출 규모)/43,754,644천불(수입규모)로 매우 큰 시장 규모를 가지고 있음 (FAOSTAT, 2011). 이러한 시장 규모는 전 세계 주용 작물 중 하나인 옥수수 시장 규모보다 오히려 큰 것으로 알려지고 있음. 그러나 한국 시장 규모는 2008년 기준 약 65천불(수출규모)/791,869천불(수입규모)로 매우 열악한 상황이며, 또한 수출에 비하여 10배 이상의 수입 규모를 가져 심각한 수출입 불균형으로 절대적으로 수입에 의존하고 있는 실정임(Table 6-1).

Table 6-1. 전 세계 콩 시장 규모와 재배 면적 및 한국의 시장 규모와 재배 면적 (FAO 통계, 2011, faostat.fao.org)

	Year	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
World	Export value (1000\$)	10772162	15577785	15583852	15789456	16134418	22934556	35132368	33105318
	Import value (1000\$)	12295313	17212345	19584314	18967770	17851012	26390203	43754644	35993409
	Area Harvested (Ha)	83637497	91593387	92519724	95276367	90131752	96441295	99372337	102386023
Korea	Export value (1000\$)	51	111	138	89	54	33	65	116
	Import value (1000\$)	317995	399203	480300	391449	321381	414664	791869	592158
	Area Harvested (Ha)	80447	85270	105421	90248	76267	75242	70265	71422

- 유럽의 대표적인 바이오디젤 원료 작물인 유채의 전 세계 수출입 시장 규모는 2008년 기준 약 9,010,492천불(수출규모)/9,786,681천불(수입규모)이며, 한국시장은 수출은 전혀 없으며 약

35천불의 수입 규모로 영세성을 면하기 힘든 실정임(Table 6-2).

- 따라서 시장규모의 기하급수적 성장 규모를 가지고 있는 콩과 유채는 바이오에너지 원료 작물의 수입 대체, 대두 수출입 안정화를 통한 시장 안정화 및 재배농가 소득증대 효과까지 제공한다는 점에서 GM 작물의 개발이 상대적으로 많은 장점을 제공하리라 판단됨.

Table 6-2. 세계 유채 시장 규모 및 재배 면적 (FAO 통계, 2011, [faostat.fao.org](http://faostat.fao.org))

Rapeseed		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Import Value (1000\$)	Republic of Korea	2	132	15	257	42	37	35
	World	1952457	2044788	2820773	2443604	3365738	4861131	9786681
Export Value (1000\$)	Republic of Korea	0	0	0	0	0	8	0
	World	1830146	2101893	2665015	2356028	3098072	4813474	9010492
Soybean		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Import Value (1000\$)	Republic of Korea	317995	399203	480300	391449	321381	414664	791869
	World	12295313	17212345	19584314	18967770	17851012	26390203	43754644
Export Value (1000\$)	Republic of Korea	51	111	138	89	54	33	65
	World	10772162	15577785	15583852	15789456	16134418	22934556	35132368

### 제 3 절. 유전자 변형 작물 개발의 전 세계 기술 및 시장 동향

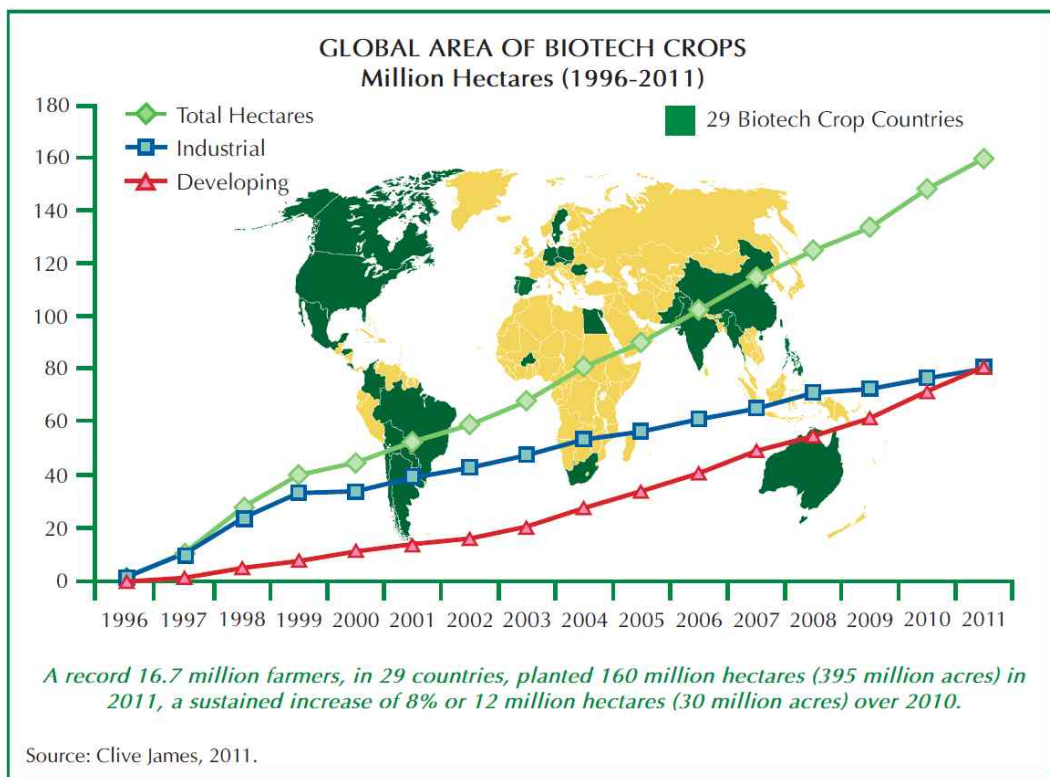


그림 6-5. Global Area of Biotech Crops (Clive James, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011, ISAAA)



- 유전자 변형 작물 재배규모가 1996년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있고 최근의 바이오에너지 작물 개발이 지속적으로 진행된다면 그 시장 규모는 기하급수적으로 증가할 것으로 추정됨(그림 6-5).
- 전 세계적으로 GM 콩 재배 면적이 기하급수적으로 증가함. 1997년 GM 콩의 점유율은 전체 콩 재배면적의 7.6%를 나타내었으나 2008년에는 GM 콩의 점유율이 72%를 차지함. 미국에서도 마찬가지로 1997년 GM 콩의 점유율은 전체 콩 재배면적의 4%에 불과하였으나 2008년에는 GM 콩의 점유율이 92%를 차지함. 따라서 GM 콩 개발은 콩 시장 및 재배 규모로 봤을 때, 선택이 아닌 필수 사항인 것으로 판단됨.

## 제 7 장 참고문헌

- Aravind L and Landsman D** (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **19**, 4413-4421.
- Boccalandro HE, Ploschuk EL, Yanovsky MJ, Sanchez RA, Gatz C and, Casal JJ** (2003) Increased phytochrome B alleviates density effects on tuber yield of field potato crops. *Plant Physiol* **133(4)**, 1539-46.
- Boszoradova E, Libantova J, Matusikova I, Poloniova Z, Jopcik M and Moravcikova J** (2011) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of economically important oilseed rape plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **107**, 317-323.
- Gan, S and Amasino, RM** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.
- Guame't JJ, Teeri JA, Noode'n LD** (1990) Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean. *Plant and Cell Physiology* **31**, 1123-130.
- He C, Yan J, Shen G, Fu L, Holaday AS, Auld D, Blumwald E and Zhang H** (2005) Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant Cell Physiol.* **46(11)**, 1848-54.
- 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, Lee HJ, Go YS, Roh KH, Lee YH, Jang YS and Suh MC** (2010) Development of herbicide-tolerant Korean rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars. *J. Plant Biotechnol* **37**, 319-326.
- 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**, 814-19.
- Koch E and Slusarenko A** (1990) *Arabidopsis* is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell* **2(5)**, 437-45.
- Lee SI, Kim YH, Lee DH, Lee YM, Park SJ and Kim JB** (2010) Current status of tissue culture and genetic transformation systems in oilseed rape plants (*Brassica napus* L.). *J. Plant Biotechnol* **37**, 379-387.
- Li DY, Inoue H, Takahashi M, Kojima T, Shiraiwa M and Takahara H** (2008) Molecular characterization of a novel salt-inducible gene for an OSBP (oxysterol-binding protein)-homologue from soybean. *Gene* **407**, 12-20
- Li G, TC Hall and R Holmes-Davis** (2002) Plant chromatin: development and gene control. *BioEssays* **24**, 234-243.
- Li X, Gan R, Li P, Ma Y, Zhang L, Zhang R, Wang Y and Wang NN** (2006) Identification and functional characterization of a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene that is involved in regulation of soybean leaf senescence. *Plant Mol Biol* **61**, 829-44
- Lichtenthaler H and Wellburn AR** (1983). Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* **603**, 591-93.

- Lim PO and Nam HG** (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Curr Top Dev Biol* **67**, 49–3.
- Lim PO, Kim Y, Breeze E, Koo JC, Woo HR, Ryu JS, Park DH, Beynon J, Tabrett A, Buchanan-Wollaston V and Nam HG** (2007) Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants. *The Plant Journal* **52**, 1140-1153.
- Lim PO, Woo HR and Nam HG** (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **8**, 272–78.
- Lin C, Li HP, Qu B, Huang T, Tu JX, Fu TD and Liao YC** (2010) Chloroplast transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) by particle bombardment of cotyledons. *Plant Cell Rep* **29**, 371-381.
- Liu HB, Guo X, Naeem MS, Liu D, Xu L, Zhang W, Tang G and Zhou W** (2011) Transgenic *Brassica napus* L. lines carrying a two gene construct demonstrate enhanced resistance against *Plutella xylostella* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **106**, 143-151.
- Maheshwari P, Selvaraj G and Kovalchuk I** (2011) Optimization of *Brassica napus* (canola) explant regeneration for genetic transformation. *New Biotechnol* **29(1)**, 144-155
- Malik MA, Cheema MA, Khan HZ and Wahid MS** (2006) Growth and yield response of soybean (*Glycine max* L.) to seed inoculation and varying phosphorus levels. *J Agric Res* **44(1)**, 47-54
- 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**, 200–07.
- Oh SA, Lee SY, Chung IK, Lee CH and Nam HG** (1996) A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **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.
- Otegui MS, Noh YS, Martí'nez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM and Guamet JJ** (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Journal* **41**, 831-844
- 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.
- Street IH, Shah PK, Smith AM, Avery N and Neff MM** (2008) The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Plant J* **54**, 1-14.
- Street IH, Shah PK, Smith AM, Avery N and Neff MM** (2008) The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **54**, 1-4
- 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 R, Desveaux D, Spickler C, Michnick SW, and Brisson N (2001) Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 769-772.
- 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. *The Journal of Neuroscience* **25(11)**, 2838-852
- Sun J, Jiang H, Xu Y, Li H, Xie Q and C Li (2007) The CCCH-Type Zinc Finger Proteins AtSZF1 and AtSZF2 Regulate Salt Stress Responses in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **48(8)**, 1148–158 (2007)
- Tang GX, Knecht K, Yang XF, Qin YB, Zhou WJ and Cai D (2011) A two-step protocol for shoot regeneration from hypocotyl explants of oilseed rape and its applications for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biol Plant* **55(1)**, 21-26
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y and Collinge DB (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barleypowdery mildew interaction. *Plant J* **11**, 1187–194
- Wang J, Chen L, Liu Q, Sun SSM, Sokolov V and Wang YP (2011) Transformation of LRP gene into *Brassica napus* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* to enhance lysine content in seeds. *Russian J of Genet* **47**, 1433-1437.
- 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 (2010) 식물의 수명 연장 기능 및 스트레스 내성 기능을 가지는 GSDL2 단백질, 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2010-0030394, (출원인; 제노마인(주))
- 이동희, 김국진, 이인철, 김동수 (2010) 식물체의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2010-0010652 (출원인; 제노마인(주))
- 이동희, 이인철, 김국진 (2011) 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0038932, (출원인; 제노마인(주))
- 이동희, 이인철, 김국진, 김동수 (2011) 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0038929, (출원인; 제노마인(주))
- 이동희, 이인철, 김국진, 김동수, 박경목 (2011) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0110593, (출원인; 제노마인(주))
- 이동희, 이인철, 김국진, 김동수, 박경목 (2012) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2012-0016951 (출원인; 제노마인(주))

## 【부록 1】 국내특허출원 (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】

【0001】 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】

【0002】 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 전략이라 보고 있다(Buchanan-Wollaston et al., Plant Biotechnology Journal 2003, 1:3-22.; Lim and Nam, Curr. Top. Dev. Biol. 2005, 67:49-83).

【0003】 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.

【0004】 이러한 학문적, 산업적 측면에서의 중요성 때문에 식물의 노화 조절에 대한 연구가 활발하게 이루어져 왔다.

【0005】 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).

【0006】 또한 노화 진행시 과발현되는 유전자로서 WRKY53 유전자(Miao et al., Plant Mol. Biol. 2004, 55:853-867), AtNAP 유전자, GmSARK 유전자 등의 보고 되어 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.

【0007】 본 발명도 작물의 생산성 등의 향상을 가져올 수 있는 노화 지연 등의 기능을 가지는 유전자 등을 개시한다.

#### 【발명의 내용】

##### 【해결하고자 하는 과제】

【0008】 본 발명의 목적은 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 노화 지연 기능을 가지며 스트레스 내성 기능을 가지는 ATPG3 단백질을 제공하는 데 있다.

【0009】 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 제공하는 데 있다.

【0010】 본 발명의 또 다른 목적은 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

【0011】 본 발명의 또 다른 목적은 생산량 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

【0012】 본 발명의 또 다른 목적은 스트레스 내성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

【0013】 본 발명의 기타의 목적은 이하에서 제시될 것이다.

##### 【과제의 해결 수단】

【0014】 본 발명은 일 측면에 있어, 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 노화 지연 기능을 가지며 스트레스 내성 기능을 가지는 ATPG3 단백질에 관한 것이다.

【0015】 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.

【0016】 이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이 식물체의 노화를 지연시키고 식물의 생산성을 증대시키는 데 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

【0017】 본 발명자들은 상기 유전자를 ATPG3(AT-hook protein of Genomine 3) 유전자 및 ATPG3 단백질로 명명하였

으며, 이들 엮기 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 및 2에 개시되어 있다.

【0018】 본 발명의 ATPG3 단백질은 하기 (a), (b) 및 (c)의 폴리펩티드들 중 하나이다.

【0019】 (a) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드;

【0020】 (b) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드; 및

【0021】 (c) 상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드.

【0022】 본 명세서에서, "단백질"이라는 용어는 폴리펩티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용되며, "유전자"라는 용어는 폴리뉴클레오티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용된다.

【0023】 본 명세서에서, "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교하였을 때 여전히 식물 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분한 정도의 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로서 정의된다. 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분하면 되므로, 상기 폴리펩티드의 길이 그리고 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도는 문제되지 않는다. 즉 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 활성이 낮더라도, 여전히 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 폴리펩티드라면 그 길이가 어떻든 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"에 포함된다는 것이다. 당업자라면, 즉 본 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 엮기서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 개시하고 있고 나아가 서열번호 1의 엮기서열에 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.

【0024】 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. 그러나 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 아미노

산, 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 가지는 것을 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 폴

리펩티드에 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.

**【0025】** 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.

**【0026】** 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.

**【0027】** 본 발명은 또 다른 측면에 있어, 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

**【0028】** 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.

**【0029】** 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 식물체에 비하여 지연되거나 식물체의 엽록소 함량이 야생형 식물체에

비하여 많거나 식물체의 광합성 효율이 야생형 식물체 비하여 높은 특성 말한다.

**[0030]** 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.

**[0031]** 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 스위치 그라스, 억새, 갈대 등과 같은 바이오에너지 작물과 기타 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립 등이 포함될 것이다.

**[0032]** 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 서열 번호 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.

**[0033]** 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.

**[0034]** 본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 있어서, 상기 단계 (a)는 유전공학적 방법으로 수행될 수 있다.

**[0035]** 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.

**[0036]** 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.

**[0037]** 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.

**[0038]** 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.

**[0039]** 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), 베타 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 서브유닛에서 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) 베타 글루테린(glutelin) 프로모터, 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 등을 들 수 있다.

**[0040]** 전사 종결 서열은 poly(A) 첨가 신호(polyadenylation signal)로 작용하는 서열로서 전사의 완결성 및 효율성을 높이기 위한 것이다. 사용될 수 있는 전사 종결 서열의 예로는 노팔린 신타아제(NOS) 유전자의 전사 종결 서열, 베타  $\alpha$ -아밀라아제 RAmy1 A 유전자의 전사 종결 서열, 아그로박테리움 투메파시엔스의 옥토파인(Octopine) 유전자의 전사 종결 서열, 밀 열 쇼크 단백질 17의 전사 종결 서열, 밀 유비퀴틴 유전자의 전사 종결 서열, 베타 글루테린 유전자의 전사 종결 서열, 베타 락테이트 디하이드로게나제 유전자의 전사 종결 서열 등을 들 수 있다.

**[0041]** 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 아테노신 데아미나제의 유전자, 디히드로플레이트 리덕타제의 유전자, 하이그로마이신-B-포스포트랜스퍼라제의 유전자, 티미딘 키나제의 유전자, 크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제의 유전자, 포스핀노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자 등을 들 수 있다.

**[0042]** 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 유전자에

는 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.

**[0043]** 한편, 외래성 유전자로 식물을 형질전환시키는 방법은 당업계에서 공지된 방법을 사용할 수 있는데, 예컨대 유전자 총을 사용한 직접적인 유전자 전달 방법, 프로탈 딥(floral dip)을 이용한 in planta 형질전환 방법, 화분 매개 형질전환 방법, 원형질체의 형질전환 방법, 바이러스 매개 형질전환 방법, 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), 국제 특허 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. pp169-178) 등에 개시된 방법을 사용할 수 있다.

**[0044]** 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이, 형질전환된 아그로박테리움으로 유식물체, 식물 종자 등을 감염시키는 방법이다.

**[0045]** 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.

**[0046]** 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.

**【0047】** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

**【0048】** 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.

**【0049】** 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.

**【0050】** 상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적인 방법에 대해서는 상기 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

**【0051】** 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.

**【0052】** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 스트레스 내성 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

**【0053】** 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.

**【0054】** 본 명세서에서, "스트레스"는 가뭄 스트레스 및/또는 산화적 스트레스를 의미한다.

**【0055】** 상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적인 방법에 대해서는 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

**【0056】** 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.

**【0057】** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체의 노화를 지연시키는 방법에 관한 것이다.

**【0058】** 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.

**【0059】** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체의 생산성 증대 방법에 관한 것이다.

**【0060】** 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.

**【0061】** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

**【0062】** 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 발현 벡터에 삽입시키고 (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.

**【0063】** 상기 방법들에서 상기 (a) 및 (b) 단계는 상기 본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

**【0064】** 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.

**【0065】** 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.

**【0066】** 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.

**【0067】** 바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG3 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 ATPG3이 도입되어 과발현됨으로써 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환

식물체이다.

**【0068】** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 스트레스 내성식물체의 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.

**【0069】** 바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG3 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 ATPG3이 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체이다.

**【0070】** 본 명세서에서, 상기 "형질전환 식물체"는 성숙한 식물로 발육성장할 수 있는 식물 세포, 식물 조직, 또는 식물 종자에 상기 유전자가 도입되어 형질전환된 경우뿐만 아니라 형질전환된 식물과의 교배에 의해 얻어지는 계능이 변형된 식물체, 식물 종자, 식물 세포를 포함한다.

#### 【발명의 효과】

**【0071】** 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 또한 노화 지연과 스트레스 내성 기능을 가지는 ATPG3 단백질을 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】

**【0072】** 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-8의 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-8의 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-8의 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-8의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, ACT2를 PCR 양성 대조구로 사용하였다. CAB2는 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자이고, SEN4 및 SAG12는 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-8의 3-4번 좌업을 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-8의 3-4번 좌업을 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-8의 3-4번 좌업을 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-8의 3-4번 좌업을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, ACT2를 PCR 양성 대조구로 사용하였다. CAB2, SEN4, 그리고 SAG12는 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-8을 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-8을 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-8의 3-4번 좌업을 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-8의 3-4번 좌업을 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-8의 3-4번 좌업을 detach하여 6일간 H2O2를 처리한 잎의 광합성 효율 변화를 Fv/Fm로 도시한 그림이다.

#### 【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0073】 이하 본 발명의 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

【0074】 <실시예 1> 애기장대로부터 식물의 생산성 증대와 노화 지연을 조절하고 또한 스트레스 내성을 제공하는 ATPG3 유전자의 분리

【0075】 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 또한 노화 지연과 스트레스 내성기능을 가지는 ATPG3 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다.

【0076】 <실시예 1-1> 애기장대의 재배 및 배양

【0077】 애기장대는 도양을 담은 화분에서 재배하거나, 2% 수크로즈(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.

【0078】 <실시예 1-2> RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

【0079】 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.

【0080】 <실시예 1-3> 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 또한 노화 지연과 스트레스 내성을 제공하는 ATPG3 유전자 분리

【0081】 애기장대의 AT-HOOK MOTIF NUCLEAR-LOCALIZED PROTEIN (GeneBank accession number NP\_567432.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 PacI의 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 XbaI의 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 <실시에 1-2>에서 제조된 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

【0082】 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).

【0083】 <실시에 2> ATPG3 유전자에 대한 센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 노화에 대한 특성 분석

【0084】 <실시에 2-1> ATPG3 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

【0085】 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.

【0086】 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.

【0087】 한편, 도 1은 pCSEN 벡터에 ATPG3 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-ATPG3 재조합 벡터를 도시한 그림이다. 도 1에서 BAR는 바스타 제조제에 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.

【0088】 상기 pCSEN-ATPG3 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션

(electroporation) 방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28℃에서 O.D.600값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25℃에서 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 10<sup>4</sup> 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.

【0089】 <실시에 2-2> T2 형질전환 애기장대의 특성 분석

【0090】 상기 <실시에 2-1>에서와 같이 형질전환된 애기장대에서 수확한 종자는 0.1% 바스타(Basta) 제조제(경농, 한국) 용액에서 30분 동안 침지시키고 배양함으로써 선별하였다. 이후 형질전환된 애기장대의 생육 동안 상기 화분에 바스타 제조제를 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.

【0091】 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℃)한 T2 형질전환 종자를 화분에서 재배한 후 바스타 제조제 처리를 통하여 T2 형질전환 애기장대를 선별하였다.

【0092】 선별된 애기장대 T2 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(도 2).

【0093】 pCSEN-ATPG3 구성체를 가지고 있는 ATPG3 ox-1, ATPG3 ox-2와 ATPG3 ox-8 변이체 라인은 애기장대 대조군(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 표현 형질뿐만 아니라 개체 크기와 종자 생산량에서도 애기장대 야생형에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다. 이러한 노화 지연 현상과 생산성 증대는 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 도 3에서 나타나듯이 유전자의 과발현이 라인마다 조금씩

차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다.

**【0094】** 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-2와 ATPG3 ox-8 변이체의 잎으로부터 RNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하여 전체 RNA를 각각 추출하였다. 각각 1 $\mu$ g의 RNA를 주형으로 하고, Superscript III Reverse Transcriptase(INVITROGEN, USA)을 이용하여 65 $^{\circ}$ C에서 5분; 50 $^{\circ}$ C에서 60분; 및 70 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C에서 2분간 가열하여 주형 DNA를 변성시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분; 55 $^{\circ}$ C에서 1분 30초; 및 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72 $^{\circ}$ 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-2와 ATPG3 ox-8 변이체의 ATPG3 유전자의 발현이 전체적으로 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 ATPG3 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

**【0095】** ATPG3 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 ATPG3 ox-1, ATPG3 ox-2와 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-1과 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 ATPG3은 우량 생산성 증대 작물 개발에 있어 훌륭한 유전자 원으로 활용할 수 있을 것이다.

**【0096】** **【표 1】** ATPG3 유전자와 ACT2 유전자 발현을 위한 프라이머 서열 및 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	ATPG3	CACCGCCGAGAAATGGTAGTA(서열번호 6)/ GATGGGGGCGCAIATTGTAG(서열번호 6)
2	ACT	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC(서열번호 7)/ CACCGCAAAAACAGCCCTTC(서열번호 8)

**【0097】** 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 이루어 짐을 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.

**【0098】** <실시에 3> ATPG3 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석

**【0099】** 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.

**【0100】** 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.

**【0101】** 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.

**【0102】** 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 수확 시기에 대한 문제점을 최소화할 수 있다는 것이다.

**【0103】** 이러한 결과를 종합해보면, APTG3 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.

**【0104】** <실시에 4> ATPG3 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석

**【0105】** ATPG3 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T2 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rose leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

**【0106】** <실시에 4-1> ATPG3 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 잎의 표현형적 변화

**【0107】** 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 담당하리라고 판단된다.

**【0108】** <실시에 4-2> ATPG3 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 엽록소 함량 변화

**【0109】** 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.

**【0110】** <실시에 4-3> ATPG3 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 광합성 효율 변화

**【0111】** 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.

**【0112】** 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-2와 ATPG3 ox-8의 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.

**【0113】** <실시에 4-4> ATPG3 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 노화관련 유전자의 발현 변화

**【0114】** 야생종과 ATPG3 ox-1, ATPG3 ox-2와 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.

**【0115】** 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.

**【0116】** 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 대조구로는 ACT2 유전자를 사용하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 2에서 제시하였다.

**【0117】** 【표 2】 노화 관련 유전자의 발현을 위한 프라이머 서열번호

No.	유전자명	경향성/역향성 프라이머(서열번호)
1	CAB2	CCGAGGCTGCTTACCCC (서열번호 9)/ AACTCAGCGAAGGCTCTGG (서열번호 10)
2	SEN4	CGTCGATGACACACCCATTAGAG (서열번호 11)/CATGGCTGTCTTTGGAAC (서열번호 12)
3	SAG12	ACGATTTGGCTGCGAAGG (서열번호 13)/ TCAGTTGTCAAGCCGCGAG (서열번호 14)
4	ACT2	ATGGCCGATGGTGGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAAACCAGCCTTC (서열번호 8)
5	ATPG3	CACCGCCAGAACTCGTAGTA (서열번호 5)/ GATCGCGCGCATATTGAG (서열번호 6)

【0118】 야생종의 경우, CAB2(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였으나, ATPG3 과발현 변이체들은 CAB2의 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 SEN4의 발현은 야생종에서는 28일째 발현이 최대로 증가하는 반면, ATPG3 과발현 변이체들은 노화 초기 과정에서는 SEN4의 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.

【0119】 <실시에 4-5> ATPG3 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

【0120】 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(rossette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액 (2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 상기 <실시에 4-1 내지 4-4>와 동일한 방법으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

【0121】 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-2와 ATPG3 ox-8의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 보이며(도 10), 암 처리에 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).

【0122】 또한, 노화 지표 유전자인 SEN4와 SAG12, 그리고 광의존적 유전자인 CAB2의 발현을 상기 <실시에 4-4>와 동

일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 도 13에 도시된 바와 같이, 야생형에 비하여 ATPG3 변이체들은 CAB2의 발현 감소는 유사하였으나 SAG12의 발현은 지연되고, SEN4의 발현율은 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 보아 ATPG3 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

【0123】 <실시에 5> ATPG3 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석

【0124】 <실시에 5-1> ATPG3 과발현 변이체의 가뭄 스트레스에 대한 특성 분석

【0125】 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 ATPG3이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

【0126】 <실시에 5-2> ATPG3 과발현 변이체의 H2O2 스트레스에 대한 특성 분석

【0127】 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 ATPG3이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

【0128】 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 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

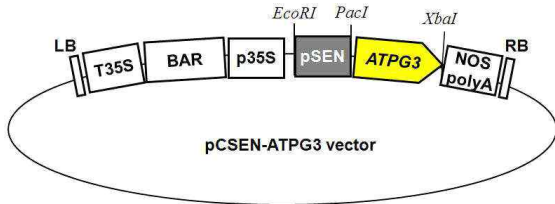
생산성이 증대되는 특성을 보일 뿐만 아니라 노화 지연 특성과 스트레스 내성 특성도 보인다.

【대표도】

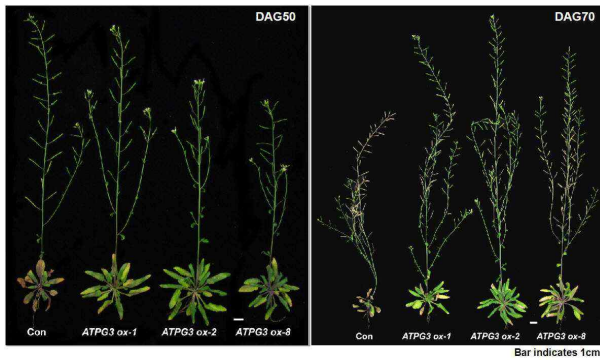
도 1

【도면】

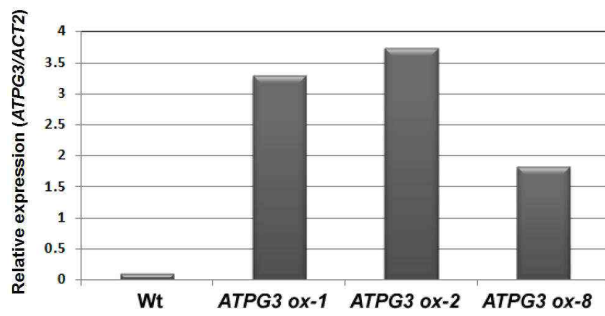
【도 1】



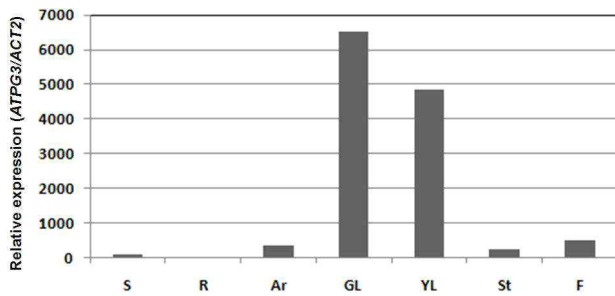
【도 2】



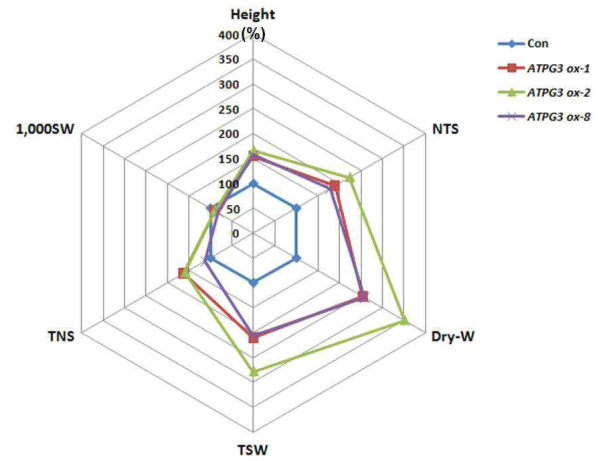
【도 3】



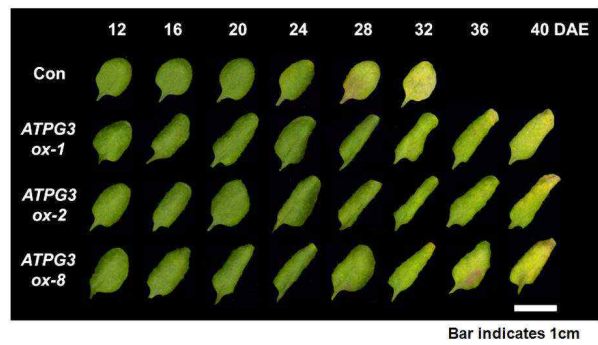
【도 4】



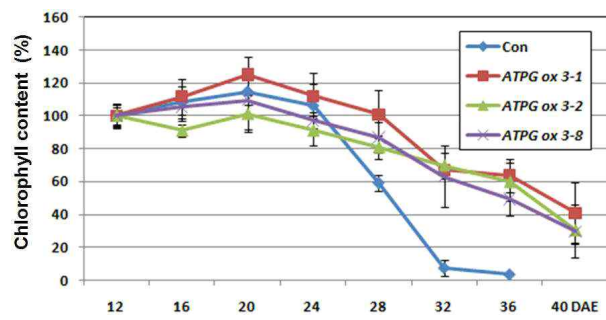
【도 5】



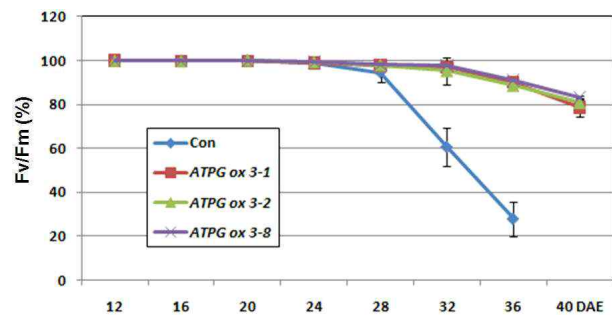
【도 6】



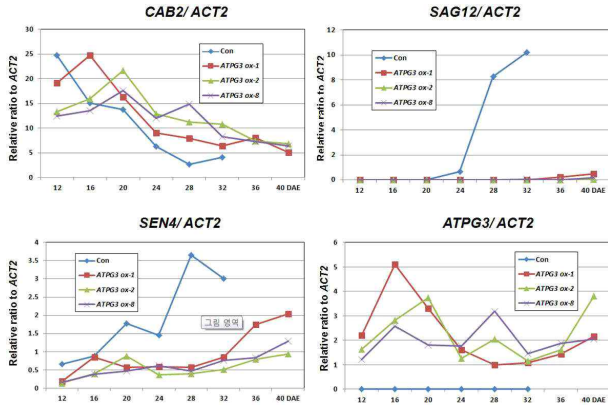
【도 7】



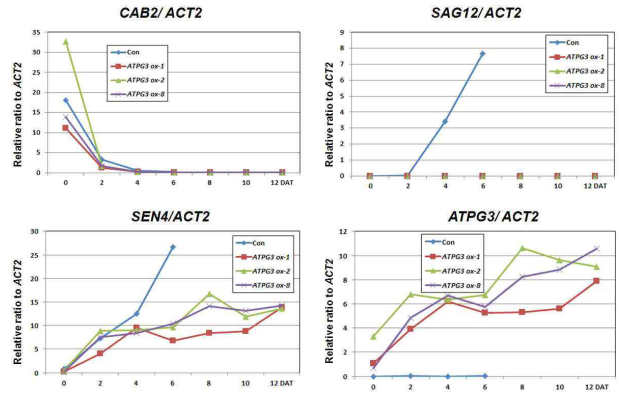
【도 8】



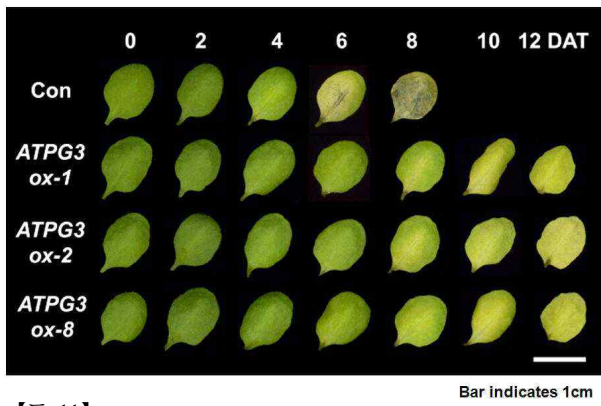
【도 9】



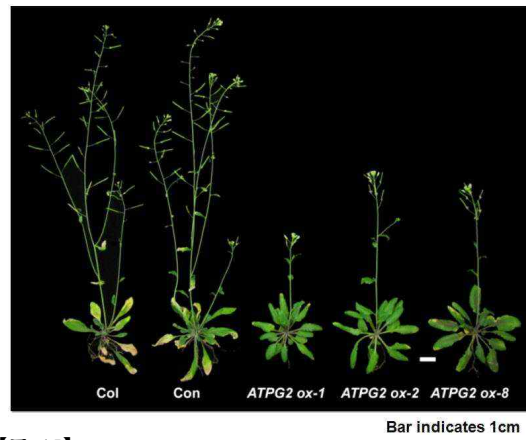
【도 13】



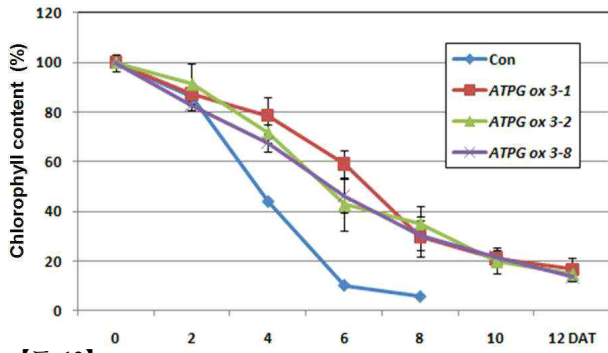
【도 10】



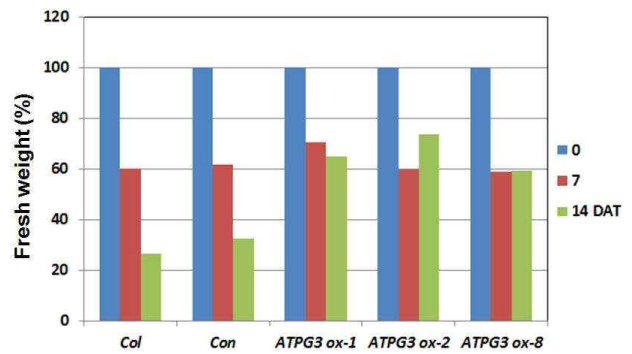
【도 14】



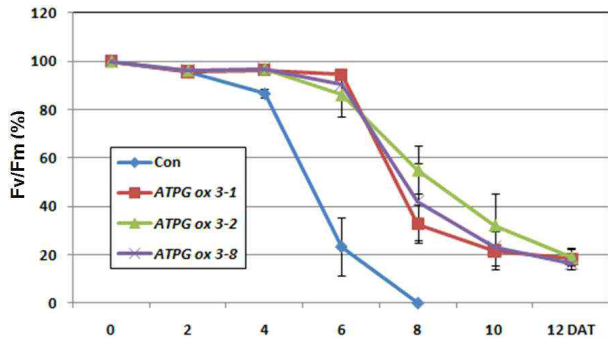
【도 11】



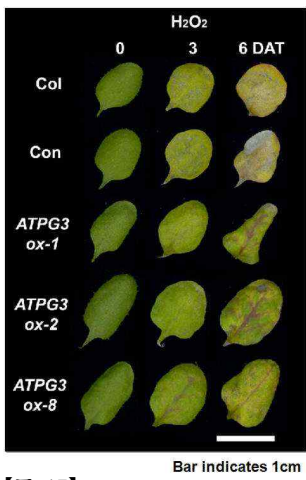
【도 15】



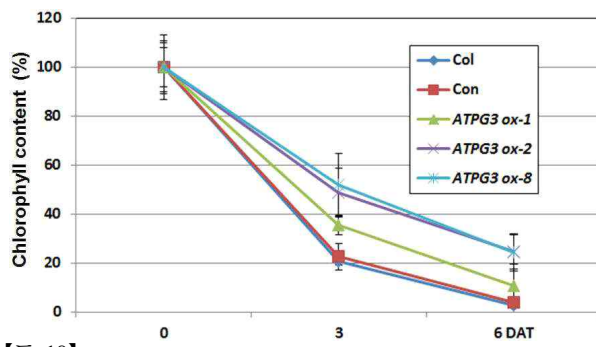
【도 12】



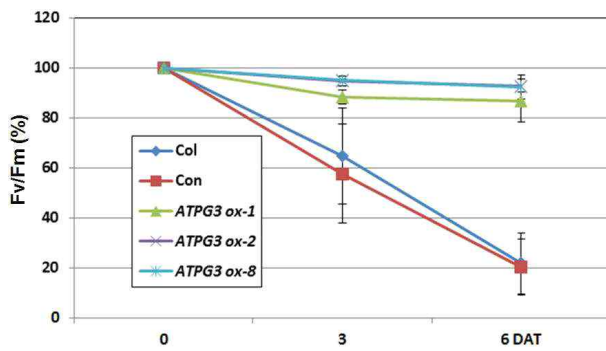
【도 16】



【도 17】



【도 18】



## 【부록 2】 국내특허출원 (10-2011-0110593)

### 【명세서】

#### 【발명의 명칭】

식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (ATPG4 Protein Delaying Senescence and Providing Yield Increase and Stress Tolerance in Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Uses 4)

#### 【기술분야】

【0001】 본 발명은 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도에 관한 것이다.

#### 【발명의 배경이 되는 기술】

【0002】 식물의 노화는 식물 발생의 마지막 단계로서, 세포, 조직, 기관 혹은 생물체 수준에서 나이-의존적 붕괴 과정이며, 성장 및 발생 단계를 거쳐 치사 단계를 유도한다. 식물은 노화가 진행됨에 따라 점차적으로 합성능력이 저하되고 세포 내 구조물과 거대분자들이 순차적으로 분해되면서 세포의 항상성을 잃게되어, 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.

【0003】 세포 구조에 있어서 노화의 초기 현상은 잎 단백질의 70% 이상을 함유하고 있는 소기관인 엽록체의 분해이다. 대사적인 측면에서 보면, 식물체내 탄소 동화작용이 엽록소와 단백질, 막 지질, 그리고 RNA와 같은 거대분자의 이화작용으로 전환되는 것을 의미한다. 노화를 통하여 증가된 이화 작용 활성은 성장 동안 동화조직인 잎에 축적된 세포성분들이 종자 혹은 다른 저장 기관의 발달을 위해 공급되는 배출성 세포 성분으로 전환되는 것을 유도한다. 따라서 식물의 노화는 세포가 퇴화하는 과정인 동시에 진화 과정 동안 환경에 적응하기 위해 능동적으로 획득한 유전형질이라고 생각되고 있다 (Buchanan-Wollaston et al., 2003; Lim and Nam, 2005; Nam, 1997)

【0004】 이와 같은 식물의 노화는 식물 호르몬 등과 같은 내적 환경요인 및 가뭄, 영양소 제한, 병원균 침투 등과 같은 외적 환경 요인에 의하여 영향을 받는다. 식물 호르몬 중 cytokinin은 생리학적으로 노화 지연 호르몬으로서 이를 이용한 노화조절 기술이 많이 보고되고 있다. Amasino 그룹은 노화 특이적인 SAG12 유전자의 promoter에 IPT 유전자를 재조합하여 노화 단계 특이적인 cytokinin 합성 조절 방법을 개발하였으며, 상기 방법으로 노화를 지연시킨 담배에서 50%의

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

【0005】 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 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).

【0006】 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).

【0007】 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).

【0008】 한편, 농업적인 측면에서 보면 식물의 노화는 식물의

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

**【0009】** 이러한 이유에서 식물 분야 생명공학 종사자들은 식물에서 수명 연장에 관여하는 유전자나 단백질 등을 찾아내고자 노력하고 있다.

#### **【발명의 내용】**

##### **【해결하고자 하는 과제】**

**【0010】** 본 발명의 목적은 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 노화 지연 기능을 가지며 스트레스 내성 기능을 가지는 ATPG4 단백질을 제공하는 데 있다.

**【0011】** 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 제공하는 데 있다.

**【0012】** 본 발명의 또 다른 목적은 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

**【0013】** 본 발명의 또 다른 목적은 생산량 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

**【0014】** 본 발명의 또 다른 목적은 스트레스 내성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

**【0015】** 본 발명의 기타의 목적은 이하에서 제시될 것이다.

##### **【과제의 해결 수단】**

**【0016】** 본 발명은 일 측면에 있어, 식물의 생산성 증대 기능을 가지고 노화 지연 기능을 가지며 스트레스 내성 기능을 가지는 ATPG4 단백질에 관한 것이다.

**【0017】** 본 발명자(들)는 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, 예기장대의 AT-HOOK MOTIF NUCLEAR-LOCALIZED PROTEIN (GeneBank accession number NP\_566232.1) 염기서열을 기초로 상기 단백질의 유전자를 분리하고 상기 유전자를 예기장대에 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.

**【0018】** 이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이 식물체의 노화를 지연시키고 식물의 생산성을 증대시키는 데 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

**【0019】** 본 발명자들은 상기 유전자를 ATPG4(AT-hook protein of Genomine 4) 유전자 및 ATPG4 단백질로 명명하였으며, 이들 염기 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 및 2에 개시되어 있다.

**【0020】** 본 발명의 ATPG4 단백질은 하기 (a), (b) 및 (c)의 폴리펩티드들 중 하나이다.

**【0021】** (a) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드;

**【0022】** (b) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드; 및

**【0023】** (c) 상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드.

**【0024】** 본 명세서에서, "단백질"이라는 용어는 폴리펩티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용되며, "유전자"라는 용어는 폴리뉴클레오티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용된다.

**【0025】** 본 명세서에서, "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교하였을 때 여전히 식물 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분한 정도의 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로서 정의된다. 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분하면 되므로, 상기 폴리펩티드의 길이 그리고 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도는 문제되지 않는다. 즉 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 활성이 낮더라도, 여전히 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 폴리펩티드라면 그 길이가 어떻든 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"에 포함된다는 것이다. 당업자라면, 즉 본 출원서를 기준으로 공지된 관련 선행기술을 숙지하고 있는 자라면, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 일부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 여전히 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유할 것이라고 기대할 것이다. 그러한 폴리펩티드로서 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실된 폴리펩티드를 들 수 있다. 그것은 일반적으로 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 가진다고 당업계에 공지되어 있기 때문이다. 물론 경우에 따라서는, N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 단백질의 기능 유지에 필수적이어서 N-말

단 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.

**[0026]** 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 보유하지만 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 가지는 것을 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.

**[0027]** 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.

**[0028]** 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.

**[0029]** 본 발명은 또 다른 측면에 있어, 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

**[0030]** 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 선

별하는 단계를 포함하여 구성된다.

**[0031]** 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 식물체에 비하여 지연되거나 식물체의 엽록소 함량이 야생형 식물체에 비하여 많거나 식물체의 광합성 효율이 야생형 식물체에 비하여 높은 특성 말한다.

**[0032]** 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.

**[0033]** 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, 갯 등), 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나 등이 포함될 것이고, 기타 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립 등이 포함될 것이다.

**[0034]** 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 서열 번호 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.

**[0035]** 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.

**[0036]** 본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 있어서, 상기 단계 (a)는 유전공학적 방법으로 수행될 수 있다.

**[0037]** 유전공학적 방법은 (i) 상기 서열번호 1의 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결 되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계, 및 (ii) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하여 구성된다.

**[0038]** 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.

**[0039]** 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.

**[0040]** 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.

**[0041]** 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 예로

는 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 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.

**[0042]** 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  $\alpha$ -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.

**[0043]** 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 아테노신 데아미나제의 유전자, 디히드로플레이트 리덕타제의 유전자, 하이그로마이신-B-포스포트랜스퍼라제의 유전자, 티미딘 키나제의 유전자, 크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제의 유전자, 포스핀노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자 등을 들 수 있다.

**[0044]** 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 유기체에 서는 존재하지 않는 유전자를 말한다. 예컨대 애기장대 유래 유전자는 애기장대 식물에게는 동종성 유전자이지만 토마토 식물에서는 이종성 유전자가 된다.

【0045】 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), 국제 특허 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. pp169-178) 등에 개시된 방법을 사용할 수 있다.

【0046】 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이, 형질전환된 아그로박테리움으로 유식물체, 식물종자 등을 감염시키는 방법이다.

【0047】 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.

【0048】 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.

【0049】 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

【0050】 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.

【0051】 본 명세서에서, "생산성 증대 특성"이란 식물체의 전체, 줄기, 뿌리 및/또는 잎의 생체량(biomass; 크기 및/또는 질량이 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.

【0052】 상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적인 방법에 대해서는 상기 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

【0053】 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.

【0054】 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 스트레스 내성 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

【0055】 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.

【0056】 본 명세서에서, "스트레스"는 가뭄 스트레스 및/또는 산화적 스트레스를 의미한다.

【0057】 상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적인 방법에 대해서는 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

【0058】 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.

【0059】 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체의 노화를 지연시키는 방법에 관한 것이다.

【0060】 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.

【0061】 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체의 생산성 증대 방법에 관한 것이다.

【0062】 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.

【0063】 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

【0064】 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 발현 벡터에 삽입시키고 (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.

【0065】 상기 방법들에서 상기 (a) 및 (b) 단계는 상기 본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

【0066】 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법에 의하여 얻어진, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열 번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자가 과발현된 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

【0067】 바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG4 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자로 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

【0068】 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.

【0069】 바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2

의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG4 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 ATPG4이 도입되어 과발현됨으로써 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

【0070】 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.

【0071】 바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG4 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 ATPG4이 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체이다.

【0072】 본 명세서에서, 상기 "형질전환 식물체"는 성숙한 식물로 발육·성장할 수 있는 식물 세포, 식물 조직, 또는 식물 종자에 상기 유전자가 도입되어 형질전환된 경우뿐만 아니라 형질전환된 식물과의 교배에 의해 얻어지는 계놈이 변형된 식물체, 식물 종자, 식물 세포를 포함한다.

#### 【발명의 효과】

【0073】 진술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질을 그 유전자를 제공할 수 있다. 상기 유전자는 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 제공하므로, 이 유전자로 식물체를 형질전환시킬 경우, 식물의 노화를 지연시키거나 생산성을 증대시키거나 스트레스 내성을 가지는 식물체를 제작할 수 있다.

#### 【도면의 간단한 설명】

【0074】 도 1은 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성기능을 가지는 ATPG4 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터의구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 2는 상기 도 1의 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T2 라인을 발아 후 50일과 70일 동안 생육시킨 애기장대의 사진이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조군

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

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

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

도 3은 상기 도 1의 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T2 라인을 자엽 생성 후 20일 동안 생육시킨 애기장대의 ATPG4 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

Wt: 애기장대 야생형

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

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

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

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

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

도 5는 상기 도 3의 애기장대 라인의 생산성 증대에 대한 그림이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

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

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

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

Height: 키, NTS: 장각과 수, Dry-W: 생체 건량, TSW: 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 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5, 그리고 ATPG4 ox-7의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

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

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

도 9는 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5, 그리고 ATPG4 ox-7의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, ACT2를 PCR 양성 대조구로 사

용하였다. CAB2은 엽록소a/b 결합 단백질 유전자이고, SEN4 및 SAG12는 노화 유전자로서, 노화 마커 유전자들이다.

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

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

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

도 13은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5, 그리고 ATPG4 ox-7의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, ACT2를 PCR 양성 대조구로 사용하였다. CAB2, SEN4, 그리고 SAG12는 노화 마커 유전자이다.

도 14는 상기 도 1의 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T2 라인을 발아 후 55일 동안 생육시킨 애기장대의 사진이다.

Col-0: 애기장대 야생형

Con: 애기장대 대조구

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

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

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

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

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

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

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

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

도 15는 상기 13의 형질전환 애기장대의 T2 라인들에 대한 자엽 생성후 24일째 식물의 ATPG4 유전자의 발현 양상을

qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 16는 상기 13의 형질전환 애기장대의 T2 라인들에 대한 생산성 증대 지표로서 총 종자 수확량에 대한 그림이다.

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

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

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

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

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

#### **【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】**

**【0075】** 이하 본 발명의 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

**【0076】** <실시예 1> 애기장대로부터 식물의 생산성 증대와 노화 지연을 조절하고 또한 스트레스 내성을 제공하는 ATPG4 유전자의 분리

**【0077】** 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다.

**【0078】** <실시예 1-1> 애기장대의 재배 및 배양

**【0079】** 애기장대는 토양을 담은 화분에서 재배하거나, 2% 수크로즈(sucrose, pH 5.7)와 0.8% 아가(agar)가 포함된 MS(Murashige and Skoog salts, Sigma, USA) 배지를 넣은 페트리 디쉬에서 재배하였다. 화분에서 재배할 때는 22℃의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 성장 조절기(growth chamber)내에서 재배하였다.

**【0080】** <실시예 1-2> RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

**【0081】** 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.

**【0082】** <실시예 1-3> 식물의 생산성 증대와 노화 지연을 조절하고 또한 식물의 스트레스 내성을 제공하는 ATPG4 유전자 분리

**【0083】** 애기장대의 AT-HOOK MOTIF NUCLEAR-LOCALIZED PROTEIN (GeneBank accession number NP\_566232.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 PacI의 서열이 포함된 정방향 프라이머 (PacI/AT3G04570 SOE-F, 5'-TTA ATT AAA TGG CGA ATC CAT GGT GGA CAG -3')와 서열번호 4로 표시되고 제한효소 XbaI의 서열이 포함된 역방향 프라이머(XbaI/AT3G04570 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA AAA TCC TGA CCT AGC TTG AGC -3')를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 상기 <실시예 1-2>에서 제조된 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

**【0084】** 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 32 kDa의 분자량을 갖는 315개의 아미노산을 암호화하는 948bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 ATPG4(AT-hook protein of Genomine 4)로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 ATPG4 단백질의 등전점(isoelectric point)은 6.3으로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "ATPG4" 혹은 "ATPG4 유전자"라 하고, 단백질은 "ATPG4" 혹은 "ATPG4 단백질"이라고 한다).

**【0085】** <실시예 2> ATPG4 유전자에 대한 센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 노화에 대한 특성 분석

**【0086】** <실시예 2-1> ATPG4 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

**【0087】** 상기 유전자가 식물의 생산성 증대와 노화 지연을 조절하고 또한 식물의 스트레스 내성을 제공하는지를 확인하기 위하여 ATPG4 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 ATPG4 전사체의 발현을 변화시켰다.

**【0088】** 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 PacI의 서열이 포함된 정방향 프라이머 및 서열번호 4로 표시되고 제한효소 XbaI의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 ATPG4 cDNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 PacI과 XbaI으로 절단하고, 유도성 프로모터(inducible promoter)인 SEN1 프로모터의 조절을 받도

록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 ATPG4 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

**【0089】** 한편, 도 1은 pCSEN 벡터에 ATPG4 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-ATPG4 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.

**【0090】** 상기 pCSEN-ATPG4 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)에 일렉트로포레이션(electroporation) 방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28℃에서 O.D.600값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25℃에서 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 10<sup>4</sup>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 ATPG4 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

**【0091】** <실시예 2-2> T2 형질전환 애기장대의 특성 분석

**【0092】** 상기 <실시예 2-1>에서와 같이 형질전환한 애기장대에서 수확한 종자는 0.1% 바스타(Basta) 제초제(경농, 한국) 용액에서 30분 동안 침지시키고 배양함으로써 선별하였다. 이후 형질전환한 애기장대의 생육 동안 상기 화분에 바스타 제초제를 5회 처리한 후, 각 화분에서 형질전환된 애기장대를 선별하였다. pCSEN-ATPG4 벡터로 형질전환된 T1 애기장대는 대조군(ATPG4 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 변이체들은 뚜렷한 노화 지연 특성을 보였다.

**【0093】** 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℃)한 T2 형질전환 종자를 화분에서 재배한 후 바스타 제초제 처리를 통하여 T2 형질전환 애기장대를

선별하였다.

**【0094】** 선별된 애기장대 T2 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(도 2).

**【0095】** pCSEN-ATPG4 구성체를 가지고 있는 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7 변이체 라인은 애기장대 대조군(Con)와 비교하여 볼 때, 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.

**【0096】** 선별된 노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 ATPG4 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대 야생형과 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7 변이체의 잎으로부터 RNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하여 전체 RNA를 각각 추출하였다. 각각 1 $\mu$ g의 RNA를 주형으로 하고, Superscript III Reverse Transcriptase(INVITROGEN, USA)을 이용하여 65℃에서 5분; 50℃에서 60분; 및 70℃에서 15분의 조건으로 cDNA를 합성하였다. 이후, 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 하기 ATPG4 유전자와 PCR 양성 대조군으로 사용된 ACT 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94℃에서 2분간 가열하여 주형 DNA를 변성시킨 후, 94℃에서 1분; 55℃에서 1분 30초; 및 72℃에서 1분을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72℃에서 15분간 최종 반응시켜 수행하였다. 이후, 1% 아가로스 겔 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였으며, 그 결과는 도 3에 도시되었다. 애기장대 야생형에 비하여 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7 변이체의 ATPG4 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 ATPG4 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

**【0097】** ATPG4 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7 변이체들은 모두 대조군에 비하여 개체 크기, 종자 수확량 등의 생산성 증대 형질이 높은 것으로 나타났다. 그런데 흥미로운 사실은 유전자의 상대적 발현 정도가 가장 높은 ATPG4 ox-5 변이체는 ATPG4 ox-2와 ATPG4 ox-7 변이체에 비하여 생산성 증대에 대한 효과는 상대적으로 약한 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 생산성 증대와 노화 지연에 대한 표현형적 특징을 가진 식물을 임의로 제작할 수 있을 것으로 판단된다

**【0098】** 【표 1】

ATPG4 유전자와 ACT 유전자 발현을 위한 프라이머 서열 및 서열번호

No.	유전자명	경방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	ATPG4	CTGGGATTCTCCAAATGCT(서열번호 5)/GCTAGGGTTTGATGAGTCAGT(서열번호 6)
2	ACT	ATGGGCGATGGTGAGGATATTC(서열번호 7)/CACGAGCAAAACGAGCCTTC(서열번호 8)

**[0099]** 한편 애기장대 야생형의 ATPG4 유전자의 식물체 기관별 발현 양상을 분석하기 위하여 애기장대 야생형의 다양한 발달 단계에서 기관별 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 이를 주형으로 하여 ATPG4 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 ACT 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과는 도 4에서 도시된 바와 같이, ATPG4 유전자의 발현은 주로 잎에서 이루어지는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 줄기와 Inflorescence organ에서도 발현이 이루어 짐을 알 수 있었다. 그런 반면, 발달 초기의 유식물(seedling)과 뿌리에서는 유전자의 발현이 현저히 낮음을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자는 식물의 잎, 줄기와 Inflorescence organ에서 주로 기능을 가져 식물의 노화 조절에 관여할 것으로 판단되는 반면, 뿌리와 발달 초기의 유식물 등 식물의 발달 초기에는 기능을 거의 가지지 않은 것으로 판단된다.

**[0100]** <실시에 3> ATPG4 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석

**[0101]** ATPG4 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7의 라인별로 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다.

**[0102]** 적용된 생산성 증대 지표는 식물의 키(height), 장과과(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.

**[0103]** ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 1.5배 이상 종자 무게에 있어서 증가하는 것으로 나타났으며, 종자 1,000개의 무게에는 ATPG4 ox-2 변이체가 대조구에 비하여 1.4배 이상 증가한 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자의 발현은 종자의 개별 크기와 전체 무게에 대해 모두 증가 현상을 제공하는 것으로 사료된다. 그리고 생체량과 생체 건량에 있어서도 과발현 변이체는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상을 가졌다. 이러한 사실은 ATPG4 유전자가 노화 지연과 더불어 개체 크기, 종자 크기 및 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다(도 5). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

**[0104]** <실시에 4> ATPG4 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석

**[0105]** ATPG4 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T2 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

**[0106]** <실시에 4-1> ATPG4 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 잎의 표현형적 변화

**[0107]** 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 28일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일 이후부터 일어남을 확인할 수 있었다(도6). 이러한 사실로 미루어보아, ATPG4 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다.

**[0108]** <실시에 4-2> ATPG4 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 엽록소 함량 변화

**[0109]** 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 36일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7의 경우 자엽 생성 후 28일이 되었을 때도 측정 초기의 60% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다.

**[0110]** <실시에 4-3> ATPG4 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 광합성 효율 변화

**[0111]** 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.

**[0112]** 그 결과, 도 8에 도시된 바와 같이, 야생종은 자엽 생성 후 32일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 36일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와

ATPG4 ox-7의 경우 자엽 생성 후 36일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않다가 40일째 이후 활성 소실이 일어났다. 상기 결과로부터, ATPG4 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 ATPG4 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

**【0113】** <실시에 4-4> ATPG4 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 노화 관련 유전자의 발현 변화

**【0114】** 야생종과 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 ATPG4 유전자와 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다.

**【0115】** 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.

**【0116】** ATPG4 유전자 및 노화에 대한 마커(marker) 유전자들에 대한 정량적인 분석은 Applied Bio-systems의 7300 Real Time PCR System을 이용한 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 과정을 통해 확인하였다. 노화 마커 유전자로는 SAG12, SEN4 및 CAB2 유전자를 사용하였으며, qRT-PCR 양성 대조구로는 ACT2 유전자를 사용하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 2에서 제시하였다.

**【0117】** 【표 2】

노화관련 유전자의 발현을 위한 프라이머 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	CAB2	CGGAGGACTGTCTTACCCC (서열번호 9)/ AACTCAGGGAAGGCCTCTGG (서열번호 10)
2	SEN4	CGTCGATGACACCCATTAGAG (서열번호 11)/CATCGGCTTGTCTTTGGAAAC (서열번호 12)
3	SAG12	ACGATTTTGGCTGCGAAGG (서열번호 13)/ TCAGTTGTCAAGCCGCCAG (서열번호 14)
4	ACT2	ATGGCCGATGGTAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAAACAGCCCTTC (서열번호 8)
5	ATPG4	CTCGGATTCCTCCAAATGCT (서열번호 5)/GCTAGGGTTTCGATGACGTCAGT (서열번호 6)

**【0118】** 야생종의 경우, CAB2(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 야생종과 ATPG4 과발현 변이체들은 비슷한 감소 양상을 나타내었다. 그러나 노화의 signal로 사용되는 SAG12 발현의 경우, 야생종은 32일째 최대 발현을 나타내는 반면, ATPG4 과발현 변이체들은 36일까지 증가 현상이 거의 나타나지 않다가 40일째에도 야생종에 하여 약한 signal을 나타냈다. 그리고 식물의 노화동안 점진적으로 발현이 증가되는 것으로 알려진 SEN4의 발현은 야생종에서는 20일 이후 급격하게 증가하는 반면, ATPG4 과발현 변이체들은 노화 전 과정 동안에도 SEN4의 발현 증가가 크게 나타나지 않았다. 한편 ATPG4 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 전체적으로

ATPG4 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 발현 수준이 현저히 높으며 노화 동안 라인별로 정도의 차이는 있지만 28일 이후 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(도 9). 이러한 사실을 종합해보면 ATPG4 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

**【0119】** <실시에 4-5> ATPG4 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

**【0120】** 노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 ATPG4 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T2 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액(2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 상기 <실시에 4-1 내지 4-4>와 동일한 방법으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

**【0121】** 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 6일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 보여지며, 특히 ATPG4 ox-5와 경우 지연현상이 더욱 뚜렷함을 확인할 수 있었다(도 10). 암 처리에 의한 노화 동안 엽록소 함량과 광합성 효율 변화에 있어서도 야생종에 비하여 ATPG4 변이체들은 정도의 차이는 있지만 함량 및 활성 감소가 지연됨을 알 수 있었다(도 11과 12).

**【0122】** 또한, 노화 지표 유전자인 SEN4와 SAG12, 그리고 광의존적 유전자인 CAB2의 발현을 상기 <실시에 4-4>와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 도 13에 도시된 바와 같이, 야생형에 비하여 ATPG4 변이체들은 SAG12의 발현이 지연되고, SEN4의 발현율이 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 보아 ATPG4 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

**【0123】** <실시에 5> ATPG4 과발현으로 인한 식물 노화 지연과 생산성 증대의 상관관계 분석

**【0124】** ATPG4 과발현 정도에 따른 변이체의 노화 지연과 생산성 증대에 대한 상관관계를 분석하기 위하여, T2 세대 10 라인을 선별하여 노화 지연 및 생산성 증대에 대한 그들의 표현형적 특징, 변이체 라인들의 ATPG4 과발현 정도, 그리고 변이체 라인들의 생산성 증대를 조사하여 애기장대 대조구와



비교하였다.

**[0125]** <실시에 5-1> ATPG4 과발현 변이체의 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특성 분석

**[0126]** ATPG4 과발현 변이체의 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특성을 분석하기 위하여 <실시에 2-2>에서 분석한 T2 형질전환 애기장대 3라인 외에 추가로 5라인을 선별하여 총 8라인의 T2 형질전환 애기장대 라인과 애기장대 야생형(col-0)과 대조구(Con)의 표현형적 변화를 비교하였다. 선별된 애기장대 T2 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 55일째 수행하였다(도 14).

**[0127]** 전체적으로 ATPG4 ox-1과 ATPG4 ox-8 변이체 라인을 제외하고 나머지 6 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 노화 지연의 표현형적 특징을 가지고 있으며, 특히 ATPG4 ox-3, ATPG4 ox-4와 ATPG4 ox-6 변이체 라인들은 노화 지연의 표현형적 특징이 강력하게 나타나는 것으로 확인되었다. 그런 반면 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물의 노화 지연 현상보다 개체 크기와 silique 생산량 등의 생산성 증대에 있어서 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌다. 변이체 라인들의 이러한 표현형적 특징은 앞서 언급한 바와 같이 변이체 라인별로 유전자의 상대적 발현 정도의 차이에 기인하는 것으로 판단되며, 이를 증명하기 위하여 각 라인들에 대한 유전자 발현 정도를 분석하였다.

**[0128]** <실시에 5-2> 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특성을 가지는 ATPG4 과발현 변이체의 ATPG4 유전자 과발현 정도 분석

**[0129]** 실시예 5-1에서와 같이 노화지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특징과 ATPG4 유전자의 상대적 과발현 정도와의 상관관계를 분석하기 위하여 자엽 생성 후 24일째의 변이체의 ATPG4 유전자의 발현 양상을 조사하였다. ATPG4 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 ACT 유전자에 대해 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용한 결과는 도 15에서 도시되었다.

**[0130]** 변이체 8라인 모두 애기장대 야생형에 비하여 ATPG4 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 ATPG4 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

**[0131]** 흥미롭게도, 노화지연 표현형이 강력한 ATPG4 ox-3, ATPG4 ox-4와 ATPG4 ox-6 변이체들은 ATPG4 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 반면, 개체 크기와 silique 생산량 증가와 같은 생산성 증대의 표현형적 특징을 가지는 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7 변이체들은 모두 ATPG4 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 식물의 생산성 증대 혹은 노화지연

의 표현형적 특징을 가지는 작물을 임의적으로 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

**[0132]** <실시에 5-3> ATPG4 과발현 변이체의 ATPG4 유전자 과발현 정도와 생산성 증대에 대한 특성 분석

**[0133]** ATPG4 과발현 변이체의 ATPG4 유전자 과발현 정도와 생산성 증대에 대한 특성을 보다 정확히 분석하기 위하여 변이체 라인들의 총 종자 무게를 애기장대 야생형과 비교, 분석하였다.

**[0134]** ATPG4 ox-3, ATPG4 ox-4와 ATPG4 ox-6 변이체들에 비하여 ATPG4 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 ATPG4 ox-2, ATPG4 ox-5와 ATPG4 ox-7 변이체들은 종자 수확량에 있어서 애기장대 대조구에 비하여 1.7배 이상 증가하는 것으로 나타난 반면, 유전자의 발현 정도가 상대적으로 높은 ATPG4 ox-3, ATPG4 ox-4와 ATPG4 ox-6 변이체들은 애기장대 대조구에 비하여 1.3배 이하의 증가율, 심지어 ATPG4 ox-6 변이체는 오히려 감소율을 가지는 것으로 나타났다(도 16). 흥미로운 사실은 생산성 증대 특정 형질을 가지는 변이체 라인들의 수확 시기는 애기장대 대조구와 큰 차이가 없다는 것이다. 이러한 사실은 본 유전자의 과발현으로 인한 생산성 증대는 대조구의 수확시기가 비슷하여 작물의 수확시기에 대한 문제점을 최소화할 수 있다는 것이다.

**[0135]** 이러한 실시예 5의 결과를 종합해보면, 먼저 ATPG4 유전자의 발현 정도가 높으면 높을수록 식물의 노화지연 특징이 강력하게 나타나는 것으로 판단되며, 이러한 제안은 본 유전자의 적용은 녹기 연장을 요구하는 식물 혹은 작물에 많은 장점을 제공할 것이라 생각된다. 또한 ATPG4 유전자 발현의 적정 범위 조절은 수확시기가 대조구와 비슷한 식물의 생산성 증대 특징을 강력하게 나타내는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 발현을 조절할 수 있는 프로모터(비교적 발현이 낮은 프로모터, 유도성 프로모터, 기관 혹은 화합물 특이적 프로모터 등)를 적용하면 생산성 증대 작물 개발에 많은 장점을 제공하리라 판단된다.

**[0136]** <실시에 6> ATPG4 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석

**[0137]** <실시에 6-1> ATPG4 과발현 변이체의 가뭄 스트레스에 대한 특성 분석

**[0138]** ATPG4 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 도 17과 18에 도시되었다. 야생형 애기장대는 가뭄에 의해 잎의 황화 현상이 급속히 진행됨을 알 수 있었으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 가뭄에

의하여 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그에 비하여 ATPG4 유전자의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 노화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 ATPG4가 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

**【0139】** <실시에 6-1> ATPG4 과발현 변이체의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 스트레스에 대한 특성 분석

**【0140】** ATPG4 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 2일 간격으로 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형에 비하여 ATPG4 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소에 있어서도 지연됨을 확인할 수 있었다(도 19, 20과 21). 이러한 사실은 ATPG4가 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

**【0141】** 따라서 ATPG4 유전자는 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성을 제공하여 스트레스 저항성 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

#### **【특허청구범위】**

##### **【청구항 1】**

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

##### **【청구항 2】**

제1항의 단백질을 암호화하는 ATPG4 유전자.

##### **【청구항 3】**

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

##### **【청구항 4】**

제3항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 노화가 지연된 식물체의 제조 방법.

##### **【청구항 5】**

제3항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 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】

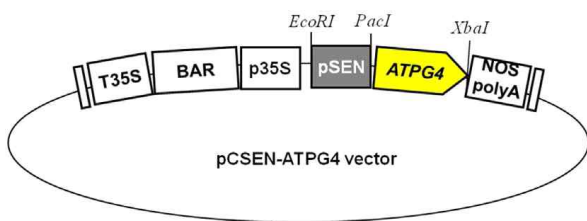
본 발명은 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도를 개시한다. 상기 형질전환되어 과발현된 식물체는 생산성이 증대되는 특성을 보일 뿐만 아니라 노화 지연 특성과 스트레스 내성 특성도 보인다.

【대표도】

도 1

【도면】

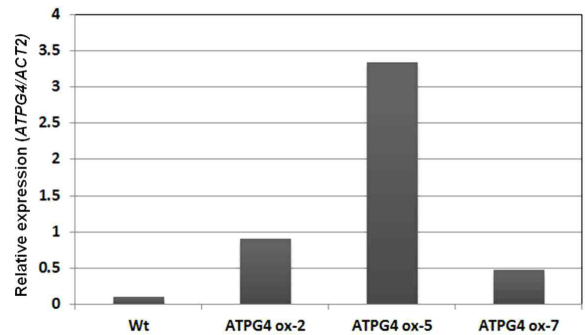
【도 1】



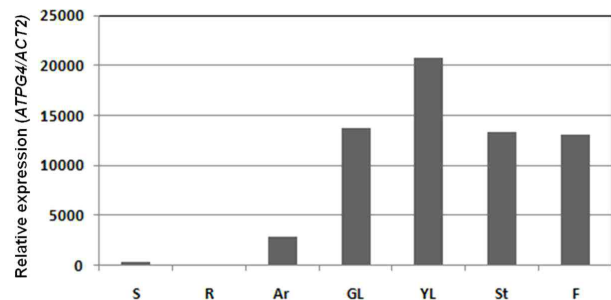
【도 2】



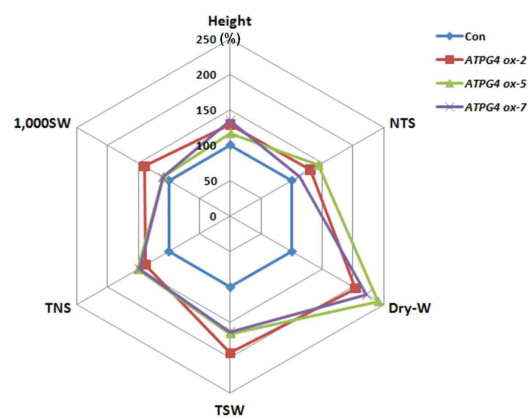
【도 3】



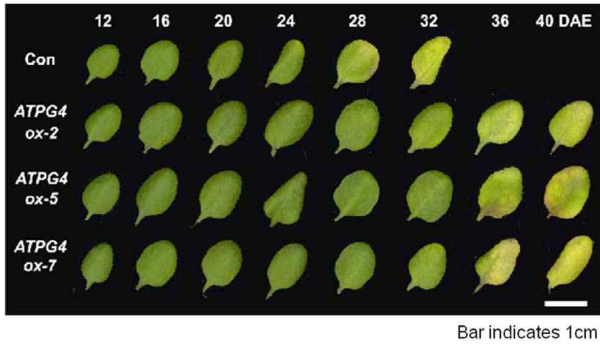
【도 4】



【도 5】



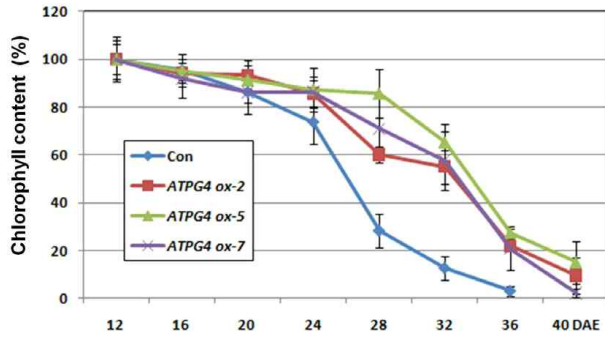
【도 6】



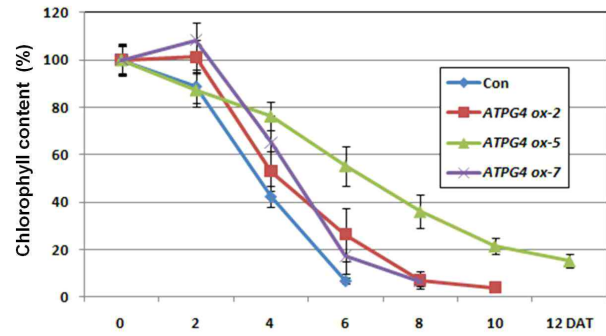
【도 10】



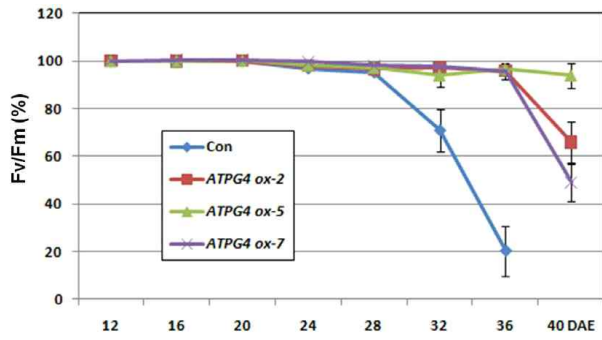
【도 7】



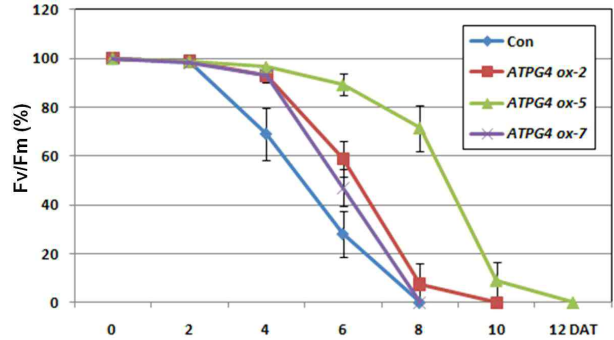
【도 11】



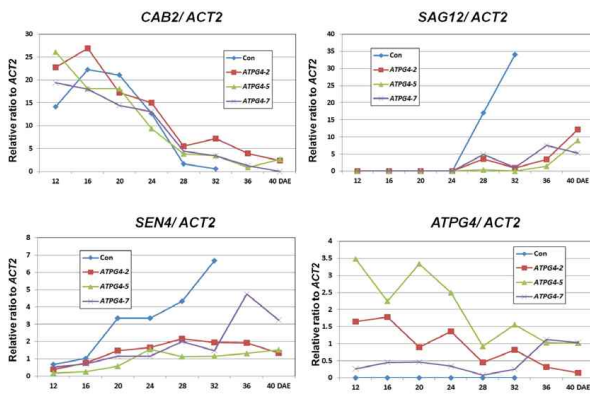
【도 8】



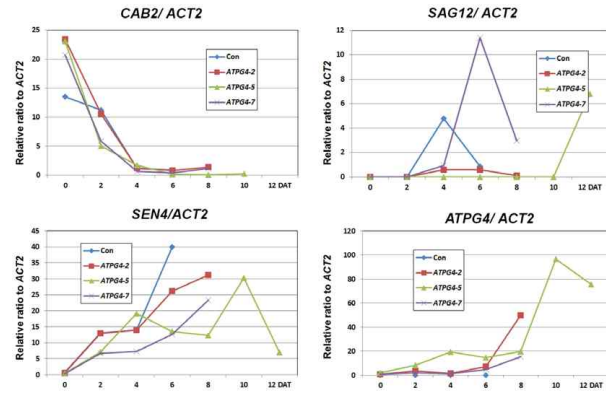
【도 12】



【도 9】



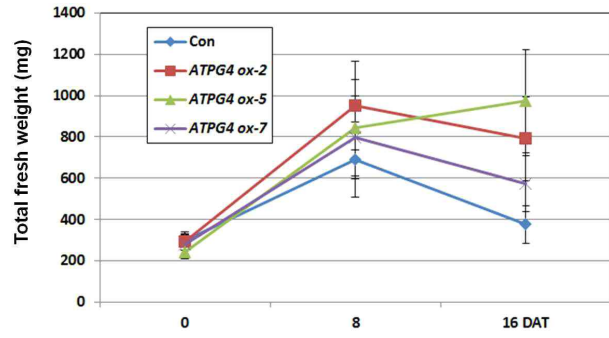
【도 13】



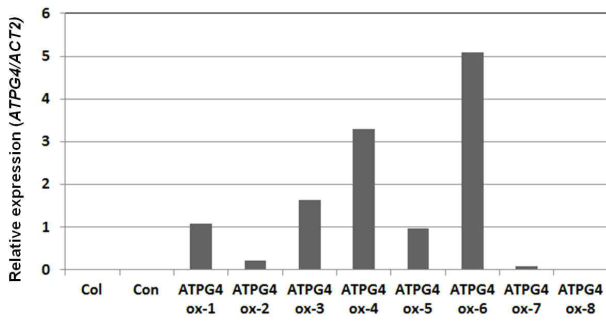
【도 14】



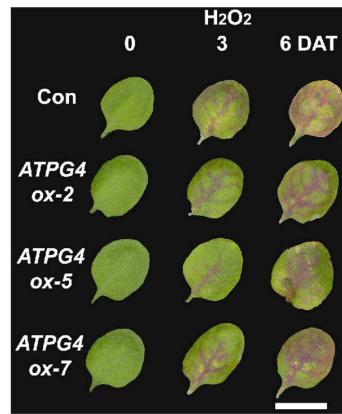
【도 18】



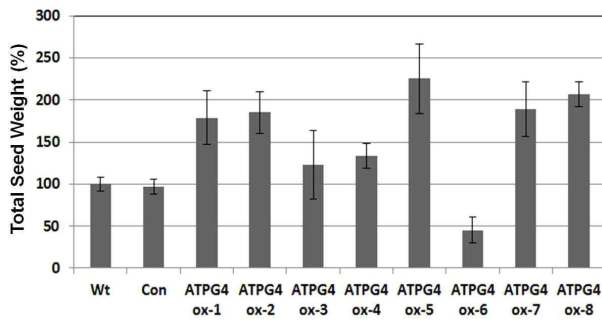
【도 15】



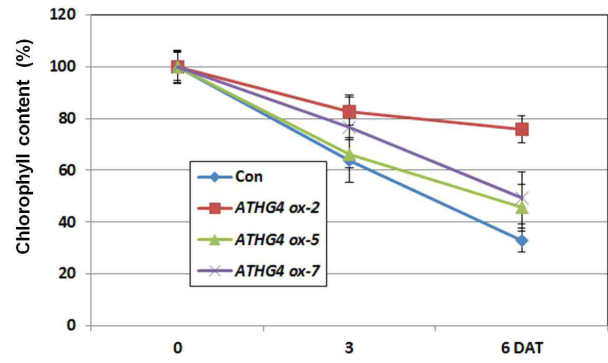
【도 19】



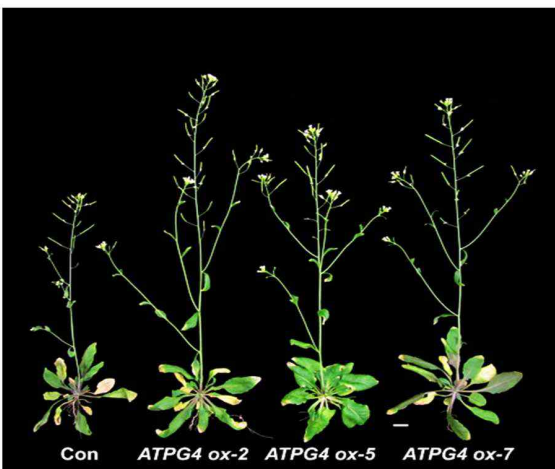
【도 16】



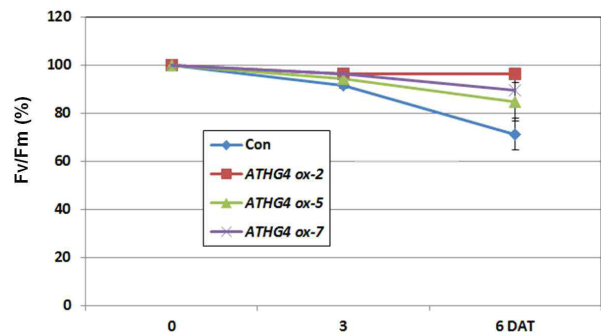
【도 20】



【도 17】



【도 21】



### 【부록 3】 국내특허출원 (10-2011-0038929)

#### 【명세서】

#### 【발명의 명칭】

식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (ATPG7 Protein Delaying Senescence and Providing Yield Increase of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use)

#### 【기술분야】

【0001】 본 발명은 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도에 관한 것이다.

#### 【배경기술】

【0002】 식물의 노화는 식물 발생의 마지막 단계로서, 세포, 조직, 기관 혹은 생물체 수준에서 나이-의존적 붕괴 과정이며, 성장 및 발생 단계를 거쳐 치사 단계를 유도한다. 식물은 노화가 진행됨에 따라 점차적으로 합성능력이 저하되고 세포 내 구조물과 거대분자들이 순차적으로 분해되면서 세포의 항상성을 잃게 되어, 결국 죽음에 이르게 된다(Thomas et al., 1993). 이러한 식물의 노화는 일련의 연속된 생화학적 및 생리학적 현상으로 유전적으로 계획되어 있어 세포, 조직 및 기관의 수준에서 매우 정교하고, 능동적으로 진행된다.

【0003】 세포 구조에 있어서 노화의 초기 현상은 잎 단백질의 70% 이상을 함유하고 있는 소기관인 엽록체의 분해이다. 대사적인 측면에서 보면, 식물체내 탄소 동화작용이 엽록소와 단백질, 막 지질, 그리고 RNA와 같은 거대분자의 이화작용으로 전환되는 것을 의미한다. 노화를 통하여 증가된 이화 작용 활성은 성장 동안 동화조직인 잎에 축적된 세포성분들이 종자 혹은 다른 저장 기관의 발달을 위해 공급되는 배출성 세포 성분으로 전환되는 것을 유도한다. 따라서 식물의 노화는 세포가 퇴화하는 과정인 동시에 진화 과정 동안 환경에 적응하기 위해 능동적으로 획득한 유전형질이라고 생각되고 있다 (Buchanan-Wollaston et al., 2003; Lim and Nam, 2005; Nam, 1997)

【0004】 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 같이, 노화가 지연되도록 육종된 국내 품종의 하나가 ethylene 합성 유전자인 ACC oxidase 유전자의 변이를 동반하고 있음이 보고되었다.

【0005】 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 과정동안 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).

【0006】 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).

【0007】 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 쿵(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.

【0008】 이러한 이유에서 식물 분야 생명공학 종사자들은 식물에서 수명 연장에 관여하는 유전자나 단백질 등을 찾아내고자 노력하고 있다.

#### 【발명의 내용】

##### 【해결하려는 과제】

【0009】 본 발명의 목적은 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질을 제공하는 데 있다.

【0010】 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 제공하는 데 있다.

【0011】 본 발명의 또 다른 목적은 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

【0012】 본 발명의 또 다른 목적은 생산량 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

【0013】 본 발명의 기타의 목적은 이하에서 제시될 것이다.

##### 【과제의 해결 수단】

【0014】 본 발명은 일 측면에 있어, 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질에 관한 것이다.

【0015】 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, 이와 더불어 개체의 생체량 증가 및/또는 종자 생산성 증가라는 생산성 증대 특성도 뚜렷하게 나타남을 확인하였다.

【0016】 이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이 식물체의 노화를 지연시키고 식물의 생산성을 증대시키는 데 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

【0017】 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.

【0018】 본 발명의 ATPG7 단백질은 하기 (a), (b) 및 (c)의 폴리펩티드들 중 하나이다.

【0019】 (a) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드;

【0020】 (b) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드; 및

【0021】 (c) 상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드.

【0022】 본 명세서에서, "단백질"이라는 용어는 폴리펩티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용되며, "유전자"라는 용어는 폴리뉴클레오티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용된다.

【0023】 본 명세서에서, "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교하였을 때 여전히 식물 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분한 정도의 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로서 정의된다. 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분하면 되므로, 상기 폴리펩티드의 길이 그리고 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도는 문제되지 않는다. 즉 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 활성이 낮더라도, 여전히 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 폴리펩티드라면 그 길이가 어떻든 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"에 포함된다는 것이다. 당업자라면, 즉 본 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 여

전히 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.

**[0024]** 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 보유하지만 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 포함되는 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 아미

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



술한 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.

**【0025】** 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.

**【0026】** 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.

**【0027】** 본 발명은 또 다른 측면에 있어, 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

**【0028】** 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.

**【0029】** 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 비하

여 높은 특성 말한다.

**【0030】** 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.

**【0031】** 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, 쌀, 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, 사탕무우, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나 등이 포함될 것이고, 기타 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립 등이 포함될 것이다.

**【0032】** 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 서열 번호 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.

**【0033】** 또한 본 명세서에서, "과발현"이란 야생형 식물체에서 발현되는 수준 이상의 발현을 의미한다. 이러한 "과발현" 여부는 상기 서열번호 1의 유전자나 서열번호 1의 염기서열

과 유사한 서열로 이루어진 유전자(예컨대 cDNA)를 정량하여 직접적으로 결정하거나 그 유전자가 암호화하는 단백질을 정량하여 간접적으로 정량할 수 있다.

【0034】 본 발명의 노화가 지연된 식물의 제조 방법에 있어서, 상기 단계 (a)는 유전공학적인 방법으로 수행될 수 있다.

【0035】 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.

【0036】 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.

【0037】 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.

【0038】 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.

【0039】 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 활성화되

는 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), 리볼로스 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.

【0040】 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  $\alpha$ -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.

【0041】 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.

【0042】 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.

**[0043]** 한편, 외래성 유전자로 식물을 형질전환시키는 방법은 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있는데, 예컨대 유전자 총을 사용한 직접적인 유전자 전달방법, 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), 국제 특허 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. pp169-178) 등에 개시된 방법을 사용할 수 있다.

**[0044]** 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이, 형질전환된 아그로박테리움으로 유식물체, 식물 종자 등을 감염시키는 방법이다.

**[0045]** 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.

**[0046]** 한편, 상기 (b) 선별 단계는 형질전환된 식물체를 발육성장시켜, 잎의 황화 현상의 진행 정도나 잎의 괴사 현상의 진행 정도 등을 통해 육안으로 선별하거나, 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있으며, 나아가 엽록소 함량, 광합성 효율 등을 정량하는 방법, 상기 방법들을 혼합한 방법 등을 통하여 선별할 수 있다.

**[0047]** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

**[0048]** 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.

**[0049]** 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.

**[0050]** 상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적인 방법에 대해서는 상기 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

**[0051]** 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.

**[0052]** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 식물체의 노화를 지연시키는 방법에 관한 것이다.

**[0053]** 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.

**[0054]** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 식물체의 생산성 증대 방법에 관한 것이다.

**[0055]** 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.

**[0056]** 상기 방법들에서 상기 (a) 및 (b) 단계는 상기 본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

**[0057]** 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.

**【0058】** 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.

**【0059】** 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.

**【0060】** 바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG7 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 ATPG7이 도입되어 과발현됨으로써 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

**【0061】** 본 명세서에서, 상기 "형질전환 식물체"는 성숙한 식물로 발육·성장할 수 있는 식물 세포, 식물 조직, 또는 식물 종자에 상기 유전자가 도입되어 형질전환된 경우뿐만 아니라 형질전환된 식물과의 교배에 의해 계놈이 변형된 식물체, 식물 종자, 식물 세포를 포함한다.

#### **【발명의 효과】**

**【0062】** 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】**

**【0063】** 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 동안 생육시킨 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 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 5는 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 6은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5, 그리고 ATPG7 ox-6의 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 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5, 그리고 ATPG7 ox-6의 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 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5, 그리고 ATPG7 ox-6의 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 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5, 그리고 ATPG7 ox-6의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, ACT를 PCR 양성 대조구로 사용

하였다. CAB2은 엽록소a/b 결합 단백질 유전자이고, SEN4 및 SAG12는 노화 유전자로서, 노화 마커 유전자들이다.

도 10은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5, 그리고 ATPG7 ox-6의 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 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5, 그리고 ATPG7 ox-6의 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 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5, 그리고 ATPG7 ox-6의 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 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5, 그리고 ATPG7 ox-6의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, ACT를 PCR 양성 대조구로 사용하였다. CAB2, SEN4, 그리고 SAG12는 노화 마커 유전자이다.

#### 【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0064】 이하 본 발명의 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

【0065】 <실시예 1> 애기장대로부터 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 유전자의 분리

【0066】 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다.

【0067】 <실시예 1-1> 애기장대의 재배 및 배양

【0068】 애기장대는 토양을 담은 화분에서 재배하거나, 2% 슈크로즈(sucrose, pH 5.7)와 0.8% 아가(agar)가 포함된 MS(Murashige and Skoog salts, Sigma, USA) 배지를 넣은 페트리 디쉬에서 재배하였다. 화분에서 재배할 때는 22℃의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 성장 조절기(growth chamber)내에서 재배하였다.

【0069】 <실시예 1-2> RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

【0070】 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.

【0071】 <실시예 1-3> 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증

대 기능을 갖는 ATPG7 유전자분리

【0072】 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related, GeneBank accession number NP 194012.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열 번호 3으로 표시되고 제한효소 PacI의 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 XbaI의 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.

【0073】 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).

【0074】 <실시예 2> ATPG7 유전자에 대한 센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 노화에 대한 특성 분석

【0075】 <실시예 2-1> ATPG7 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

【0076】 상기 유전자가 식물의 노화 지연 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 ATPG7 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 ATPG7 전사체의 발현을 변화시켰다.

【0077】 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 PacI의 서열이 포함된 정방향 프라이머 및 서열번호 4로 표시되고 제한효소 XbaI의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 ATPG7 cDNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 PacI과 XbaI으로 절단하고, 유도성 프로모터(inducible promoter)인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 ATPG7 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-ATPG7 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

【0078】 한편, 도 1은 pCSEN 벡터에 ATPG7 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-ATPG7 재조합 벡터를 도시한 그림

이다. 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.

**【0079】** 상기 pCSEN-ATPG7 재조합 벡터를 아그로박테리움 투머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)에 일렉트로포레이션(electroporation) 방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28℃에서 O.D.600값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25℃에서 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 10<sup>4</sup> 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 ATPG7 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

**【0080】** <실시예 2-2> T1과 T2 형질전환 애기장대의 특성 분석

**【0081】** 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 생장 변화를 조사하였다.

**【0082】** 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 변이체들은 뚜렷한 노화 지연 특성을 보였으며, 형질전환 개체에서 이러한 노화 지연 특성의 정도 차이는 유전자의 과발현이 개체마다 다르게 나타남에 기인하는 것으로 판단된다(도 2).

**【0083】** 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T1 형질전환 애기장대로부터 T2 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 우선, T2 형질전환 애기장대를 3일 동안 저온 처리(4℃)한 T2 형질전환 종자를 화분에서 재배한 후 바스타 제초제 처리를 통하여 형질전환 애기장대를 선별하였다.

**【0084】** 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-5와 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 Tanscriptase(INVITROGEN, USA)을 이용하여 65℃에서 5분; 50℃에서 60분; 및 70℃에서 15분의 조건으로 cDNA를 합성하였다. 이후, 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 하기 ATPG7 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 ACT 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94℃에서 2분간 가열하여 주형 DNA를 변성시킨 후, 94℃에서 1분; 55℃에서 1분 30초; 및 72℃에서 1분을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72℃에서 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-5와 ATPG7 ox-6 변이체의 ATPG7 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 ATPG7 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

**【0085】** 【표 1】 ATPG7 유전자와 ACT 유전자 발현을 위한 프라이머 서열 및 서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	ATPG7	TGCACATCAGCAACAAAGCTATG (서열번호 5)/GCTGCAACTGAACGGAAACCA (서열번호 6)
2	ACT	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAAAACCGCCTTC (서열번호 8)

**【0086】** 선별된 애기장대 T2 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(도 4).

**【0087】** pCSEN-ATPG7 구성체를 가지고 있는 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5와 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 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 도 3에서 나타났듯이 유전자의 과발현이 라인마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 흥미로운 사실은 노화 지연 형질이 강력한 ATPG7 ox-5는 생산성 증대에 있어서 큰 표현형적 차이를 못 가지는 반면, 노화 지연 형질이 강하지 않는 ATPG7 ox-4는 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.

【0088】 <실시에 3> ATPG7 과발현 변이체의 생산성 증대에 대한 특성 분석

【0089】 ATPG7 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5와 ATPG7 ox-6의 라인별로 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다.

【0090】 적용된 생산성 증대 지표는 식물의 키(height), 장과파(silique) 수 (NTS), 생체량(Wet-W), 생체건량(dry-W), 총 종자 무게(TSW), 총 종자 수(TNS), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20개체의 평균값이다.

【0091】 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5와 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 5). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

【0092】 <실시에 4> ATPG7 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석

【0093】 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, 잎 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

【0094】 <실시에 4-1> ATPG7 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 잎의 표현형적 변화

【0095】 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-5와 ATPG7 ox-6의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(도 6). 이러한 사실로 미루어보아, ATPG7 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다.

【0096】 <실시에 4-2> ATPG7 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 엽록소 함량 변화

【0097】 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 20일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5와 ATPG7 ox-6의 경우 자엽 생성 후 36일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다.

【0098】 <실시에 4-3> ATPG7 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 광합성 효율 변화

【0099】 오 등의 방법(Plant Mol. Biol. 30:939, 1996)을 이용하여 광합성 효율을 측정하였다. 우선 각 DAE(day after emergence)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.

【0100】 그 결과, 도 8에 도시된 바와 같이, 야생종은 자엽 생성 후 28일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5와 ATPG7 ox-6의 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.

【0101】 <실시에 4-4> ATPG7 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 노화 관련 유전자의 발현 변화

【0102】 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.

【0103】 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.

【0104】 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 대조구로는 ACT 유전자를 사용하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 2에서 제시하였다.

**【0105】 【표 2】 노화관련 유전자의 발현을 위한 프라이머 서열번호**

No.	유전자명	경방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	CAB2	CCGAGGACTTGCTTACCCC (서열번호 9)/ AACTCAGCGAAGGCTCTGG (서열번호 10)
2	SEN4	CGTCGATGACACCCATTAGAG (서열번호 11)/CATGGGCTTGTCTTTGGAAC (서열번호 12)
3	SAG12	ACGATTTTGGCTGCGAAGG (서열번호 13)/ TCAGTTGTCAAGCCGCGAG (서열번호 14)
4	ACT	ATGGCGATGGTGAGGATATC (서열번호 7)/ CACCAGCAAAACCGCCTTC (서열번호 8)
5	ATPG7	TGCACATCAGCAACAGCTATG (서열번호 5)/GCTGCACCTGAAACCGAACCA (서열번호 6)

**【0106】** 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 SEN4와 같은 노화 관련 유전자들은 노화단계에서 그 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. SEN4와 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 SEN4와 SAG12의 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 9). 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.

**【0107】** <실시예 4-5> ATPG7 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

**【0108】** 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(rossette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액(2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 상기 <실시예 4-1 내지 4-4>와 동일한 방법으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

**【0109】** 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이

후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 ATPG7 ox-4, ATPG7 ox-5와 ATPG7 ox-6의 경우 잎의 황화 현상이 12일 이후부터 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(도 9). 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-5와 ATPG7 ox-6의 경우, 대부분 6일째에도 80% 정도의 엽록소 함량을 나타냈다(도 11). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 ATPG7 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(도 12).

**【0110】** 또한, 노화 지표 유전자인 SEN4와 SAG12, 그리고 광의존적 유전자인 CAB2의 발현을 상기 <실시예 4-4>와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 도 13에 도시된 바와 같이, 야생형이 암 처리 후 4일째 SAG12의 발현이 현저히 증가하고 8일째 SEN4의 발현이 현저히 증가하는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 전 기간 동안 SAG12의 발현이 나타나지 않았으며 SEN4의 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.

**【특허청구범위】**

**【청구항 1】**

서열번호 2에 개시된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 갖고, 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 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 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 노화가 지연된 식물체의 제조 방



법.

**【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) 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】**

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

**【청구항 12】**

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

**【요약서】**

**【요약】**

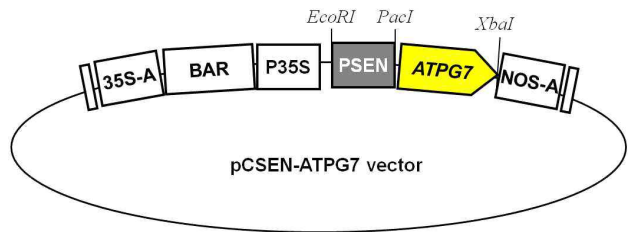
본 발명은 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 그리고 이들의 용도를 개시한다. 상기 유전자로 형질전환되어 과발현된 식물체는 식물체의 노화가 지연되고 생산성이 증대되는 특성을 보인다.

**【대표도】**

도 1

**【도면】**

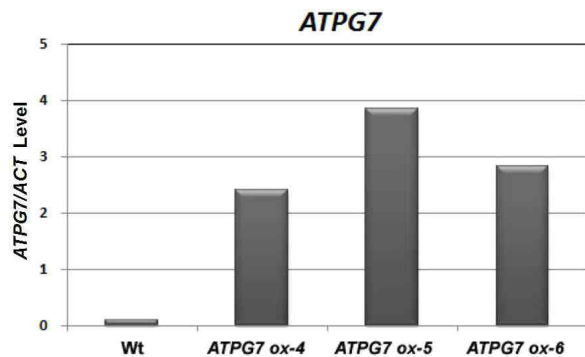
**【도 1】**



**【도 2】**



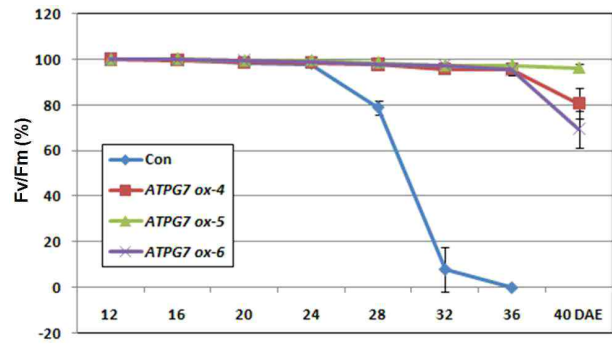
**【도 3】**



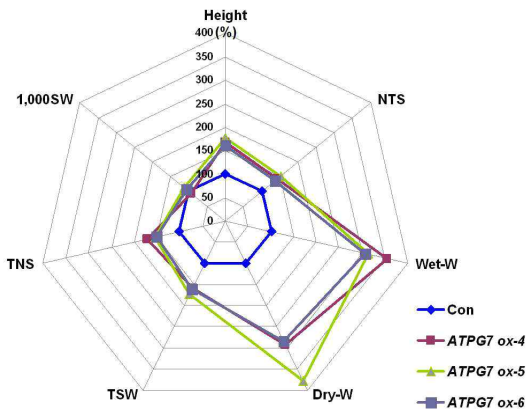
【도 4】



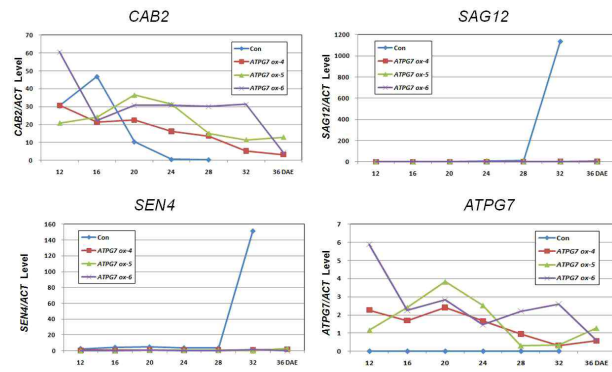
【도 8】



【도 5】



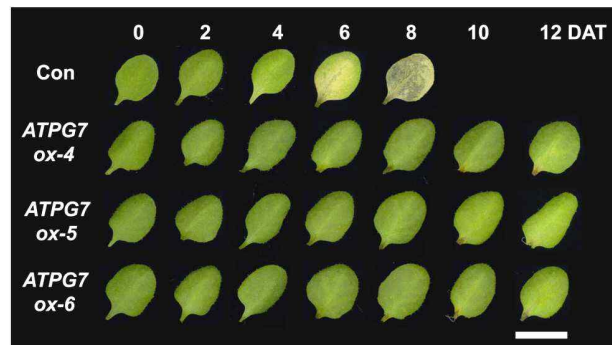
【도 9】



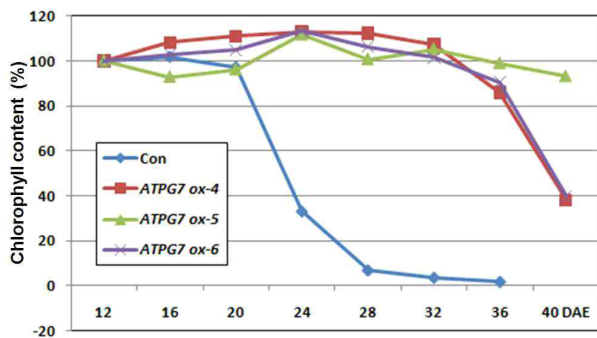
【도 6】



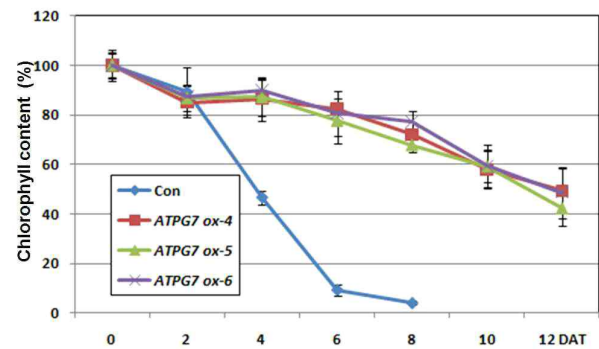
【도 10】



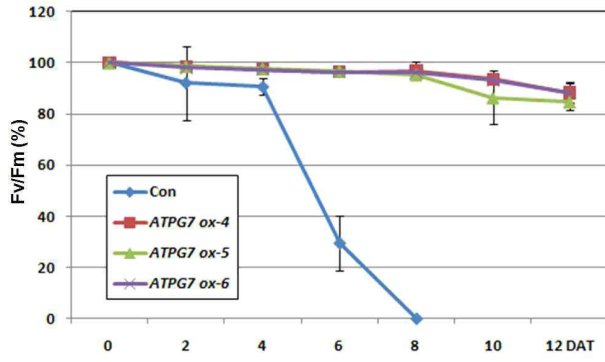
【도 7】



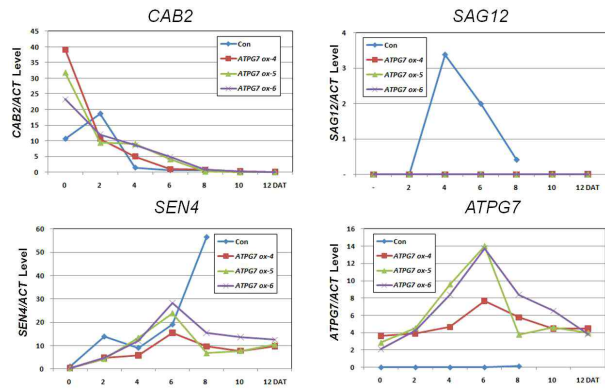
【도 11】



【图 12】



【图 13】



## 【부록 4】 국내특허출원 (10-2011-0038932)

### 【명세서】

#### 【발명의 명칭】

식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (ATPG8 Protein Delaying Senescence and Providing Yield Increase of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use)

#### 【기술분야】

【0001】 본 발명은 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도에 관한 것이다.

#### 【배경기술】

【0002】 식물의 노화는 식물 발생의 마지막 단계로서, 세포, 조직, 기관 혹은 생물체 수준에서 나이-의존적 붕괴 과정이며, 성장 및 발생 단계를 거쳐 치사 단계를 유도한다. 식물은 노화가 진행됨에 따라 점차적으로 합성능력이 저하되고 세포 내 구조물과 거대분자들이 순차적으로 분해되면서 세포의 항상성을 잃게 되어, 결국 죽음에 이르게 된다(Thomas et al., 1993). 이러한 식물의 노화는 일련의 연속된 생화학적 및 생리학적 현상으로 유전적으로 계획되어 있어 세포, 조직 및 기관의 수준에서 매우 정교하고, 능동적으로 진행된다.

【0003】 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 활성화는 성장 동안 동화조직인 잎에 축적된 세포성분들이 종자 혹은 다른 저장 기관의 발달을 위해 공급되는 배출성 세포 성분으로 전환되는 것을 유도한다. 따라서 식물의 노화는 세포가 퇴화하는 과정인 동시에 진화 과정 동안 환경에 적응하기 위해 능동적으로 획득한 유전형질이라고 생각되고 있다 (Buchanan-Wollaston et al., 2003; Lim and Nam, 2005; Nam, 1997)

【0004】 이와 같은 식물의 노화는 식물 호르몬 등과 같은 내적 환경요인 및 가뭄, 영양소 제한, 병원균 침투 등과 같은 외적 환경 요인에 의하여 영향을 받는다. 식물 호르몬 중 cytokinin은 생리학적으로 노화 지연 호르몬으로서 이를 이용한 노화조절 기술이 많이 보고되고 있다. Amasino 그룹은 노화 특이적인 SAG12 유전자의 promoter에 IPT 유전자를 재조합하여 노화 단계 특이적인 cytokinin 합성 조절 방법을 개발하였으며, 상기 방법으로 노화를 지연시킨 담배에서 50%의

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

【0005】 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 과정동안 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).

【0006】 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).

【0007】 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 쿵(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.

【0008】 이러한 이유에서 식물 분야 생명공학 종사자들은 식물에서 수명 연장에 관여하는 유전자나 단백질 등을 찾아내고자 노력하고 있다.

#### 【발명의 내용】

##### 【해결하려는 과제】

【0009】 본 발명의 목적은 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질을 제공하는 데 있다.

【0010】 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 제공하는 데 있다.

【0011】 본 발명의 또 다른 목적은 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

【0012】 본 발명의 또 다른 목적은 생산량 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

【0013】 본 발명의 기타의 목적은 이하에서 제시될 것이다.

##### 【과제의 해결 수단】

【0014】 본 발명은 일 측면에 있어, 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질에 관한 것이다.

【0015】 본 발명자(들)는 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related, GeneBank accession number NP NP 191646.1)의 염기서열을 기초로 상기 단백질의 유전자를 분리하고 상기 유전자를 애기장대에 형질전환시켜 과발현시켰을 때, 식물의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타나고, 이와 더불어 개체의 생체량 증가 및/또는 종자 생산성 증가라는 생산성 증대 특성도 뚜렷하게 나타남을 확인하였다.

【0016】 이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이 식물체의 노화를 지연시키고 식물의 생산성을 증대시키는 데 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

【0017】 본 발명자들은 상기 유전자를 ATPG8(AT-hook protein of Genomine 8) 유전자 및 ATPG8 단백질로 명명하였으며, 이들 염기 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 1

및 2에 개시되어 있다.

【0018】 본 발명의 ATPG8 단백질은 하기 (a), (b) 및 (c)의 폴리펩티드들 중 하나이다.

【0019】 (a) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드;

【0020】 (b) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드; 및

【0021】 (c) 상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드.

【0022】 본 명세서에서, "단백질"이라는 용어는 폴리펩티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용되며, "유전자"라는 용어는 폴리뉴클레오티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용된다.

【0023】 본 명세서에서, "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교하였을 때 여전히 식물 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분한 정도의 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로서 정의된다. 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분하면 되므로, 상기 폴리펩티드의 길이 그리고 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도는 문제되지 않는다. 즉 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 활성이 낮더라도, 여전히 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 폴리펩티드라면 그 길이가 어떻든 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"에 포함된다는 것이다. 당업자라면, 즉 본 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 여

전히 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.

**[0024]** 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 보유하지만 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 포함되는 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 아미

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

술한 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.

**【0025】** 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.

**【0026】** 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.

**【0027】** 본 발명은 또 다른 측면에 있어, 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

**【0028】** 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.

**【0029】** 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 비하

여 높은 특성 말한다.

**【0030】** 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.

**【0031】** 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, 쌀, 귀리, 수수, 십자화과 채소(배추, 청경채, 케일, 콜리플라워, 브로콜리, 열무(young radish), 무, 갯 등), 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나 등이 포함될 것이고, 기타 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립 등이 포함될 것이다.

**【0032】** 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 서열 번호 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.

**【0033】** 또한 본 명세서에서, "과발현"이란 야생형 식물체에서 발현되는 수준 이상의 발현을 의미한다. 이러한 "과발현" 여부는 상기 서열번호 1의 유전자나 서열번호 1의 염기서열

과 유사한 서열로 이루어진 유전자(예컨대 cDNA)를 정량하여 직접적으로 결정하거나 그 유전자가 암호화하는 단백질을 정량하여 간접적으로 정량할 수 있다.

**【0034】** 본 발명의 노화가 지연된 식물의 제조 방법에 있어서, 상기 단계 (a)는 유전공학적인 방법으로 수행될 수 있다.

**【0035】** 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.

**【0036】** 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.

**【0037】** 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.

**【0038】** 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.

**【0039】** 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 활성화되

는 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), 리볼로스 비스-포스페이트 카르복실라제(ssRUBISCO)의 소 서브유닛에서 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.

**【0040】** 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  $\alpha$ -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.

**【0041】** 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.

**【0042】** 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.

**[0043]** 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), 국제 특허 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. pp169-178) 등에 개시된 방법을 사용할 수 있다.

**[0044]** 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이, 형질전환된 아그로박테리움으로 유식물체, 식물 종자 등을 감염시키는 방법이다.

**[0045]** 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.

**[0046]** 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.

**[0047]** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

**[0048]** 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.

**[0049]** 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.

**[0050]** 상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적인 방법에 대해서는 상기 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

**[0051]** 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.

**[0052]** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 식물체의 노화를 지연시키는 방법에 관한 것이다.

**[0053]** 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.

**[0054]** 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 식물체의 생산성 증대 방법에 관한 것이다.

**[0055]** 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.

**[0056]** 상기 방법들에서 상기 (a) 및 (b) 단계는 상기 본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

**[0057]** 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.

**【0058】** 바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG8 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자로 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

**【0059】** 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.

**【0060】** 바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATPG8 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 ATPG8이 도입되어 과발현됨으로써 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

**【0061】** 본 명세서에서, 상기 "형질전환 식물체"는 성숙한 식물로 발육·성장할 수 있는 식물 세포, 식물 조직, 또는 식물 종자에 상기 유전자가 도입되어 형질전환된 경우뿐만 아니라 형질전환된 식물과의 교배에 의해 계놈이 변형된 식물체, 식물 종자, 식물 세포를 포함한다.

#### **【발명의 효과】**

**【0062】** 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자를 제공할 수 있다. 상기 유전자는 노화 지연 기능을 갖고 생산성 증대 기능을 가지므로, 이 유전자로 식물체를 형질전환시킬 경우, 식물의 노화를 지연시키고, 식물의 생산성 증대 기능을 갖도록 할 수 있다.

#### **【도면의 간단한 설명】**

**【0063】** 도 1은 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-ATPG8 재조합 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다. 도 2는 상기 도 1의 pCSEN-ATPG8 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T1 식물을 발아 후 60일 동안 생육한 애기장대의 사진이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

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

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

Wt: 애기장대 야생형

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

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

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

도 4는 상기 도 1의 pCSEN-ATPG8 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T2 라인을 발아 후 50일과 70일 동안 생육한 애기장대의 사진이다.

Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구

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

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

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

도 5는 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9, 그리고 ATPG10 ox-10의 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

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

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

도 8은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9, 그리고 ATPG8 ox-10의 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, ACT를 PCR 양성 대조구로 사용하였다. CAB2은 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자이고, SEN4 및 SAG12는 노화 유전자로서, 노화 마커 유전자들이다.

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

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

도 11은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이

유도된 변이체 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9, 그리고 ATPG8 ox-10의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다. 도 12는 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9, 그리고 ATPG8 ox-10의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, ACT을 PCR 양성 대조구로 사용하였다. CAB2, SEN4, 그리고 SAG12는 노화 마커 유전자이다.

**【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】**

**【0064】** 이하 본 발명의 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

**【0065】** <실시예 1> 애기장대로부터 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 유전자의 분리

**【0066】** 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다.

**【0067】** <실시예 1-1> 애기장대의 재배 및 배양

**【0068】** 애기장대는 토양을 담은 화분에서 재배하거나, 2% 수크로즈(sucrose, pH 5.7)와 0.8% 아가(agar)가 포함된 MS(Murashige and Skoog salts, Sigma, USA) 배지를 넣은 페트리 디쉬에서 재배하였다. 화분에서 재배할 때는 22℃의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 성장 조절기(growth chamber)내에서 재배하였다.

**【0069】** <실시예 1-2> RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

**【0070】** 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.

**【0071】** <실시예 1-3> 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 유전자분리

**【0072】** 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding proteinrelated, GeneBank accession number NP 191646.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열 번호 3으로 표시되고 제한효소 BglIII의 서열이 포함된 정방향 프라이머(BglIII/AT3G60870 SOE-F, 5'-AGA TCT ATG GAT GAG GTA TCT CGT TCT CA -3')와, 서열번호 4로 표시되고 제한효소 XbaI의 서열이 포함된 역방향 프라이머(XbaI/AT3G60870 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA GAA AGA CGG TCG TTG CGT TC-3')를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 상기 <실

시에 1-2>에서 제조된 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

**【0073】** 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 28.4 kDa의 분자량을 갖는 265개의 아미노산을 암호화하는 798bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 ATPG8(AT-hook protein of Genomine 8)로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 ATPG8 단백질의 등전점(isoelectric point)은 8.11로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "ATPG8" 혹은 "ATPG8 유전자"라 하고, 단백질은 "ATPG8" 혹은 "ATPG8 단백질"이라고 한다).

**【0074】** <실시예 2> ATPG8 유전자에 대한 센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 노화와 생산성 증대에 대한 특성 분석

**【0075】** <실시예 2-1> ATPG8 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

**【0076】** 상기 유전자가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 ATPG8 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 ATPG8 전사체의 발현을 변화시켰다.

**【0077】** 서열번호 3로 표시되고 제한효소 BglIII의 서열이 포함된 정방향 프라이머 및 서열번호 4으로 표시되고 제한효소 XbaI의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 ATPG8 cDNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 BglIII와 XbaI으로 절단하고, 유도성 프로모터(inducible promoter)인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 ATPG8 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-ATPG8 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

**【0078】** 한편, 도 1은 pCSEN 벡터에 ATPG8 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-ATPG8 재조합 벡터를 도시한 그림이다. 도 1에서 BAR는 바스타 제초제에 대한 저항성을 부여하는 BAR 유전자(phosphinothricin acetyltransferase gene)를 가리키고, RB는 오른쪽 경계(Right Border), LB는 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.

**【0079】** 상기 pCSEN-ATPG8 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)에 일렉트로포레이션(electroporation)방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28℃에서 O.D.600값이 1.0이 될 때까지

배양하였고, 25℃에서 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 10<sup>4</sup> Pa의 진공 하에 두었다. 침지 후, 애기장대를 24시간 동안 폴리에틸렌 백(polyethylene bag)에 두었다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 생장시켜 종자(T1)를 수확하였다. 대조구로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 ATPG8 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

**【0080】** <실시에 2-2> T1과 T2 형질전환 애기장대의 특성 분석

**【0081】** 상기 <실시에 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 생장 변화를 조사하였다.

**【0082】** pCSEN-ATPG8 벡터로 형질전환된 T1 애기장대 AT8-10은 대조구(ATPG8 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)와 발아 후 60일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 AT8-10 변이체 라인인 노화 지연의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 또한 흥미롭게도 종자 수확량 증가와 개체 크기 증가와 같은 생산성 증대 특징을 가졌다(도2).

**【0083】** 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T1 형질전환 애기장대로부터 T2 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 우선, T2 형질전환 애기장대를 3일 동안 저온 처리(4℃)한 T2 형질전환 종자를 화분에서 재배한 후 바스타 제초제 처리를 통하여 형질전환 애기장대를 선별하였다.

**【0084】** 선별된 노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 ATPG8 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대 야생형과 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10 변이체의 잎으로부터 RNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하여 전체 RNA를 각각 추출하였다. 각각 1μg의 RNA를 주형으로 하고, Superscript III Reverse Transcriptase(INVITROGEN, USA)을 이용하여 65℃에서 5분; 50℃에서 60분; 및 70℃에서 15분의 조건으로 cDNA를 합성하였다. 이후, 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 하기 ATPG8 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 ACT 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.

PCR은 94℃에서 2분간 가열하여 주형 DNA를 변성시킨 후, 94℃에서 1분; 55℃에서 1분 30초; 및 72℃에서 1분을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72℃에서 15분간 최종 반응시켜 수행하였다. 이후, 1% 아가로스 겔 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였으며, 그 결과는 도 3에 도시되었다. 애기장대 야생형에 비하여 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10 변이체의 ATPG8 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 ATPG8 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

**【0085】** 【표 1】 ATPG8 유전자와 ACT 유전자 발현을 위한 프라이머 서열번호

No.	유전자명	경방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	ATPG8	ATGCAAGATGGGACATCGTTT (서열번호 5)/ ATAAGCTTCACCTGGCAACGA (서열번호 6)
2	ACT	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCGCAAAAACCGCCTTC (서열번호 8)

**【0086】** 선별된 애기장대 T2 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(도 4). pCSEN-ATPG8 구성체를 가지고 있는 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10 변이체 라인인 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 ATPG8 ox-9는 생산성 증대에 있어서 큰 표현형적 차이를 못 가지는 반면, 노화 지연 형질이 강하지 않는 ATPG8 ox-5와 ATPG8 ox-10는 생산성 증대에 있어서 대조구에 비하여 종자 수확량 증가 및 개체 크기 증가와 같은 큰 표현형적 특징을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 생산성 증대와 노화 지연에 대한 표현형적 특징을 가진 식물을 임의로 제작할 수 있을 것으로 판단된다

**【0087】** <실시에 3> ATPG8 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석

**【0088】** ATPG8 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T2 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

**【0089】** <실시에 3-1> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 잎의 표현형적 변화

**【0090】** 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰하였다. 그 결과, 애기장대

야생형의 경우 24일 이후 잎의 황화 현상이 진행되어 32일째 부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10의 경우 잎의 황화 현상이 36일부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(도 5). 이러한 사실로 미루어보아, ATPG8 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다.

**[0091]** <실시에 3-2> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 엽록소 함량 변화

**[0092]** 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 6에 도시된 바와 같이, 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10의 경우 자엽 생성 후 32일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다.

**[0093]** <실시에 3-3> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 광합성 효율 변화

**[0094]** 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.

**[0095]** 그 결과, 도 7에 도시된 바와 같이, 야생종은 자엽 생성 후 28일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10의 경우 자엽 생성 후 36일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않다가 40일째 라인에 따라 정도의 차이는 있지만 약 20% 범위 정도만 활성 소실이 일어났다. 상기 결과로부터, ATPG8 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 ATPG8 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

**[0096]** <실시에 3-4> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 노화

관련 유전자의 발현 변화

**[0097]** 야생종과 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9, 그리고 ATPG8 ox-10 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 ATPG8 유전자와 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다.

**[0098]** 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.

**[0099]** ATPG8 유전자 및 노화에 대한 마커(marker) 유전자들에 대한 정량적인 분석은 Applied Bio-systems의 7300 Real Time PCR System을 이용한 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 과정을 통해 확인하였다. 노화 마커 유전자로는 SAG12, SEN4 및 CAB2 유전자를 사용하였으며, qRT-PCR 양성 대조구로는 ACT 유전자를 사용하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 2에서 제시하였다.

**[0100]** **【표 2】** 노화관련 유전자의 발현을 위한 프라이머 서열번호

No.	유전자명	정량형/역량형 프라이머(서열번호)
1	CAB2	CGGAGGCTTGCTTACCCC (서열번호 9)/ AACCTCAGCGAAGGCCTCTGG (서열번호 10)
2	SEN4	CGTGGATTGACACACCCATTAGAG(서열번호 11)/CATGGCTTGTCTTTGGAAGC(서열번호 12)
3	SAG12	ACGATTTTGGCTGCGAAGG (서열번호 13)/ TCAGTTGTCAAGCGCCAG (서열번호 14)
4	ACT	ATGGCGATGGTGAAGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAAACCGCCCTTC (서열번호 8)
6	ATPG8	ATGCAAGATGGGACATCGTTT (서열번호 6)/ ATAAGCTTCACCTGGCAACGAA (서열번호 6)

**[0101]** 야생종의 경우, CAB2(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였다. 그러나 ATPG8 과발현 변이체들에서는 정도의 차이는 있으나, 이들 유전자의 발현 감소 양상이 지연됨을 알 수 있었다. 한편, SAG12 및 SEN4와 같은 노화 관련 유전자들은 노화단계에서 그 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. SEN4와 SAG12 경우 야생종에서 자엽 생성 후 28일 이후 급격히 증가하여 32일째 최대의 발현치를 가지는데 비해, ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9, 그리고 ATPG8 ox-10 변이체 모두는 SEN4와 SAG12의 발현이 자엽 생성 후 36일째 까지 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 한편 ATPG8 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 전체적으로 ATPG8 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 발현 수준이 현저히 높으며 노화 동안 라인별로 정도의 차이는 있지만 24일에서 28일 사이에 작은 피크를 가졌다가 점진적으로 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(도 8). 이러한 사실을 종합해보면 ATPG8 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함

량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

【0102】 <실시에 3-5> ATPG8 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

【0103】 노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 ATPG8 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T2 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액(2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 상기 <실시에 3-1 내지 3-4>와 동일한 방법으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

【0104】 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10의 경우 잎의 황화 현상이 12일 이후부터 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(도 9). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암 처리 4일 이후 급격한 감소를 가져 6일 이후 암 처리하지 않은 상태의 약 10% 이하의 수치를 나타냈으나, ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10의 경우, 대부분 6일째에도 60% 이상의 엽록소 함량을 나타냈다(도 10). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 ATPG8 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(도 11).

【0105】 또한, 노화 지표 유전자인 SEN4와 SAG12, 그리고 광의존적 유전자인 CAB2의 발현을 상기 <실시에 3-4>와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 도 12에 도시된 바와 같이, 야생형이 암 처리 후 4일째 SAG12의 발현이 현저히 증가하고 6일째 최고치를 나타내는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 동안 거의 발현되지 않았다. SEN4의 발현에 있어서, 야생형의 경우 암 처리 초기 동안 발현이 현저히 증가하여 6일째 최고치를 나타내는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 동안 야생형에 비하여 현저히 낮은 발현량을 나타내었다. 한편 ATPG8 유전자의 경우, 야생형에서는 거의 발현이 없는데 비해, 과발현 변이체에서는 암 처리 시 증가 현상을 보여 6일째 최고치를 가지고 이후 감소함을 알 수 있었다. 그러나 전체적인 발현량은 야생형에 비하여 현저히 높은 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어 보아 ATPG8 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

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

【청구항 2】

제1항의 단백질을 암호화하는 ATPG8 유전자.

【청구항 3】

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

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 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) 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】**

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

**【청구항 12】**

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

**【요약서】**

**【요약】**

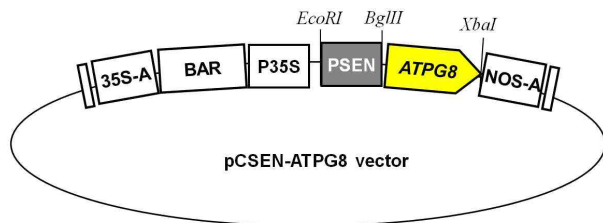
본 발명은 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 그리고 이들의 용도를 개시한다. 상기 유전자로 형질전환되어 과발현된 식물체는 식물체의 노화가 지연되고 생산성이 증대되는 특성을 보인다.

**【대표도】**

도 1

**【도면】**

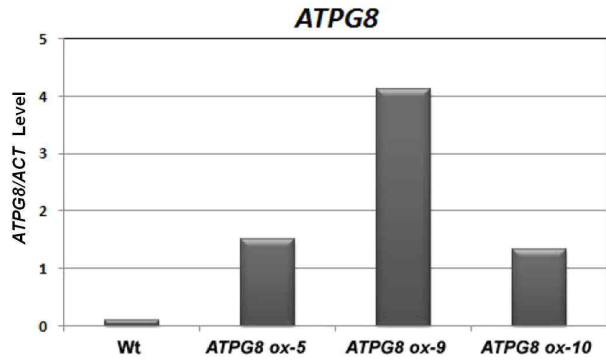
**【도 1】**



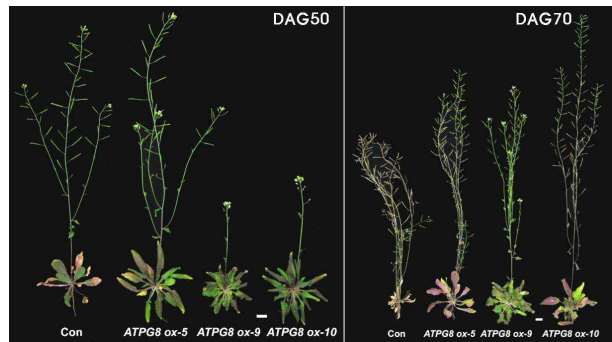
**【도 2】**



**【도 3】**



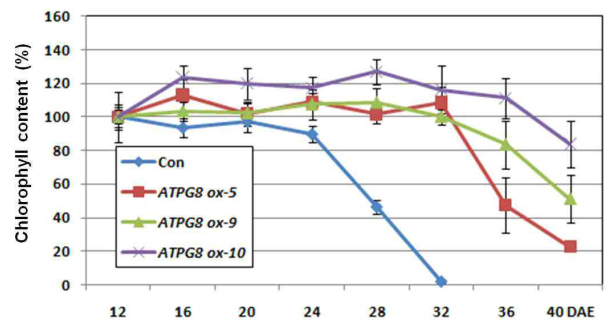
**【도 4】**



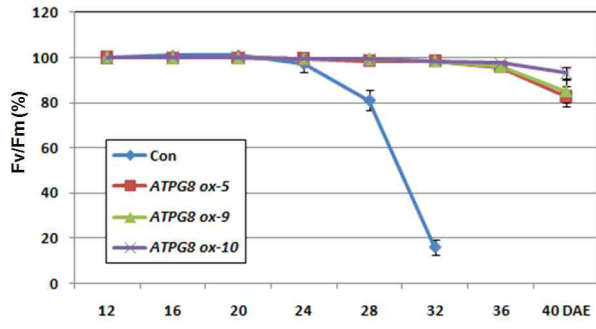
**【도 5】**



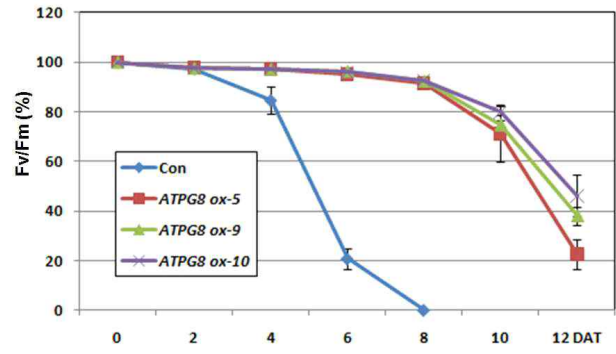
**【도 6】**



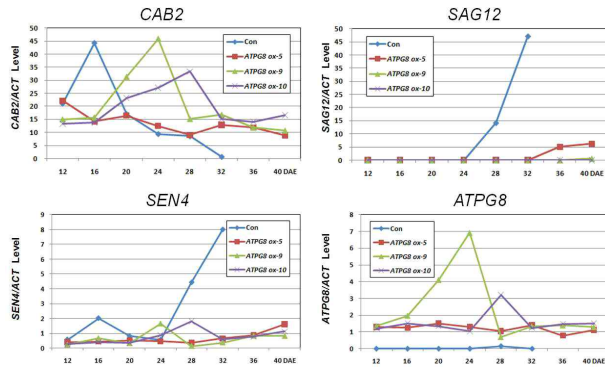
[도 7]



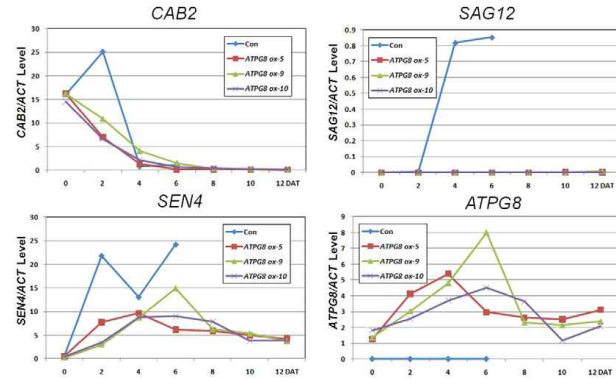
[도 11]



[도 8]



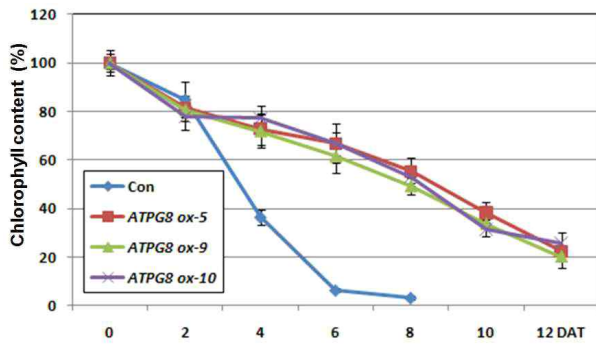
[도 12]



[도 9]



[도 10]





## **[부록 5] 국내특허출원 (10-2011-0084975)**

### **【명세서】**

#### **【발명의 명칭】**

식물의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 AtSZF2 유전자 및 이의 용도 (AtSZF2 gene increasing salt stress resistance of plant and uses thereof)

#### **【기술분야】**

**【0001】** 본 발명은 식물의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 AtSZF2 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtSZF2(*Arabidopsis thaliana* SALT-INDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN 2) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 AtSZF2 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 방법, 애기장대 유래 AtSZF2 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용한 야생형에 비해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 애기장대 유래 AtSZF2 유전자를 포함하는 식물의 염 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물에 관한 것이다.

#### **【발명의 배경이 되는 기술】**

**【0002】** 콩은 사료 작물로서 염분 농도가 0.2% 토양 조건에서 건물 수확량이 69~77% 수준이며, 0.3% 이상인 토양 조건에서는 염 피해가 심해 수확량이 크게 감소한다. 식물이 염 스트레스를 받으면 세포의 대사 와 이온의 항상성을 억제하는 작용을 하기 때문에 아주 치명적이다(Zhu et al., 2003, *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 441-445). 토양에 염이 일정 수준 이상 축적되면 식물은 뿌리를 통해 수분을 흡수하지 못하게 되고 식물 세포의 대사 활동에도 타격을 입게 된다. 따라서 염의 농도가 높으면 높을수록 식물로 흡수되는 수분의 양이 감소하기 때문에 작물의 생산량이 감소하며 결국 작물이 말라 죽게 된다.

**【0003】** 작물은 가뭄(drought), 염(salt) 및 저온(cold)과 같은 환경 스트레스에 민감하여 이로 인한 피해는 곧 바로 작물의 생산성 감소로 이어진다(Ma et al. 2006, *J. Exp. Bot.* 57: 1097-1107). 그러나 식물은 외부 환경 스트레스에 반응하는 자체 유전자를 가지고 있어 외부 및 내부 스트레스에 대해 다양한 유전자를 발현시킴으로써 변화된 환경에 적응하며 살아간다(Hasegawa et al. 2000, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2000. 51: 463-499).

**【0004】** 최근 많은 연구자들은 환경 스트레스에 대한 유전자

들의 기능에 관심을 가지며 활발히 연구하고 있고, 많은 육종가들은 교배를 통해 품종 개량을 하여 내염성 작물을 개발하고자 많은 시도를 하고 있다. 기존의 품종개량 기술은 각각 원하는 특성을 지닌 유사한 종들을 교배하여 생성된 잡종 중 목적하는 품종만을 찾아내는 것으로, 한 품종을 개발하기 위해서는 많은 시행착오와 시간이 소요되는 것이 일반적이다. 이에 비해 유전자재조합 기술은 원하는 특성을 지닌 유전자를 다른 생물체에 직접 삽입함으로써 목적하는 품종만을 바로 얻을 수 있다. 또한 삽입하고자 하는 유전자는 같은 생물종에서뿐만 아니라 서로 다른 생물종에서도 얻을 수 있어, 품종개량의 폭이 넓은 것이 특징이며, 종래의 품종개량에 비하여 그 소요 시간이 짧다는 것 또한 장점이다.

**【0005】** 현재 유전자변형 작물에 대해 논란은 많지만 전 세계적으로 시장이 확대되고 있다. 1980년대부터 미국을 중심으로 형질전환기술이 꾸준히 개발되었고, 유전자변형 콩이 생산된 지 15년 이상이 되었다. 많은 유전자의 도입이 형질전환을 통해 시도되었고, 그 중에서도 글리포세이트(glyphosate)와 같은 제초제에 대한 저항성 및 해충 저항성이 농업적으로 널리 활용되고 있다(Stewart et al., 1996, *Plant Physiol* 112: 121-129). UN에 따르면, 세계 인구는 1997년 60억 명, 2000년 62억 명, 2010년 70억 명, 앞으로도 계속 증가하여 2070년에는 100억 명에 이를 것으로 추정되고 있다. 이러한 인구 증가로 세계의 식량 수요도 계속 증가할 것이기 때문에 유전자변형 작물의 개발은 반드시 필요하다. 따라서 분자 육종 기술을 토대로 스트레스 저항성 유전자의 조절을 통한 저항성 작물을 개발하려는 연구가 진행되고 있으며, 새로운 작물의 개발은 곧 전체 생산량의 증가를 가져올 것으로 기대하고 있다.

**【0006】** 형질전환 효율을 높이기 위한 연구는 미국을 중심으로 여러 연구실에서 경쟁적으로 진행되어 다양한 처리 조건과 실험 조건이 개선되면서 고효율의 형질전환 기술이 개발되었다(Paz et al., 2005, *Plant Cell Rep* 25: 206-213). 미국의 몇몇 실험실에서 개발된 고효율의 형질전환 기술은 기존에 사용하던 방법에 새로운 보완을 하여 이루어졌다. 국내의 경우 다른 작물과 달리 콩에 있어서는 안정적이며 고효율인 형질전환 기술을 확립하지 못하였으며, 일부 실험실에서 부분적인 성공사례는 있었으나 지속적인 결과 도출에는 실패하였다.

**【0007】** AtSZF2 유전자는 염 스트레스에 의하여 유도되는 전사 인자(transcription factor)로서 이 유전자를 식물에 형질전환하면 스트레스 때에 작용하는 많은 유전자들이 활성화되어 결과적으로 식물이 스트레스에 대해 저항성을 가지게 되는 것이다. 상기 유전자는 C3H-형 징크 핑거(C3H-type zinc finger) 단백질로 애기장대(*Arabidopsis*)에서의 염 스트레스 반응에 관련이 있으며, NaCl 처리에 의해 빠르게 일시적으로 유도된다(Sun et al., 2007, *Plant cell Physiol.* 48(8): 1148-1158).

**【0008】** 유전자를 분리하고 기능을 밝히는 연구는 많이 이루어지고 있지만 실질적으로 작물에 다른 종의 유전자를 형질 전환하여 저항성을 나타내는 형질전환체를 생산하는 것은 어렵다. 특히 형질전환 자체가 어려운 콩에 있어서는 더욱 그렇다. 염 스트레스에 관련된 유전자를 생명공학 기술을 이용하여 복제(copy) 수가 1개인 형질전환체를 생산하여, 형질전환체가 염 스트레스에 저항성을 보인다는 보고는 없었다.

**【0009】** 한국등록특허 제10-1052565호에는 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 콩 유래 RNA 헬리카제 유전자가 개시되어 있으며, 한국등록특허 제10-1049874호에는 식물체의 내염성을 증가시키는 감자 유래의 StMyb 유전자가 개시되어 있다.

#### **【발명의 내용】**

##### **【해결하고자 하는 과제】**

**【0010】** 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 애기장대 유래 AtSZF2 유전자를 이용하여 형질전환시킨 콩에서 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

##### **【과제의 해결 수단】**

**【0011】** 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtSZF2(*Arabidopsis thaliana* SALT-INDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN 2) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 AtSZF2 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

**【0012】** 또한, 본 발명은 애기장대 유래 AtSZF2 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용한 야생형에 비해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 식물체의 제조 방법을 제공한다.

**【0013】** 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

**【0014】** 또한, 본 발명은 애기장대 유래 AtSZF2 유전자를 포함하는 식물의 염 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물을 제공한다.

#### **【발명의 효과】**

**【0015】** 본 발명에 따르면, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtSZF2(*Arabidopsis thaliana* SALT-INDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN 2) 유전자를 이용하면 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 콩 식물체를 제조할 수 있으므로, 콩의 생산량 증대 및 식량 수요의 충족에 유용할 것으로 사료된다.

#### **【도면의 간단한 설명】**

**【0016】** 도 1은 콩 형질전환 벡터를 나타내는 모식도이다.

도 2는 AtSZF2 유전자가 삽입된 콩 형질전환체의 생장 과정을 나타낸 것이다.

도 3은 AtSZF2 유전자의 삽입 여부를 알아보기 위해 수행한 PCR 결과를 나타낸 것이다. 각각의 숫자는 형질전환체 라인을 나타낸다. M: 마커(marker), PC: 양성 대조군(positive control), WT: 야생형(wildtype), EV: 공벡터(empty vector).

도 4는 AtSZF2 유전자의 삽입 여부를 알아보기 위해 수행한 RT-PCR 결과를 나타낸 것이다. 각각의 숫자는 형질전환체 라인을 나타낸다. WT: 야생형(wildtype).

도 5는 AtSZF2 유전자의 삽입 여부를 알아보기 위해 수행한 서던 블로팅 결과를 나타낸 것이다. 각각의 숫자는 형질전환체 라인을 나타낸다. WT: 야생형(wildtype).

도 6은 염화나트륨의 처리 시간(0, 4, 7, 11, 14 및 16일)에 따른 야생형 및 형질전환 식물체 잎의 표현형(A) 및 클로로필 함량(B)을 나타낸 것이다. WT: 야생형(wildtype), EV: 공벡터(empty vector), 4 및 6: 형질전환체 라인.

도 7은 염화나트륨의 처리 시간(0, 1, 3, 5, 7 및 10일)에 따른 야생형 및 형질전환 어린 식물체의 표현형(A), 이온 누출률(Ion leakage)(B) 및 클로로필 함량(C)을 나타낸 것이다. WT: 야생형(wildtype), EV: 공벡터(empty vector), 4 및 6: 형질전환체 라인.

도 8은 염 스트레스와 관련된 마커 유전자의 발현을 나타낸 것이다. 각각의 숫자는 형질전환체 라인을 나타낸다. WT: 야생형(wildtype), EV: 공벡터(empty vector), GmDREB2: Glycine max dehydration responsive element binding 2, GmDREB3: Glycine max dehydration responsive element-binding protein 3, GmOLPb: Glycine max Osmotin-Like Protein b, GmERF3: Glycine max AP2/ERF(ethylene response factor) type transcription factor, GmPHD2: Glycine max GmPHD(plant-homeo-domain)-type transcription factor 2, GmGT-2A: Glycine max trihelix transcription factor(GT-2A), GmGT-2B: Glycine max trihelix transcription factor(GT-2B), GmbZIP62: Glycine max basic/leucine zipper protein 62, GmWRKY54: Glycine max WRKY-type transcription factor 54, 18S: Glycine mas 18S ribosomal RNA.

#### **【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】**

**【0017】** 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtSZF2(*Arabidopsis thaliana* SALT-INDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN 2) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 AtSZF2 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

【0018】 상기 AtSZF2 유전자는 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

【0019】 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

【0020】 본 발명에서, 상기 AtSZF2 유전자 서열은 재조합 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다.

【0021】 AtSZF2 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

【0022】 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투메파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잠종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잠종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되

고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

【0023】 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

【0024】 본 발명의 재조합 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

【0025】 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

【0026】 본 발명의 벡터를 원핵세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐

시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내 균과 균주 등이 있다.

**【0027】** 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다.

**【0028】** 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl<sub>2</sub> 방법, 하나한 방법 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

**【0029】** 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법 (Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.

**【0030】** 또한, 본 발명은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtSZF2(*Arabidopsis thaliana* SALT-INDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN 2) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 식물체의 제조 방법을 제공한다.

**【0031】** 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식

물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 의해 매개될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 본 발명의 방법에서, AtSZF2 유전자는 전술한 바와 같다.

**【0032】** 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다.

**【0033】** 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다. 바람직하게는, 상기 식물체는 쌍자엽 식물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 상기 쌍자엽 식물은 대두(*Glycine max*)이다.

**【0034】** 상기 쌍자엽 식물은 콩과(Leguminosae), 암매과(돌매화나무과, Diapensiaceae), 매화오리나무과(Clethraceae), 노루발과(Pyrolaceae), 진달래과(Ericaceae), 자금우과(Myrsinaceae), 앵초과(Primulaceae), 갯질경이과(Plumbaginaceae), 감나무과(Ebenaceae), 때죽나무과(Styracaceae), 노린재나무과, 회목과(Symplocaceae), 물푸레나무과(목서과, Oleaceae), 마전과(Loganiaceae), 용담과(Gentianaceae), 조름나물과(Menyanthaceae), 협죽도과(마삭나무과, Apocynaceae), 박주가리과(Asclepiadaceae), 꼭두서니과(Rubiaceae), 꽃고비과(Polemoniaceae), 메꽃과(Convolvulaceae), 지치과(Boraginaceae), 마편초과(Verbenaceae), 꿀풀과(Labiatae), 가지과(Solanaceae), 현삼과(Scrophulariaceae), 능소화과(Bignoniaceae), 쥐꼬리망초과(Acanthaceae), 참깨과(Pedaliaceae), 열당과(Orobanchaceae), 제스네리아과(Gesneriaceae), 통발과(Lentibulariaceae), 파리풀과(Phrymaceae), 질경이과(Plantaginaceae), 인동과(Caprifoliaceae), (연복초과 Adoxaceae), 마타리과(Valerianaceae), 산토끼꽃과(Dipsacaceae), 초롱꽃과 (Campanulaceae), 국화과(Compositae), 소귀나무과(Myricaceae), 가래나무과 (Juglandaceae), 버드나무과(Salicaceae), 자작나무과(Betulaceae), 너도 밤나무과(참나무과, Fagaceae), 느릅나무과(Ulmaceae), 뽕나무과(Moraceae), 췌기풀과 (Urticaceae), 단향과(Santalaceae), 겨우살이과(Loranthaceae), 마디풀과(여뀌과, Polygonaceae), 자리공과(상륙과, Phytolaccaceae), 분꽃과(Nyctaginaceae), 석류풀과(Aizoaceae), 쇠비름과(Portulacaceae), 석죽과(Caryophyllaceae), 명아주과(Chenopodiaceae), 비름과(Amaranthaceae), 선인장과(Cactaceae), 목련과(Magnoliaceae), 붓순나무과(Illiciaceae), 녹나무과(Lauraceae), 계수나무과 (Cercidiphyllaceae), 미나리아재비과

(Ranunculaceae), 매자나무과(Berberidaceae), 으뜸덩굴과(Lardizabalaceae), 새모래덩굴과(방기과, Menispermaceae), 수련과(Nymphaeaceae), 붕어마름과(Ceratophyllaceae), 어항마름과(Cabombaceae), 삼백초과(Saururaceae), 후추과(Piperaceae), 홀아비꽃대과(Chloranthaceae), 쥐방울덩굴과(Aristolochiaceae), 다래나무과(Actinidiaceae), 차나무과(동백나무과, Theaceae), 물레나물과(Guttiferae), 끈끈이주걱과(Droseraceae), 양귀비과(Papaveraceae), 풍접초과(Capparidaceae), 십자화과(겨자과, Cruciferae), 플라타너스과(버즘나무과, Platanaceae), 조록나무과(금루매과, Hamamelidaceae), 썩의비름과(돌나물과, Crassulaceae), 범의귀과(Saxifragaceae), 두충과(Eucommiaceae), 돈나무과(Pittosporaceae), 장미과(Rosaceae), 팽이밥과(Oxalidaceae), 쥐손이풀과(Geraniaceae), 한련과(Tropaeolaceae), 남가새과(Zygophyllaceae), 아마과(Linaceae), 대극과(Euphorbiaceae), 별이끼과(Callitrichaceae), 운향과(Rutaceae), 소테나무과(Simaroubaceae), 멀구슬나무과(Meliaceae), 원지과(Polygalaceae), 윗나무과(Anacardiaceae), 단풍나무과(단풍과, Aceraceae), 무환자나무과(Sapindaceae), 칠엽수과(Hippocastanaceae), 나도 밤나무과(Sabiaceae), 봉선화과(물봉선과, Balsaminaceae), 감탕나무과(Aquifoliaceae), 노박덩굴과(화살나무과, Celastraceae), 고추나무과(Staphyleaceae), 회양목과(Buxaceae), 시로미과(Empetraceae), 갈매나무과(Rhamnaceae), 포도과(Vitaceae), 담팔수과(Elaeocarpaceae), 피나무과(Tiliaceae), 아욱과(Malvaceae), 벽오동과(Sterculiaceae), 팔꽃나무과(서향나무과, Thymelaeaceae), 보리수나무과(Elaeagnaceae), 이나무과(Flacourtiaceae), 제비꽃과(Violaceae), 시계꽃과(Passifloraceae), 위성류과(Tamaricaceae), 물별과(Elatinaceae), 베고니아과(Begoniaceae), 박과(Cucurbitaceae), 부처꽃과(배롱나무과, Lythraceae), 석류나무과(Punicaceae), 바늘꽃과(Onagraceae), 개미탑과(Haloragaceae), 박취나무과(Alangiaceae), 층층나무과(산수유나무과, Cornaceae), 두릅나무과(오갈피나무과, Araliaceae) 또는 산형과(미나리과)(Umbelliferae(Apiaceae))일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

**[0035]** 또한, 본 발명은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtSZF2(*Arabidopsis thaliana* SALT-INDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN 2) 유전자를 포함하는, 식물의 염 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물에서, 상기 AtSZF2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다. 본 발명의 조성물은 유효 성분으로서 AtSZF2 유전자를 포함하며, 상기 AtSZF2 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시킬 수 있는 것이다. 상기 식물은 전술한 바와 같다.

**[0036]** 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단,

하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

**[0037]** 실험 방법

**[0038]** 콩 형질전환 벡터 제작

**[0039]** 포항공대 제노마인에서 Entry-AtSZF2(*Arabidopsis thaliana* SALTINDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN 2)를 분양 받았다. 상기 분양받은 Entry-AtSZF2를 목적 벡터(Destination vector)인 pB2GW7.0에 삽입하기 위해서 invitrogen사의 Gateway® LR Clonase™ Enzyme mix Kit를 사용하였다. 그 다음 invitrogen사의 DH5α를 컴피턴트 세포(competent cell)를 사용하여 형질전환하였다. 상기 제조된 pB2GW7.0-AtSZF2 벡터는 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 균주에 형질전환하였다.

**[0040]** 콩 형질전환체 생산 및 T1 종자 생산

**[0041]** 종자 소독 및 침지

**[0042]** 종자는 강염산(12 N HCl 5 ml)과 락스(12% 차아염소산나트륨 100 ml)를 혼합하여 발생시킨 염소 기체에 20시간 동안 소독을 한 뒤 1% 차아염소산나트륨에서 10분간 교반하면서 2차 소독을 하였다. 그 후 10분 간격으로 멸균수로 3 회 세척하였다. 상기 소독한 종자를 50 ml 튜브에 넣고 멸균수를 부어 20시간 동안 상온에서 침지시켰다.

**[0043]** 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 준비

**[0044]** pB2GW7.0-AtSZF2 벡터가 삽입된 아그로박테리움 튜메파시엔스 EHA105 균주를 사용하였다. 상기 균주를 고체 YEP 배지(스펙티노마이신 50 mg/l, 리팜피신 25 mg/l, 펩톤 10 g/l, 염화나트륨 5 g/l, 효모 추출물 5 g/l, 한천 1.5 % (w/v), pH 7.0)에 스트리킹(streaking)한 후 25°C에서 배양하여 생성된 단일 콜로니를 같은 항생제가 들어있는 액체 YEP 배지 10 ml에 넣고 OD650 0.8이 될 때까지 25°C에서 250 rpm으로 교반하였다. 상기 다 자란 배양액에 30% 글리세롤 저장용액을 10 ml 넣고 볼텍싱한 뒤, 1.5ml 튜브에 1ml씩 분주하여 액체 질소로 급속 냉각한 다음 -70°C에서 보관하였다. 접종 하루 전에, 상기 보관해 놓은 아그로박테리움 튜메파시엔스(컴피턴트 세포) 1ml를 항생제가 들어있는 액체 YEP 배지 200ml에 넣고 OD650이 0.8-1.0이 될 때까지 25°C에서 250 rpm으로 교반하였다.

**[0045]** 접종 당일에 액체 YEP 배지 200 ml을 50 ml씩 나눠서 20°C, 3,270×g에서 10분 동안 원심분리하였다. 각각의 튜브에 있는 아그로박테리움 튜메파시엔스 펠렛을 액체 공배양 배지(B5 염 0.32 g/l, 벤질아테닌 1.67 mg/l, MES(Nmorpholinoethanesulphonic acid) 20 mM, 지베렐린산(gibberellic acid) 0.25 mg/l, 아세토시링곤(acetosyringone) 0.2

mM, L-시스테인 3.3 mM, 티오황산나트륨(Sodium thiosulfate) 1.0 mM, DTT 1.0 mM, 수크로스 3% 및 pH 5.4)에 고농도 및 저농도로 나누어 부유시켰다. 상기 고농도 농축액은 액체 공배양 배지를 5 ml 넣고, 저농도는 액체 공배양 배지를 15 ml 넣어 만들었다.

**【0046】** 접종 및 공배양

**【0047】** 침지해 놓은 종자의 양 떡잎 사이로 수술용 칼(scalpel)을 넣어 하배측까지 수직으로 자르고 종피를 제거하였다. 배측(Hypocotyl)을 떡잎 밑 약 1 cm 되는 곳에서 자른 후, 배측이 붙어있는 한 쪽을 수술용 칼(#11 칼날)로 8~10회 정도 상처를 내었다. 이 때 수술용 칼에 5 ml 농축액을 묻힌 다음 타겟 부위에 상처를 내었다. 대략 50개 정도의 외식편(explant)을 15 ml 농축액이 든 튜브에 넣고 초음파 처리 20초, 데시케이터 및 다이어프램 펌프를 이용한 진공 처리를 30초 동안 한 뒤 30분 동안 접종시켰다.

**【0048】** 상기 외식편을 튜브에서 꺼내 멸균한 여과지 위에 놓고 물기를 제거한 뒤, 고체 공배양 배지(액체 공배양 배지와 동일, 한천 0.5 %)에도 여과지를 한 장 깔고 향배측면을 아래로(adaxial side down) 10개체를 올려두었다. 미세공(micropore)으로 봉한 뒤 25°C, 18시간의 광주기에서 5일 동안 공배양 하였다.

**【0049】** 세척 및 신초 유도

**【0050】** 5일간 공배양(co-cultivation) 후에 재균을 위해서 액체 1/2 신초유도배지(B5 염 1.6 g/l, 벤질아데닌 835 µl/l, MES 1.5 mM, 수크로스 1.5 %, 세포탁심 250 mg/l, 반코마이신 50 mg/l, 티카실린(ticarcillin) 100 mg/l 및 pH 5.6)에 10분 동안 간단히 세척하였다. 외식편을 여과지 위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발 항생제가 없는 신초 유도배지-①(B5 염 3.2 g/l, 벤질아데닌 1.67 mg/l, MES 3 mM, 한천 0.6 %, 수크로스 3 %, 세포탁심 250 mg/l, 반코마이신 50 mg/l, 티카실린 100 mg/l 및 pH 5.6)에 한 플레이트당 5개체씩 배측 부분이 배지에 고착되고 재분화될 부분이 30°C 정도의 각도로 평평한 면이 위로 향하도록(flat side up) 치상하였다. 각각의 플레이트를 미세공으로 봉한 뒤 25°C, 18시간의 광주기에서 배양시켰다.

**【0051】** 2주 후 신초가 나온 외식편을 선발 항생제가 들어있는 신초 유도배지-②(B5 염 3.16 g/l, MES 3 mM, 벤질아데닌 1.67 mg/l, 수크로스 3 %, 한천 0.6 %, 세포탁심 500 mg/l, DL-포스포노트리신(DL-phosphinothricin) 10 mg/l 및 pH 5.6)에 치상하였는데, 이 때 신초를 제외한 나머지 부분은 잘라버리고 향배측면을 아래로(adaxial side down) 치상하였다.

**【0052】** 신초 신장

**【0053】** 2주 후 갈변한 신초/신초 패드(pad)는 수술용 칼(#15 칼날)로 깎아내고 선발 항생제가 들어있는 신초 신장배지(MS 염 4.4 g/l, MES 3 mM, 지베렐린산 0.5 mg/l, 아스파라긴 50

mg/l, 피로글루타민산(Pyroglutamic acid) 100 mg/l, 인돌아세트산 0.1 mg/l, 제아틴-리보시드(Zeatin-riboside) 1 mg/l, 수크로스 3 %, 한천 0.8 %, 세포탁심 250 mg/l, 반코마이신 50 mg/l, 티카실린 100 mg/l, DL-포스포노트리신 5 mg/l, pH 5.6)에 치상하였다. 2주마다 새로운 신초 신장배지로 옮겨주면서 신초의 갈변 부위는 수술용 칼(#15 칼날) 윗면으로 제거하고 신초 패드는 조금씩 계속 깎아내어 배지가 잘 흡수되도록 하였다.

**【0054】** 뿌리 형성 및 잎 페인팅(leaf painting)

**【0055】** 신초 신장배지에서 선발을 거치면서 신장된 신초가 4 cm 이상 일 때 수술용 칼(#11 칼날)로 잘라 발근배지(MS 염 4.4 g/l, MES 3 mM, 아스파라긴 25 mg/l, 피로글루타민산 25 mg/l, 수크로스 3 %, 한천 0.8 %, 세포탁심 50 mg/l, 반코마이신 50 mg/l, 티카실린 50 mg/l, pH 5.6)로 옮겨졌다. 이때 잘라서 분리해낸 신장된 신초의 밑 부분을 1 mg/ml 인돌부틸산에 3분 동안 담가뒀다가 빼내어 발근배지가 들어있는 시편관에 넣었다. 1~2주가 경과한 후 2개 이상의 뿌리가 나오면 3차 증류수로 배지를 씻어내고 상토(바이오 프러그 2호, 홍농종묘)와 버미큘라이트를 2:1로 섞어 넣은 작은 화분(6 cm × 6 cm × 5.6 cm)에 심었다. 상기 화분은 다시 마젠타 박스(Magenta box) 안에 넣어 25°C, 18시간의 광주기에서 생장시켰다. 10일 정도 경과 후 100 mg/l DL-포스포노트리신으로 잎 페인팅(leaf painting)을 하였다.

**【0056】** 종자수확

**【0057】** 잎 페인팅으로 유전자 도입을 확인한 식물체를 큰 화분(20 cm × 20 cm × 20 cm)으로 옮겨 심고 투명한 플라스틱 덮개(12 cm × 12 cm × 18 cm)에 10 개의 작은 구멍을 만들어 씌운 후 식물체가 적당히 자랐을 때 덮개를 제거하고 종자를 수확하였다.

**【0058】** 삽입 유전자의 도입 확인

**【0059】** PCR 및 서던 분석

**【0060】** 형질전환체들의 잎은 CTAB(cetyltrimethyl-ammonium bromide) 방법을 통해서 총 게놈 DNA를 분리하였다. 도입 유전자인 AtSZF2와 선별항생제 유전자인 BAR의 서열을 이용하여 PCR을 수행하였다. 사용된 프라이머는 하기와 같다. AtSZF2-F (5'-GCA GAC GGG TCG GGT CTA AGA AGA -3'; 서열번호 2) 및 AtSZF2-R (5'-CTT GTC TCT ACT CGC TGC ACC ATT3'; 서열번호 3), BAR-F (5'-ATG AGC CCA GAA CGA CGC CC-3'; 서열번호 4) 및 BAR-R (5'-TCA GAT TTC GGT GAC GGG CA-3'; 서열번호 5)이다.

**【0061】** 또한 T-DNA의 삽입 여부를 알아보기 위해 LB(left board) 및 RB(right board) 부분도 PCR을 수행하였다. 사용된 프라이머는 하기와 같다. LB 부분은 left board-F (5'-TGG CTG GTG GCA GGA TAT ATT GTG-3'; 서열번호 6) 및 BARR (5'-AGA CAA GCA CGG TCA ACT TCC GTA-3'; 서

열번호 7)를 사용하고 RB 부분은 AtSZF2-F (5'-CAG TCT CCT GAG ATG TCT GTT ATG-3'; 서열번호 8) 및 right board-R (5'-TTA AAC TGA AGG CGG GAA ACG ACA-3'; 서열번호 9)를 사용하였다.

**【0062】** 광안콩(야생형) 및 형질전환체로부터 분리한 5  $\mu$ g 게놈 DNA를 제한효소를 이용하여 밤새 절단(overnight digestion) 하였고, 상기 절단한 DNA를 0.8% 아가로즈 겔에 전기영동하였다. 상기 분리된 DNA를 Hybond-N+나일론 막(Amersham Pharmacia, Piscataway, USA)으로 이동시켰다. 그 후, 비오틴-표지(Biotinlabeled) TPSP와 대두(soybean) AtSZF2 유전자 프로브를 이용하여 프로빙하였다. DNA 프로브 준비는 Nick Translation System(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 수행하였다. 상기 비오틴-표지된 DNA는 스트렙타비딘 알칼라인 포스파타제(streptavidin alkaline phosphatase)와 CDP-Star®(Applied Biosystems, Bedford, MA)를 이용하여 화학발광을 통해 확인하였다.

#### **【0063】 RT-PCR**

**【0064】** Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 광안콩(야생형) 및 형질전환체의 잎에서 총 RNA 추출하였다. RT-PCR은 Maxime RT-PCR PreMix (iNtRON, KOREA)를 이용하였다. 도입유전자인 AtSZF2, 선별 유전자인 BAR 및 비생물적 스트레스-반응(abiotic stress-responsive) 마커 유전자의 전사 수준을 알아보기 위해 반정량 RT-PCR을 수행하였다.

#### **【0065】 엽 스트레스 처리**

**【0066】** 광안콩 및 형질전환체의 종자를 rock wools(urmedia, Korea)에 발아시켜서 식물생장 단계(vegetative stage 2, V2-stage)까지 키웠다. 실험은 잎과 어린 식물에서 각각 수행되었다. 잎의 경우, V2-단계까지 자란 어린 식물체에서 1-마디(1-node)의 잎을 분리하여 200 mM 염화나트륨 용액이 든 플레이트에 16일 동안 띄운 후 잎 상태를 관찰하였다. 어린 식물의 경우, V2-단계까지 자란 식물체를 200 mM 염화나트륨 용액이 포함되어 있는 호아글란드 용액(Hoagland's solution)에 담구고 10일 동안 관찰하였다.

#### **【0067】 이온 누출률(Ion leakage) 측정**

**【0068】** 이온 누출률의 측정은 Lee 등(2007, plant physiology, 164, 1626-1638)의 방법에 따라 수행되었다. 서로 다른 기간 동안 엽 스트레스(200 mM 염화나트륨)를 받은 어린 식물체의 2-마디에서 잎을 분리하였다. 상기 분리한 잎을 10 mL 멸균수가 들어 있는 플레이트에 24시간 동안 담가두었다. 하루가 지난 후 플레이트에 있는 용액을 전도도계(Conductivity meter) (Model EC-400L, istek, Korea)로 측정하였다. 상기 측정값을 A라고 한다.

**【0069】** 플레이트에 있는 용액과 용액 안에 있는 잎을 100°C

에서 20분간 가열하였고 식힌 다음, 플레이트에 있는 용액을 다시 전도도계(Model EC-400L, istek, Korea)로 측정하였다. 상기 측정값을 B라고 한다. 이온 누출률은 하기와 같이 계산하였다.

**【0070】** (측정값 A/측정값 B)  $\times$  100.

#### **【0071】 클로로필 함량 측정**

**【0072】** 0.1 g 잎을 액체 질소에서 막자사발을 이용해서 분쇄한 후 80% 아세톤 1 ml 넣고 25°C에서 밤새 반응시켰다. 상기 상등액은 분광광도계를 이용하여 A663 및 A643에서 측정하였다. 클로로필 함량은 Arnon (1949, plant physiology, 24, 1-15)의 방법으로 수행하였다.

#### **【0073】 실시예 1: 형질전환 벡터 및 형질전환체의 생산**

**【0074】** 게이트웨이 시스템(Gateway system)을 이용해서 분양 받은 AtSZF2 유전자를 pB2GW7.0 벡터를 넣어서 형질전환용 벡터를 제작하였다(도 1). AtSZF2 유전자가 삽입된 형질전환체는 식물의 분화를 거쳐 11개의 형질전환체를 생산하였다(도 2).

**【0075】** T0 형질전환체에서 삽입 유전자를 확인하기 위해 PCR, RT-PCR 및 서던 블로팅을 수행하였다(도 3 내지 5).

**【0076】** PCR을 수행한 결과, 대부분의 형질전환체에서 도입 유전자인 AtSZF2과 선발항생제인 Bar의 삽입을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, LB(left board) 및 RB(right board) 부분도 증폭된 것을 확인하였다. 그리고 RT-PCR을 수행한 결과, 대부분의 형질전환체에서 도입유전자인 AtSZF2과 선발항생제인 Bar가 발현되는 것을 확인하였다. 이들 형질전환체 중에서 비교적 식물 상태가 정상적이며 종자 수도 많은 개체를 선별하여 서던 블로팅을 한 결과, 형질전환체 6번만 한 개의 복제(copy) 수를 보였고 나머지 형질전환체에서 두 개 이상의 복제(copy) 수를 보였다.

#### **【0077】 실시예 2: 엽 스트레스 처리- 잎 및 어린 식물**

**【0078】** 엽 스트레스에 대한 저항성을 관찰하기 위해, 대조군 및 형질전환체의 잎을 200 mM 염화나트륨으로 처리하였다. 그 결과, 대조군(광안콩, 공벡터)에 비하여 콩 형질전환체 4 및 6에서 엽 스트레스에 대한 저항성을 강하게 나타내었다(도 6A).

**【0079】** 또한, 16일 동안 엽 스트레스를 처리한 잎의 클로로필을 측정해 본 결과, 대조군에 비해서 콩 형질전환체 4 및 6에서 클로로필 함량이 높게 나온 것을 알 수 있었다(도 6B).

**【0080】** 분리한 잎에서 실험한 결과와 마찬가지로, 어린 식물체에서도 대조군에 비해 콩 형질전환체 4 및 6에서 엽 스트레스에 대한 저항성이 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었고(도 7A), 엽 스트레스에 따른 식물체의 손상을 알아보기 위해 클로로필 함량 분석과 이온 누출률을 측정해 본 결과, 표

현형에서 보이는 것과 마찬가지로 대조군에 비해 콩 형질전환체 4 및 6에서 식물체의 손상 정도가 낮은 것을 알 수 있었다(도 7B 및 7C).

【0081】 또한, 염 스트레스에 관련된 마커 유전자의 발현 정도는 대조군에 비해 콩 형질전환체에서 더 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다(도 8).

【특허청구범위】

【청구항 1】

애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtSZF2(*Arabidopsis thaliana* SALTINDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN 2) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 AtSZF2 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 AtSZF2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 식물의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 방법.

【청구항 3】

애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtSZF2(*Arabidopsis thaliana* SALTINDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN 2) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 식물체의 제조 방법.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 AtSZF2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 식물체의 제조 방법.

【청구항 5】

제3항의 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 상기 쌍자엽 식물은 대두(*Glycine max*)인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

【청구항 8】

제5항에 따른 식물체의 종자.

【청구항 9】

애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtSZF2(*Arabidopsis thaliana* SALTINDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN 2) 유전자를 포함하는, 식물의 염 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물.

【요약서】

【요약】

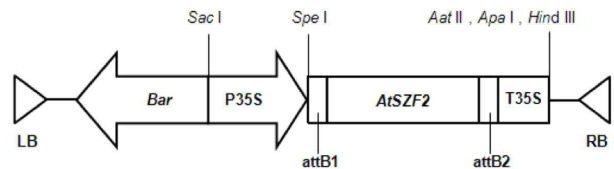
본 발명은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtSZF2(*Arabidopsis thaliana* SALT-INDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN 2) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 AtSZF2 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 방법, 애기장대 유래 AtSZF2 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용한 야생형에 비해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 애기장대 유래 AtSZF2 유전자를 포함하는 식물의 염 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물에 관한 것이다.

【대표도】

도 7

【도면】

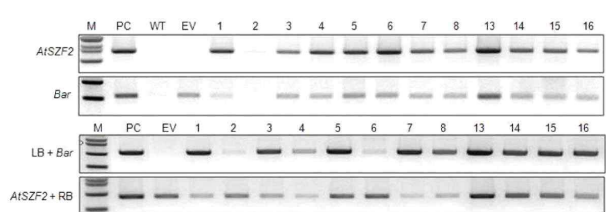
【도 1】



【도 2】

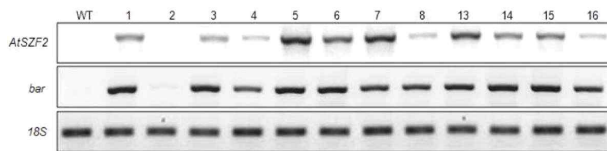


【도 3】

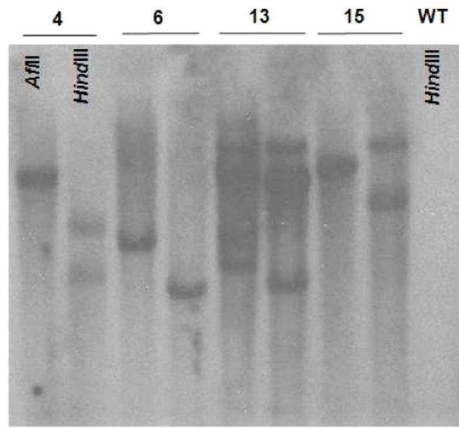




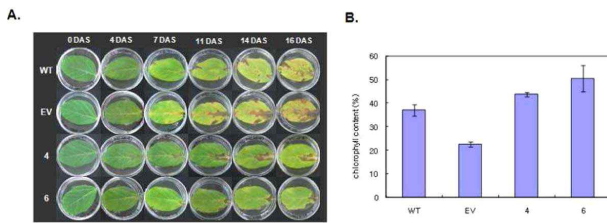
【도 4】



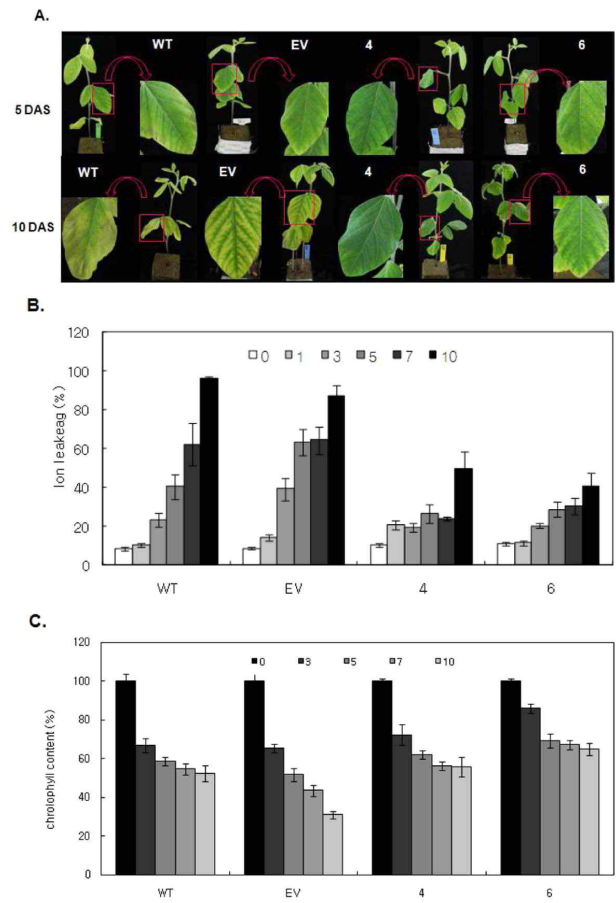
【도 5】



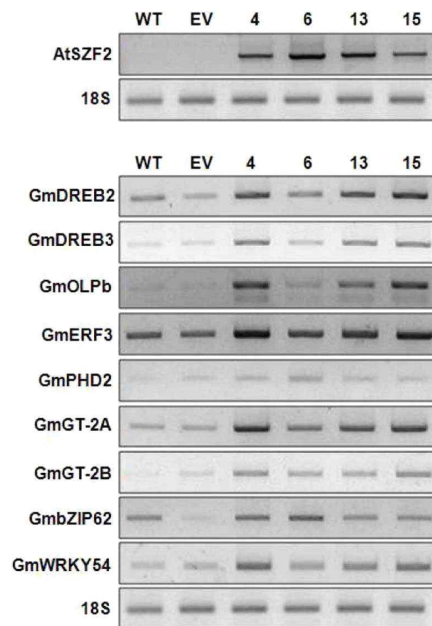
【도 6】



【도 7】



【도 8】



## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.