

발간등록번호

11-1541000-000480-01

일반과제번호: 107098-3

식물생명공학 기술을 이용한 우량 잔디 품종 개발

(Development of high quality cultivars in turfgrass through
plant biotechnology)

제노마인(주) 첨단생명공학연구소

농림수산식품자료실



0006112

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물생명공학 기술을 이용한 우량 잔디 품종 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 31일

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 : 나 형 진

연 구 원 : 김 국 진

연 구 원 : 윤 혜 리

연 구 원 : 김 혜 경

연 구 원 : 장 현 숙

협동연구기관명 : 제주대학교

협동연구책임자 : 이 효 연

협동연구기관명 : 제주대학교

협동연구책임자 : 임 평 옥

요 약

본 연구의 목적은 잔디에 기능 검정된 유용 유전자를 도입하여 녹화 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성, 그리고 왜화 유도 등과 같은 우량 형질을 나타내는 잔디 형질전환체 개발에 있다. 이후 개발된 잔디 형질전환체는 우량 품종 개발에 적용하고자 한다.

주관기관인 제노마인(주)에서 확보하고 있는 유용 유전자 중 *AtSIZ*, *ORE7* 그리고 *PAPP5*의 TPR domain을 우량 잔디 형질전환체 개발에 적용하였으며, 또한 기능성 유전체 연구를 통하여 발굴된 신규 유용 유전자 4종도 잔디 형질전환체 개발에 적용하였다. advanced RAM approach를 통한 노화관련 변이체를 screening한 결과, 2종의 노화 조절관련 변이체를 선별하였으며 이들의 유전정보는 AT-hook 단백질을 암호화하는 *ATHG1*과 아직 기능이 밝혀지지 않은 *GSDL2* 유전자인 것으로 밝혀졌다. 상기 노화조절 유전자의 유용성을 검정하기 위하여 노화 특이적 promoter를 적용하여 재조합 식물을 제작하여 기능 검정을 수행하였다. 그 결과 *ATHG1*과 *GSDL2* 둘 다 녹기 연장에 대한 표현형적 특징뿐만 아니라 스트레스 저항성도 제공함을 확인할 수 있었다. 또한 EMS mutagenesis를 통하여 발굴된 *ARF2* 유전자도 녹기연장에 대한 표현형적 특징을 제공하였다. 한편 advanced RAM approach를 통하여 발굴된 *AtGA2ox4*는 식물에서 왜성 형질을 유도하였다.

본 연구팀은 상기 유전자를 고효율 잔디 형질전환 시스템을 통하여 잔디에 도입하여 6종의 잔디 형질전환체를 생산하였으며, 이후 형질전환체의 분자생물학적, 생리·생화학적 분석을 통하여 3종의 우량 형질전환체를 개발하였다. TPR-잔디 형질전환체는 애기장대와 마찬가지로 왜화의 표현형적 특징을 나타내었으며, *AtSIZ*-잔디 형질전환체는 염 스트레스 저항성뿐 만 아니라 가뭄 스트레스에 대한 저항성도 가지는 것으로 나타났다. 또한 *ORE7*-잔디 형질전환체는 녹기연장과 염 스트레스 저항성에 대한 표현형적 특징을 가지는 것으로 밝혀졌다. 이러한 표현형적 특징을 가지는 3종의 잔디 형질전환체는 이후 우량 잔디 품종 개발에 적용하고자 한다. 한편 본 연구팀은 GMO 안정성 확보를 위하여 제초제 저항성 잔디를 대상으로 수분, 수정시기에 코발트 감마선을 조사하여 비추대형 돌연변이체를 개발하였으며, 이후 본 돌연변이체는 고부가 품종으로 개발하고자 한다.

요 약 문

I. 제 목

식물생명공학 기술을 이용한 우량 잔디 품종 개발

II. 연구개발의 목적 및 목표

연구개발의 최종 목표는 한국 자생 잔디인 들잔디(*Zoysia japonica*)에 기능 검정된 유용 유전자를 도입하여 녹화 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성, 그리고 왜화 유도 등과 같은 우량 형질을 나타내는 잔디 형질전환체 개발에 있다. 이후 개발된 잔디 형질전환체는 우량 품종 개발에 적용할 것이다.

이를 위하여 본 연구팀은

- 1) 모델식물인 *Arabidopsis*에서 유용성이 검증된 유전자 3종(노화 지연, 외부 환경 스트레스 저항성, 왜화 유도)을 기 확립된 형질전환 기술을 이용하여 잔디에 도입하고
- 2) 또한 신규 유용 유전자 3종(노화 지연, 스트레스 저항성, 왜화 유도 유전자 등)을 새로이 발굴·분리하여 잔디에 도입하고자 한다. (총 6종의 형질전환체 개발)
- 3) 개발된 잔디 형질전환체 4종을 대상으로 왜성, 녹기 연장, 환경 스트레스 저항성 형질에 대한 기능 분석을 실시하여 우량 잔디 형질전환체를 선별하여 차후 잔디 품종 개발에 적용하고자 한다.
- 4) 선별된 우량 형질전환체는 GMO 안정성 확보를 위한 방사선 조사를 실시하여 차후 고부가가치 품종으로 육성할 계획이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 기능성 유전체 연구를 통한 녹화 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성 및 왜화 유도 유전자 발굴 및 기능 검정 (6건)
 - 기 확보된 유용 유전자의 기능 재검정 (3건)
 - 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 변이체 pool로부터 녹화 연장, 환경 스트레스 저항성 및 왜화 조절 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 혹은 기 확보된 유용 유전자 추가 기능 검정 (3종)
 - 변이체 표현형 분석 및 분자·생리·생화학적 기능 조사
 - 유전자에 대한 애기장대 형질전환 loss-of function, gain-of function 변이체 표현형 및 기능 분석
 - 애기장대 형질전환체에 대한 심화 생리·생화학적 분석
- 2) 유용 유전자의 잔디 도입을 통한 형질전환체 개발 (6건)
 - 유용 유전자 잔디 도입 vector construct 제작
 - 잔디 형질전환 기법 적용
 - 형질전환 잔디의 순화, 유전자 도입 및 발현 분석

- 형질전환체 개발
- 3) 개발된 형질전환체의 기능 분석 (4건)
 - 형질전환 잔디의 1차 표현형 분석
 - 형질전환 잔디의 2차 기능 분석 (생리·생화학적 분석)
 - 형질전환 잔디의 온실 및 포장 검정
 - 우량 형질전환체를 대상으로 코발트 방사선 동위원소 조사
 - 4) 특허 및 논문 등 지적 소유권 확보 (6건)
 - 특허출원 3건
 - 논문: 3건 (국제학술지 2건, 기타 1건)

IV. 연구개발결과

본 연구의 목적은 잔디에 기능 검정된 유용 유전자를 도입하여 녹화 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성, 그리고 왜화 유도 등과 같은 우량 형질을 나타내는 잔디 형질전환체 개발에 있다. 이후 개발된 잔디 형질전환체는 우량 품종 개발에 적용하고자 한다.

주관기관인 제노마인(주)에서 확보하고 있는 유용 유전자 중 *AtSIZ*, *ORE7* 그리고 *PAPP5*의 TPR domain을 우량 잔디 형질전환체 개발에 적용하였으며, 또한 기능성 유전체 연구를 통하여 발굴된 신규 유용 유전자 4종도 잔디 형질전환체 개발에 적용하였다. advanced RAM approach를 통한 노화관련 변이체를 screening한 결과, 2종의 노화 조절관련 변이체를 선별하였으며 이들의 유전정보는 AT-hook 단백질을 암호화하는 *ATHG1*과 아직 기능이 밝혀지지 않은 *GSDL2* 유전자인 것으로 밝혀졌다. 상기 노화조절 유전자의 유용성을 검정하기 위하여 노화 특이적 promoter를 적용하여 재조합 식물을 제작하여 기능 검정을 수행하였다. 그 결과 *ATHG1*과 *GSDL2* 둘 다 녹기 연장에 대한 표현형적 특징뿐만 아니라 스트레스 저항성도 제공함을 확인할 수 있었다. 또한 EMS mutagenesis를 통하여 발굴된 *ARF2* 유전자도 녹기연장에 대한 표현형적 특징을 제공하였다. 한편 advanced RAM approach를 통하여 발굴된 *AtGA2ox4*는 식물에서 왜성 형질을 유도하였다.

본 연구팀은 상기 유전자를 고효율 잔디 형질전환 시스템을 통하여 잔디에 도입하여 6종의 잔디 형질전환체를 생산하였으며, 이후 형질전환체의 분자생물학적, 생리·생화학적 분석을 통하여 3종의 우량 형질전환체를 개발하였다. TPR-잔디 형질전환체는 애기장대와 마찬가지로 왜화의 표현형적 특징을 나타내었으며, *AtSIZ*-잔디 형질전환체는 염 스트레스 저항성뿐만 아니라 가뭄 스트레스에 대한 저항성도 가지는 것으로 나타났다. 또한 *ORE7*-잔디 형질전환체는 녹기연장과 염 스트레스 저항성에 대한 표현형적 특징을 가지는 것으로 밝혀졌다. 이러한 표현형적 특징을 가지는 3종의 잔디 형질전환체는 이후 우량 잔디 품종 개발에 적용하고자 한다. 한편 본 연구팀은 GMO 안정성 확보를 위하여 제초제 저항성 잔디를 대상으로 수분, 수정시기에 코발트 감마선을 조사하여 비추대형 돌연변이체를 개발하였으며, 이후 본 돌연변이체는 고부가품종으로 개발하고자 한다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과 목표 및 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭 등록	품종생 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표 달성	1							1	
2차년도	목표 달성	1						1		
3차년도	목표 달성	2						1		
계	목표	3						2	1	
	달성	4						3		

2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구 분
		주저자	교신저자	공동저자				
2007년 12월	Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plant	임평옥	남홍길	김유미 등	Plant Journal	52(6)	국외	SCI
2009년 3월	Production of unbolting lines through gamma-ray irradiation mutagenesis in genetically modified herbicide-tolerant <i>Zoysia japonica</i>	배태웅	이효연	김준기 등	Breeding Science	59	국외	SCI
2010년 3월	Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity	임평옥	남홍길	이인철 등	J of Experimental Botany	61(5)	국외	SCI

3. 특허출원/등록 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2007년 11월	식물~ ¹⁾	제노마인(주)	대한민국	10-2007-0115458					
2008년 11월	Poly~ ²⁾	제노마인(주)	PCT	KR2008/006679					
2010년 2월	식물의~ ³⁾	제노마인(주)	대한민국	10-2010-0011652					
2010년 2월	ATHG1~ ⁴⁾	제노마인(주)	PCT	KR2010/000767					

¹⁾식물 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도

²⁾Polypeptide inducing dwarfism of plants, polynucleotide coding the polypeptide, and those use

³⁾식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

⁴⁾ATHG1 Protein Delaying Senescence and Providing Stress Tolerance of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use

4. 연구성과 활용 계획

우리나라 잔디 생산 산업은 많은 부분을 잔디 수입에 의존하고 있으며 이러한 경제적 불균형은 국가 경제에 막대한 타격을 주고 있다. 일례로 연도별 한지형 잔디 수입 총량을 보면 1995년 약 80만 불에서 2004년 350만 불로 기하급수적인 증가세를 보이는 것을 알 수 있다. 이러한 잔디 품종의 수입은 잔디 품종의 해외 의존성이 높아 해외 상황에 따라 국내 잔디 생산이 좌우되는 문제를 초래할 뿐만 아니라 시장 자체도 흔들릴 수 있는 문제를 가지고 있다. 최근 국내에서 ‘일동중지’, ‘용천’, ‘밀록’ 등과 같은 잔디 신품종 개발에 박차를 가하고 있으나, 여전히 특정 형질을 요구하는 현대의 다양한 소비자 요구를 완전히 충족시키지 못하는 실정이다. 이와 같은 잔디 품종 생산의 해외 의존성을 줄이기 위해서는 자급자족 기반 구축이 필수적이다. 그리고 국내 농산물의 과잉 생산으로 시장 가격 안정에 어려움을 겪고 있는 만큼 농산물의 시장 질서를 교란하지 않는 작물의 발굴은 매우 중요한 사안이며, 이를 해결하기 위한 작물로 잔디의 도입은 매우 훌륭한 해결책이 될 것이다.

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

기술 개발된 우수 잔디 계통에 있어서 왜성, 녹기 연장 잔디 품종 개발은 골프장 등에 주로 적용 가능하며, 환경 스트레스 저항성 잔디 품종 개발은 불리한 환경 조건, 특히 염분이 많이 축적된 바닷가 토양 및 전체적인 온도가 낮은 고지대에 적용 가능하여 그 활용 가치가 매우 높으리라 생각된다. 이러한 잔디 품종의 산업화는 기본적으로 국내 기관 혹은 종자회사와 공동연구를 통하여 품종 개발을 수행하고 이를 통한 수익을 창출하고자하며, 지적소유권에 대한 기술 이전은 잔디 품종 개발에 집중하고 있는 종자 회사가 주를 이룰 것이며 시장에 있어서 국내가 우선이며 이후 미국, 유럽 쪽이 그 대상이 될 것이다. 대상 업체는 Monsanto, Jacklin 종자 회사, Scotts 회사 등 미국과 유럽에 위치하고 있는 여러 major 회사가 예상된다. 주관기관인 제노마인(주)는 국외 major 종자회사인 BASF와 기술이전 계약을 실시한 바 있어(2009년 12월), 유용 유전자의 기술이전에 대해 많은 장점을 가지고 있다. 이러한 국외 마케팅의 대부분은 영양 생식 잔디의 수출이 용이하지 않은 관계로 종자 생산을 목적으로 할 것이나, 이 경우 장기 프로젝트로 추진해야 할 것이다. 그리고 국내에서는 단기 프로젝트가 가능한 영양 생식 잔디 품종 개발에 집중할 것이며, 특히 삼성, 현대, LG 및 코오롱 등의 다수의 골프장을 보유하고 있는 대기업이 주 마케팅 대상이 될 것이다. 국내 마케팅의 영역은 공동 연구를 통한 품종 개발, 그리고 이를 통한 공동 사업화 등의 형태가 주가 될 것이다.

SUMMARY

The purpose of this research project is to generate valuable transgenic turfgrass by the introduction of genes displayed the useful phenomena such as delayed-senescence, stress tolerance, and control of dwarfism, and then to develop value-added turfgrass varieties with agricultural traits.

We have generated transgenic turfgrass using regulatory genes from *Arabidopsis*, *AtSIZ*, *ORE7*, and TPR domain of *PAPP5* among useful genes obtained from Genomine. And we have identified novel 4 genes through plant functional genomics to apply for the development of valuable transgenic turfgrass. To better understand the *in vivo* functions for the regulation of plant senescence, we have cloned cDNAs for genes, and generated transgenic *Arabidopsis* expressing the sense strand of the genes after the identification of 2 novel genes, *ATHG1* contained At-hook domain and *GSDL2* from advanced RAM mutants with aberrant plant senescence. *ATHG1*-, and *GSDL2*-overexpressed plants showed a highly significant delayed-senescence in the heterozygous state, leading to yield increase in the organ size and seed production. Interestingly, activation of the genes led to a highly stress tolerance under the condition of various environmental stresses. Also, the plants with repression of *ARF2* identified through EMS mutagenesis displayed phenotypic characters of delayed-senescence and oxidative stress tolerance. On the other hand, overexpression of *AtGA2ox4* identified through advanced RAM approach predominantly induced a dwarf phenotype by the regulation of genes in the leaves, but not in the roots and stems of *Arabidopsis*.

We have introduced 6 useful genes into turfgrass through transgenic technology utilizing high-efficiency transformation system, and generated valuable 3 transgenic turfgrass by various functional analysis. TPR-transgenic turfgrass displayed a dwarf symptom similar to that of *Arabidopsis*. *AtSIZ*-transgenic turfgrass showed a significant trait for the tolerance of salinity and drought stress. In addition to *ORE7*-transgenic turfgrass had phenotypic characteristics of delayed-senescence and the tolerance of salt stress. Three transgenic species with phenotypic characteristics is to apply for the development of new value-added turfgrass cultivars. One the other hand, we showed that gamma-ray irradiation-induced mutagenesis is highly effective in generating mutations in *Zoysia* grass. Using this technology, we have identified herbicide-tolerant lines with unbolting traits, which can be utilized in controlling transgene escape of GM *Zoysia* grass. This technology could also be applied in other GM plants being cultivated through vegetative propagation.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	10
Chapter 2. Current R&D status in Korea and abroad	15
Chapter 3. Contents and results of the project	25
Chapter 4. Achievement and contributions	72
Chapter 5. Products and employment planning	76
Chapter 6. References	79
[Appendix 1] Plant Journal (2007) 52 , 1140–153	84
[Appendix 2] Patent (10-2007-0115458/KR2008/006679)	98
[Appendix 3] Patent (10-2010-0011652/KR2010/000767)	111
[Appendix 4] J. of Exp. Bot. (2010) 61 , 1419-1430	127
[Appendix 5] Breeding Science (2009) 59 , 103-105	139

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	10
제 1 절. 경제·산업적 중요성 및 필요성	10
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	15
제 1 절. 국내외 기술개발 현황	15
제 2 절. 국내외 잔디 품종 특허 현황	16
제 3 절. 선행연구 결과	18
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	25
제 1 절. 연구개발수행 내용 및 방법	25
제 2 절. 잔디 품종 개량 유용 유전자 발굴	28
제 3 절. 잔디 형질전환	55
제 4 절. 잔디 형질전환체 생산 및 개발	59
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	72
제 1 절. 목표달성도	72
제 2 절. 관련분야에의 기여도	74
제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획	76
제 1 절. 연구개발 성과	76
제 2 절. 성과활용 계획	77
제 6 장. 참고문헌	79
[부록 1] Plant Journal (2007) 52 , 1140-153	84
[부록 2] 특허출원(10-2007-0115458/KR2008/006679)	98
[부록 3] 특허출원(10-2010-0011652/KR2010/000767)	111
[부록 4] J. of Exp. Bot. (2010) 61 , 1419-1430	127
[부록 5] Breeding Science (2009) 59 , 103-105	139

제 1 장 연구개발과제의 개요

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

1. 기술적 측면

[기술의 기반성]

국민 소득이 증가함과 함께 문화생활에 대한 만족도 등의 이유로 최근 급격히 수요가 증가되고 있는 잔디는 세계 4대 작물 중 하나인 옥수수 다음으로 시장 규모가 크며 약 50조 원의 규모를 가지는 높은 경제성을 지니는 경제 작물이다. 이러한 잔디는 종자번식과 영양번식이 둘 다 가능한 작물로서 육종방법 적용에 있어서 고전적인 방법과 식물생명공학적인 방법 모두를 사용할 수 있다. 그러나 형질전환 체계를 이용할 경우 형질 고정에 장기간이 소요되지 않고, 유용 유전자가 삽입된 형질전환 잔디를 포장에서 용이하게 대량증식 시킬 수 있어 형질전환 기법의 적용이 잔디품종 육성에 매우 효율적이다.

잔디는 축구장, 골프장, 공원 등의 레저 시설뿐만 아니라 도로 주변, 묘지, 하천 제방 등의 피복용으로, 그리고 주택 등의 조경용으로, 그 이용 범위는 광범위하며 점진적으로 재배면적이 증가하고 있는 추세이다. 이러한 잔디는 병충해 방제로 인한 농약 사용 및 잦은 잔디 깎기 등 시설을 유지하고 관리하는데 많은 노력이 소요된다.

이와 같이 잔디관련 산업의 규모가 증가할수록 다양한 용도로 식재가 가능하고 관리가 보다 쉬운 잔디 품종 개발은 필수적이다. 특히 들잔디는 형질의 많은 장점에도 불구하고 낮은 유전적 다양성, 낮은 종자 발아율 및 성장률 등의 문제로 인해 품종의 다양성이 낮아 이용 가치가 한정되어 있으며, 또한 6개월 정도의 녹화 기간은 품종의 다양한 상업적 이용에 많은 제한을 주고 있다. 따라서 들잔디에 대한 다양한 용도의 품종 개발이 요구되고 있으며, 특히 녹화 연장 및 내한성 등의 다양한 환경 저항성 품종 개발이 필요한 실정이다. 이와 같은 잔디 품종 개발을 위하여 교배, 선발 및 돌연변이 유기원을 이용하는 고전육종방법이 지금까지 잔디 품종개발에 많이 기여해왔지만, 현대의 다양한 소비자의 요구를 완전히 충족시키지 못하는 실정이다. 따라서 생명공학 특히 식물 유전공학 기술의 발달로 여러 가지 기법들을 품종 개량에 적용할 수 있게 된 지금, 이러한 기술을 이용한 고부가가치 잔디 품종 개발이 더욱 더 필요하리라 판단된다. 이러한 기법의 적용을 통한 잔디 품종의 우량화 및 다양화가 이루어지게 되면 향후 잔디관련 산업 발달로 인하여 재배농가 소득증대 및 잔디품종의 수입 대체 효과까지 누릴 수 있을 것이다.

일반적으로 식물 유전공학 기술인 유전공학을 통한 잔디 품종 개발은 다음과 같은 두 가지 단계로 이루어질 수 있다. 그 첫 번째는 품종 개발에 적용할 유용 표현형질을 지닌 유전자의 발굴이며, 두 번째는 유용 유전자를 잔디 품종에 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 대두되고 있다. 식물 기능성 유전체 연구(functional genomics)는 1) 식

물에 내재하는 유전자의 발현을 인위적으로 제한하여 신 기능성 형질전환 식물을 창제하고, 2) 이 기술을 적용하여 대량으로 원하는 형질의 식물체를 선발하거나, 3) 신품종 개발 산업 등에 적용되고 있는 기반 기술이며, 최근 식물체에서 대량의 유용 유전자를 발굴하기 위하여 T-DNA tagging 기술, activation tagging 기술, promoter trap 기술, 그리고 RAM approach 등과 같은 기능성 유전체 연구를 수행하고 있는 중이다. 상기의 특징에 따라 기능성 유전체 연구는 신 기능성 유전자의 대량 분리를 위한 새롭고 효율적인 방법을 제공하는 기술로서 식물생명공학 산업 전반에 공헌할 수 있는 기반 기술이다.

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 우량 품종 개발에 기여할 수 있는 유용 유전자를 다량 확보하고 있다. 그 중 하나를 예를 들어 보면, 애기장대의 전사해독 과정 혹은 대사과정 상위에서 역할을 하는 노화관련 유전자인 *ORE7*과 *ORE15*가 삽입된 변이체는 잎의 녹화 연장 또는 organ size 증가 등을 유발하여 종자 생산량이 야생형에 비해 현저하게 증가한다는 것을 확인하였으며, 이와 같은 유용 유전자의 잔디 적용은 우량 품종 개발에 있어서 환경 스트레스 저항성 및 녹화 연장 표현형질 발현이라는 측면에서 기여도가 높을 것이라고 추측된다. 한편, 협동 기관인 제주대학교 이효연 교수 연구팀은 국내 들잔디의 형질전환 기법을 확립하고 있으며, 이를 통하여 제초제 저항성 및 애기장대 유용 유전자 도입을 통한 음지내성 잔디 품종 개발을 성공하였다. 상기에서 언급한 주관기관과 협동기관의 잔디 품종개발에 관한 기술력은 본 사업의 성공에 대한 초석이 될 것이다.

[기술의 핵심성]

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

따라서 본 과제는 promoter trap, advanced RAM approach, activation tagging, 그리고 EMS mutagenesis 등과 같은 다양한 유전체 기능 연구를 통하여 확보된 애기장대의 변이체 pool로부터 다양한 환경 저항성, 녹화 연장 및 왜화 조절과 관련된 신기능성 유용 유전자를 발굴하고, 잔디에서의 활용성을 연구하며, 기능 검정된 유용 유전자를 잔디 품종 개발에 적용하여 다양한 환경 저항성, 녹화 연장 및 왜화 조절에 있어서 최적 형질을 가지는 신기능성 잔디 품종 개발을 목적으로 한다.

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

본 연구팀은 현재 공동으로 녹화 연장 및 왜화 조절 유전자를 들잔디에 적용하여 형질전환체 개발에 성공하였으며 그 표현형 분석을 수행하고 있는 중이다. 이와 같은 선행 연구는 본 사업의 성공에 대한 확신을 제공하며, 또한 사업의 조기 성공을 이끌어낼 것이다.

잔디 형질전환 기술: 잔디의 품종 개발은 전통적인 육종 방법을 이용하고 있으나, 최근 분자생물학적 방법을 이용하여 신품종 개발이 시도되고 있다. 그러나 전체적으로 아직 잔디에 대한 안정적인 형질전환에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러나 본 연구팀은 한국의 자생 잔디인 들잔디를 이용하여 아그로박테리움을 매개로 한 고효율의 안정적인 형질전환 기법을 확립하였다. 이러한 아그로박테리움 매개 잔디 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 가능한 핵심기술이다.
- 환경 스트레스 저항성 유전자: 다양한 외부 환경 스트레스는 식물의 성장 및 발달을 조절하는 중요한 환경요인으로서, 작물의 생산성 조절 등에 관여하는 결정적 환경요인이다. 이러한 환경 스트레스 조절 기술은 작물의 안정적 생산에 직결되어 있으며, 이러한 스트레스 조절 기술은 품종 개발에 있어 적용이 가능한 핵심 기술이다.
- 광 신호전달/개화 조절 유전자: 빛은 식물의 발달을 조절하는 중요한 환경요인으로서, 이에 영향을 받는 중요한 식물의 발달과정 중 하나가 광주기 변화에 의해 계절을 인식함으로써 개화 시기가 조절되는 현상이다. 이러한 개화 시기의 조절은 작물의 안정적 생산성에 직결되어 있으며, 따라서 관련 조절 기작의 이해와 유전자의 분리는 그 중요성이 크게 대두되고 있다. 또한 광 신호전달 관련 유전자의 조절에 의해 제공되는 왜화 유도 표현형은 품종 관리에 대한 편리성을 제공할 수 있는 핵심 기술이 될 것이다

2. 경제적·산업적 중요성

잔디 시장 규모는 세계 4대 작물 중 하나인 옥수수 다음으로 큰 시장으로 연간 약 50조 원 이상으로 분석되고 있다. 이중 미국의 경우, 약 30조 원, 그리고 우리나라의 경우, 약 7,500억 원으로 추정된다. 국내 잔디 산업의 시장 규모 중 잔디 생산 시장 규모는 2,000억 원, 그 중 잔디 종자 및 들잔디 때 생산 시장 규모는 각각 약 200억 원, 그리고 650억 원으로 추정되고 있다. 그런 반면 미국의 경우 잔디 종자에 대한 시장 규모는 약 5,000억 원 이상으로 보고되고 있다(표 1 참조). 이러한 사실을 통하여 잔디 품종 개발이 고부가 가치 창출이 가능한 매력적인 사업이라 예측할 수 있다.

Table 1. 잔디 산업 시장 규모

잔디 산업 시장 규모 (한국잔디학회, 2002)		
국내 잔디 산업	약 7,500억 원	잔디 생산업: 2,000억 원 이상 잔디 종자: 200억 원 이상 떼 생산: 650억 원 이상
미국 잔디 산업	약 30조 원	잔디 종자: 5,000억 원 이상
농림부 수출입 통계 (2002년 기준)		
수입	약 1,900만 불	
수출	약 6만 불	

이러한 시장 구조에 있어서 우리나라 잔디 생산 산업은 많은 부분을 잔디 수입에 의존하고 있으며 이러한 경제적 불균형은 국가 경제에 막대한 타격을 주고 있다. 2002년을 기준으로 하여 잔디 종자에 대한 농림부 수출입 통계에 의하면 수입이 약 1,900백만 달러로 수출의 약 300배가 넘는 실정이며, 이들 수입의 대부분은 골프장 관련 잔디 품종인 한지형 잔디류로 나타났다(Table 1 참조). 이러한 수입에 의한 잔디 종자 생산 및 판매는 신품종의 보호와 권리에 관한 국제적 협약인 UPOV (international Union for the Protection of New Varieties of Plants) 제도의 2007년 시행 예정으로 막대한 로열티 등을 지불해야 하는 불이익을 일으킬 것이다. 이러한 수출입에 대한 불균형 비는 우량 잔디 품종 개발을 통하여 해소될 수 있으리라 판단된다. 외래종 잔디 품종의 수입은 국내 환경 및 여러 가지 제약에 의해 국내 품종화하기에는 보다 많은 시간이 소요될 것인 반면, 국내에서 우량 품종을 개발하면 이러한 시간적 제약을 줄일 수 있을 것이며, 또한 표현형이 우수한 우량 품종의 개발은 국외 시장 개척에도 많은 장점을 제공할 것으로 판단된다. 따라서 형질전환을 통한 우량 잔디 품종 개발은 사업적 고부가가치 및 국가 경쟁력 확보 등에 있어서 필수적인 요인으로 확신한다.

한편, 21세기 식물생명공학 산업은 야생종을 비롯한 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 이용가치가 있는 유용유전자 발굴과 이들 산물의 경쟁이 가속화 될 것이다. 미국의 경우, 유용유전자 특허 신청수가 1991년 4,000건에서 5년 사이에 100배 이상으로 증가하였고, 향후 기하급수적인 증가 추세를 보이고 있다. 식물유전자의 지적소유권에 대한 경우, 2000년 약 4,000 건의 특허등록이 되어있으며 특허등록 건수의 약 10배 정도로 유전자에 대한 특허출원을 진행 중에 있는 실정이다.

식물 생명공학 기술은 식물의 신품종 혹은 신기능성 작물 개발 산업뿐만 아니라 식품산업, 화학공업, 제지 산업 나아가 향후 유관 산업인 환경 정화 및 치유 산업, 식물 유래의 약품 및 chemical 산업, 농업관련 유전자 판매 사업으로 그 응용 범위가 확대되고 있으며 이러한 산업의 개발에는 식물 기능성 유전체 연구가 필수적이다. 현재 이와 같은 기능성 유전체 연구 기술을 통하여 농업용 신품종, 공업용 신기능성 식물 제품 등이 개발 되어 상품화 되고 있으며 (Gene Engineering News 1997. 11. 1) 이러한 산업화에는 기능성 유전체 연구를 통한 신 기능성

유전자의 발굴 기술이 주요 관건이다.

Table 2. 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

이러한 유용 유전자의 경제작물로의 도입은 특수 목적 혹은 기능성 맞춤 식물의 개발을 통한 고부가 가치 창출이 가능할 것이다. 유전자 변형 작물 시장규모를 2010년경에는 약 250억불로 추정하고 있으나 앞서 언급한 고부가 가치 작물을 개발한다면 그 시장 규모는 훨씬 커질 것으로 추정된다(Table 2 참조).

따라서 본 사업에서는 녹화 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성, 그리고 왜화 조절 등에 관련된 유용 유전자를 애기장대로부터 발굴하고 이에 대한 지적 소유권을 확보하여 우량 잔디 품종 개발에 적용하고자하며 유용 유전자에 대한 지적소유권의 확보는 잔디 품종 개발뿐만 아니라 다른 작물에도 적용이 가능하여 그 활용 가치가 높으며 또한 고부가 수익 창출로 인한 농업의 발전에 일조할 수 있을 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내외 기술개발 현황

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

최근 국내외 잔디 품종 개발에 있어서 거의 대부분은 기능성 신품종 개발 쪽으로 방향성을 잡고 품종 개발에 집중하고 있다. 특히 제초제 저항성 잔디 개발이 가장 보편화된 기술 개발로 들 수 있으며, 최근 표현형이 확실한 우량 잔디 품종, 예를 들면 왜소형 잔디 품종, 다양한 biotic 그리고 abiotic 스트레스 저항성 잔디 개발에 많은 투자를 하고 있는 실정이다. 이러한 예로 애기장대의 *AtGA2ox1* (지베렐린 분해효소를 암호화하는 유전자)를 목초용으로 사용하는 바이하(Bahiagrass) 잔디에 도입시킨 연구결과가 보고된 바 있으며(Plant Biotechnol J, 2007), 이와 같이 *AtGA2ox1* 유전자가 도입된 형질전환 바이하 잔디는 측지가 잘 발달하고 왜성의 표현형을 나타내었다.

국내의 경우, 건희, 건우 세녹, 안양중지 품종 등과 같이 교배를 통한 품종 개발이 초기에 주를 이루었으나, 최근 협동연구기관인 제주대의 제초제 저항성 들잔디 품종 개발, 금호연구소의 음지내성 품종 개발, 삼성 잔디환경연구소의 형광 잔디 개발 등과 같은 형질전환 기술을 통한 우량 품종 개발에 많은 노력을 기울이고 있는 중이다.

국외의 경우, 잔디 품종 개발의 많은 부분이 형질전환 기술을 통한 유전자 변이 잔디 품종 개발에 집중하고 있으며, 특히 제초제 저항성, biotic/abiotic 스트레스 저항성 등과 같은 기능성 잔디 품종 개발에 집중하고 있다. 또한 잔디 관리의 편리성을 제공하는 크리핑 벤틀그라스의 기능성 품종 개발에도 많은 연구를 집중시키고 있는 중이다. 이러한 품종 개발에 대한 동향 및 사례를 아래 Table 3에서 제시하였다.

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.

Table. 3. 식물 유전공학 기법을 이용한 잔디 품종 개발에 대한 동향

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

애기장대에서 발굴한 유용 유전자의 고부가가치 작물 개발에 대한 적용은 다양한 작물에서 알려지고 있다. 애기장대 *PHYB* 유전자 도입으로 감자에서 광합성 효율 및 기공의 conductance 증가를 유발하여 high intensity 조건하에서 tuber number 및 yield의 증가가 유발되었으며 이러한 표현형을 가진 고부가 형질전환 감자 품종 개발에 집중하고 있다(Boccalandro *et al.*, 2003). 또한 미국의 Texas Tech. Univ.와 Univ. of California Davis 연구팀은 애기장대의 vacuolar sodium/proton antiporter 유전자인 *AtNHX1*을 면화에 도입하여 salt stress에 대한 저항성뿐만 아니라 필드에서 보다 양질의 fiber 생산량 증가 표현형을 가지는 우수 면화 품종 개발에 집중하고 있다(He *et al.*, 2005). 그러나 전체적으로 잔디의 품종 개량에 대한 유용 유전자의 적용은 아직 미미한 실정이다. 최근 국내에서 송필순 박사 연구팀은 애기장대 유전자인 *PHYB*를 잔디에 도입하여 음지내성형 고부가 잔디 품종 개발에 집중하고 있다. 이는 애기장대 유전자 도입을 통한 잔디 품종 개발의 성공 가능성을 제시해주고 있는 중요한 연구 사례인 것으로 판단된다.

제 2 절. 국내의 잔디 품종 특허 현황

잔디 산업관련 특허 출원 건수를 조사한 결과, 유럽, 일본 그리고 한국의 순서로 특허 건수가 많은 것으로 나타났으며, 특히 흥미로운 점은 일본의 특허 건수가 미국보다 많다는 점이다. 그리고 국외의 특허 출원 분야에 있어서 우리나라와 달리 잔디 품종 및 생산에 관련된 기술 확보가 높은 것으로 조사되었다(Table 4, 5 참조). 이러한 사실은 국내 잔디 산업이 품종 개발 및 생산 등과 같은 원천 기술 확보에 미진한 것으로 나타나며, 이러한 결과는 이후 UPOV 제도 시행으로 많은 불이익을 당하게 될 것이다.

그리고 Table 4와 5에서 보듯이, 국내 잔디 품종 출원 건수는 35건인 반면 국제(PCT) 출원 건수는 9건에 지나지 않는다. 이러한 사실은 거의 대부분의 품종 개발이 국내용으로만 진행되고 있거나, 혹은 많은 특허 출원 건수가 상업화가 가능한 기술 개발이 아니라는 것을 보여주고 있다. 특히 국내 잔디 관련 특허 기술사업화율은 5% 미만으로 나타났으며, 특히 신품종에 대한 특허 기술사업화율은 0.13%로 거의 모든 신품종에 대한 특허 출원은 사업화가 이루어지지 않은 것으로 나타났다. 따라서 본 사업에서는 녹화 연장 및 다양한 환경 저항성 유용 유전자를 잔디 품종 개발에 적용하고, 개발된 형질전환체에 대한 지적소유권을 확보하여 잔디 기술 개발에 있어 원천기술에 대한 국가 경쟁

력 강화에 일조하고자 하며, 이를 통해 개발되는 품종을 통하여 수출 등과 같은 고부가 수익 창출로 인한 국가 농업 발전에 기여할 수 있을 것이다.

Table 4. 국내외 잔디 관련 특허 출원 건수 (2005년 10월)

검색어	건수 ^Z			
	미국	일본	유럽	국제출원(PCT)
Turf	759	842	941	146
Sod	411	363	438	150
Turf+Production *	-	-	-	-
Turf+Seed	54	80	70	9
Turf+Disease	26	22	27	2
Turf+Disease+Pesticide	4	6	2	2
Turf+Cultivar	60	46	57	8
Turf+Fertilizer	11	48	14	2
Turf+Athletic field	14	9	7	3
Turf+Construction	29	67	45	7
Turf+golf course	52	74	51	10
Turf+management	7	8	5	1
총 계	1,420	1,557	1,652	339

^Z : 한국특허기술정보 검색결과(www.kipris.or.kr).

* Turf+Production 검색 결과가 없었음.

Table 5. 국내 잔디 관련 특허 출원 건수 (2005년 10월)

검색어	건수 ^Z	비율(%)
잔디+잔디재배	27	0.90
잔디+ 신품종	35	1.10
잔디+잔디병해충	1	0.04
잔디+비료	866	29.4
잔디+시공방법	102	3.50
잔디+경기장	2	0.06
골프장 잔디	2	0.06
잔디관리 방법	1	0.04
기타	1,902	64.9
총계	2,938	100

^Z : 한국특허기술정보 검색결과(www.kipris.or.kr)

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

1. 잔디 형질전환 기술 개발 및 형질전환체 개발 (협동 기관)

본 과제의 협동 기관인 이효연 교수 연구팀은 들잔디 형질전환 체계를 이미 확립하여 논문으로 발표한바 있다(Toyama *et al.*, *Molecules and Cells*, 2003). 또한 비선택성 제초제인 BASTA에 대한 저항성 유전자(*bar*)를 갖고 있는 제초제 저항성 들잔디를 개발하여 국제특허도 보유하고 있다(Figs. 1 and 2). 이 잔디는 현재 ‘제주그린21’이라는 이름으로 환경위해성 평가 마무리 단계이며 상업화를 위한 준비를 하고 있다.

또한 이효연교수 연구팀은 한국형 잔디인 들잔디 형질전환 시스템 확립과 더불어 한지형 잔디인 벤투그라스의 형질전환 시스템도 확립하여 애기장대의 스트레스(drought, cold) 내성 유전자인 *ABF3*를 한지형 bentgrass 중 하나인 *Agrostis mongolica* Roshev.에 도입시켜 스트레스 저항성 유도에 성공한 바 있다(Enkhchimeg *et al.*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2006).

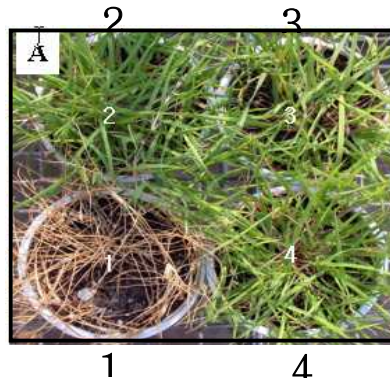


Fig. 1. 바스터 저항성 잔디 표현형. 바스터를 살포 후 아생종 (1)과 형질전환 잔디 (2, 3, 4)의 표현형.

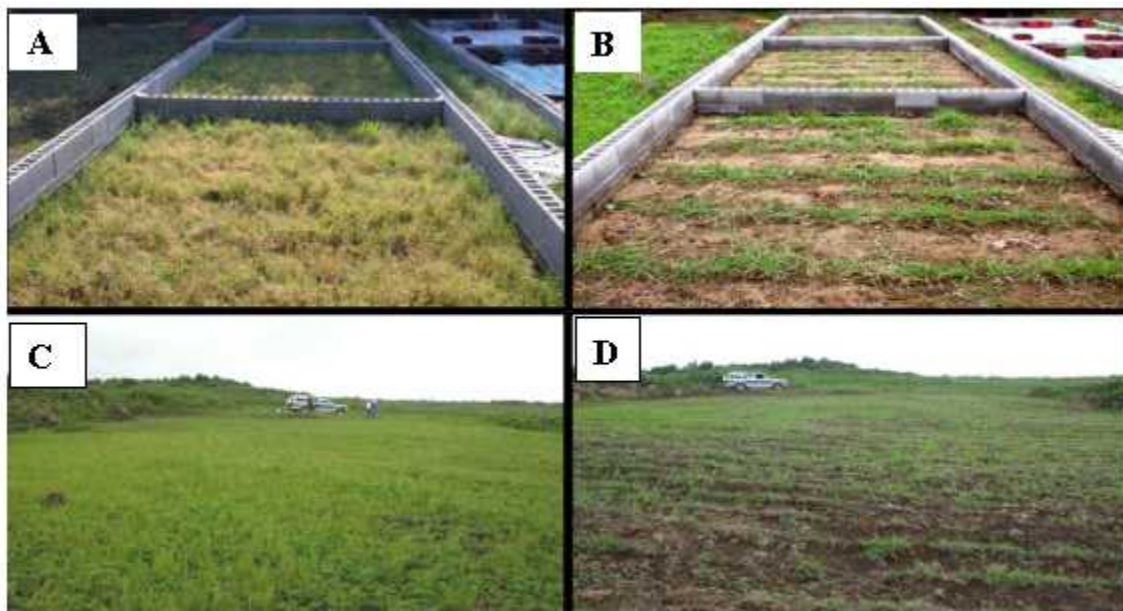


Fig. 2. 제주도 남제주군 남원 포장에서 실시된 바스터 저항성 실험. 왼쪽(A, C)은 바스터 살포 전이고, 오른쪽(B, D)은 바스터 살포 후의 모습. 바스터 저항성 잔디만 생존.

2. 기능성 유전체 연구 및 이를 통한 잔디 품종 개발 적용 유전자 확보 (주관 기관)

[기능성 유전체 연구]

제노마인(주)는 식물의 기능성 유전체 연구를 통하여 농업에 직접 이용 가능한 식물 유용 기능성 유전자의 대량 발굴을 수행하고 있으며, 여기에 gene expression profiling 기법인 plant proteomics를 접목하여 유전자의 기능을 효율적으로 밝히고 있는 중이다. 이러한 다양한 기법의 기능성 유전체 연구를 통하여 유용 기능성 유전자의 발굴을 신속·정확하게 수행할 수 있으며, 특히 식물 proteome 분석을 통하여 후보 유전자의 생체 내 gene networking을 밝힐 수 있는 장점을 가지고 있다.

본사에서 식물의 기능성 유전체 연구에 사용된 기법에 대하여 아래에서 간략하게 소개하고자 한다.

Activation tagging

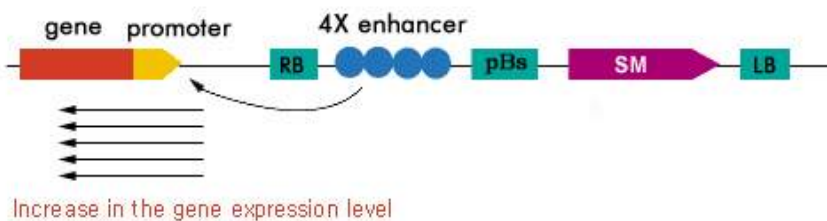


Fig. 3. activation tagging 기법의 기본적인 원리

- 특성: 1. 변이체의 표현형이 우성으로 발생 초기에 쉽게 변이체를 동정할 수 있다.
 cf. insertional mutagenesis는 변이체의 표현형이 열성으로 나타남.
 2. 병원균 및 스트레스 저항성 유전자를 쉽게 발굴할 수 있다.
 3. Plasmid rescue 등을 통하여 쉽게 유전자 기능을 테스트할 수 있다.

Promoter trap 기법

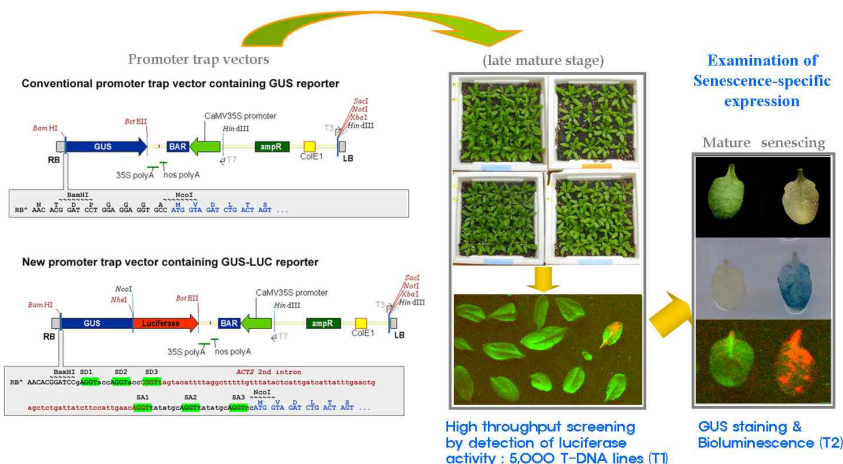


Fig. 4. Promoter trap vector 개발 및 high throughput screening 적용. 작용원리: T-DNA의 right border 혹은 left border 근

처에 reporter 유전자의 coding region을 조합하고 여기에 유전자를 분리할 때 사용하는 유전자를 붙인 운반체(vector)를 연결한다. 식물의 형질전환으로 T-DNA가 염색체에 삽입될 때 insertion 부위의 genome 서열에 영향을 받아 reporter 유전자가 발현되고 특이적인 발현이 확인된 형질전환체로부터 plasmid rescue, inverse-PCR 혹은 Tail-PCR 등의 방법을 이용하여 tagging 되어진 유전자를 분리할 수 있다.

RAM (random antisense mutagenesis)

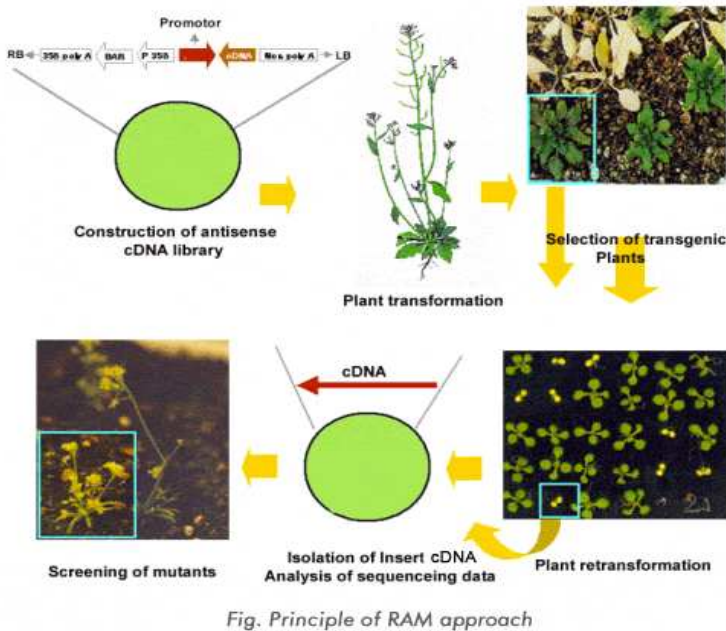


Fig. 5. RAM approach의 기본원리

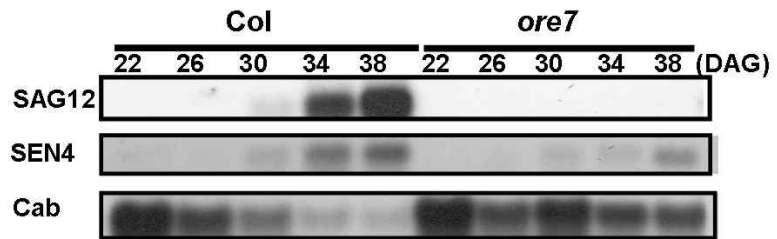
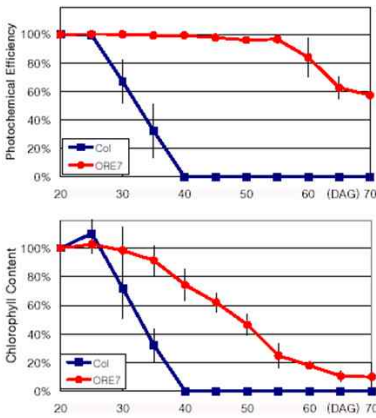
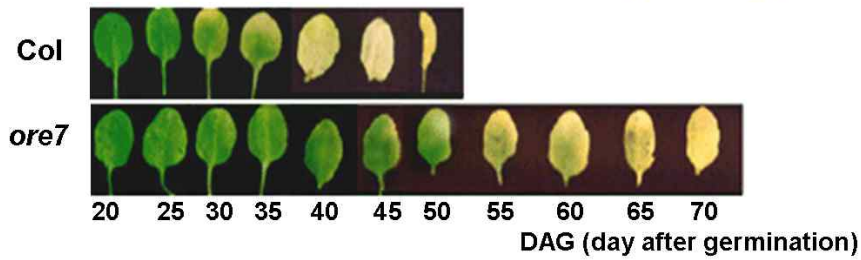
- 특성: 1. 변이체의 표현형이 우성으로 발생 초기에 쉽게 변이체를 동정할 수 있다.
 cf. insertional mutagenesis는 변이체의 표현형이 열성으로 나타남.
 2. Multigene family에서도 *in vivo* 상태로 특정 유전자의 기능을 동정할 수 있다.
 3. 필수 유전자의 antisense disruption은 변이체의 회복되지 않는 치사를 이끌 것이다.
 그러므로 inducible vector의 사용이 필수적이다.
 4. Simple PCR method를 통하여 쉽게 유전자를 cloning할 수 있다.

[다양한 환경 스트레스 저항성 관련 유용 유전자 발굴에 대한 연구 동향]

내부 스트레스 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 유전자들이며, 이러한 노화 관련 유전자의 중요한 점은 잎의 노화를 지연과 동시에 내부 스트레스 저항성을 제공함으로써 잎의 녹화 연장이라는 표현형 발현을 통하여 잔디 품종의 고부가 가치 창출이라는 측면에서 기여도가 높을 것이다.

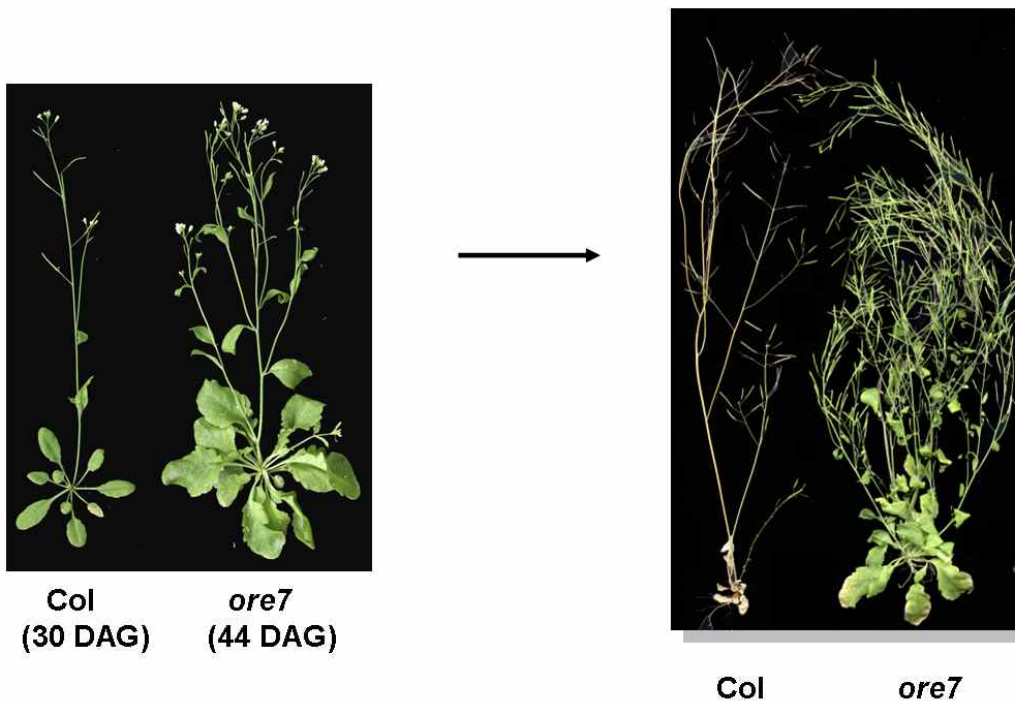
ORE7

❖ The age-dependent senescence phenotype



Increased leaf longevity during age-dependent senescence

❖ The extended shelf life of ore7 cut flower



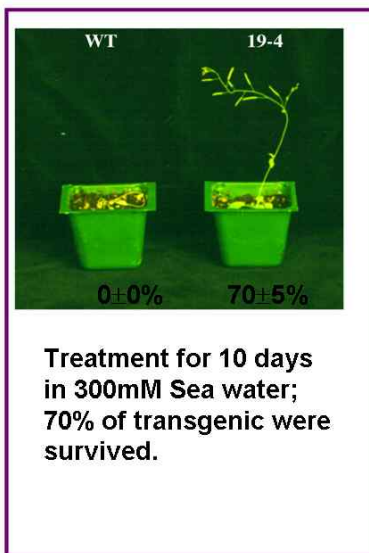
Overexpression of ORE7 induces the yield increase of higher plants as well as increased leaf longevity during age-dependent senescence.

외부 환경 스트레스 조절 유전자: 본사에서 지적소유권 등으로 확보하고 있는 복합 환경 스트레스 저항성 관련 유용 유전자는 내건성, 내한성, 내염성 관련 유전자로 *AtSIZ* 및 *AtSIK* 등을 들 수 있다. 이러한 외부 복합 환경 스트레스 조절 유전자는 외부 여러 스트레스에 대한 저항성을 제공함으로써 잎의 안정적인 생산성 제공 및 환경적 제한 요인에 대한 저항성 제공으로 보다 넓은 식재 공간이 가능함으로써 잔디 품종의 다양한 적용이라는 측면에서 기여도가 높을 것이다.

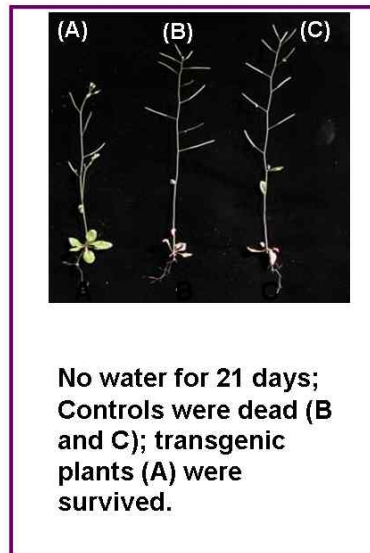
AtSIZ and *AtSIK*

Stress-tolerance related genes

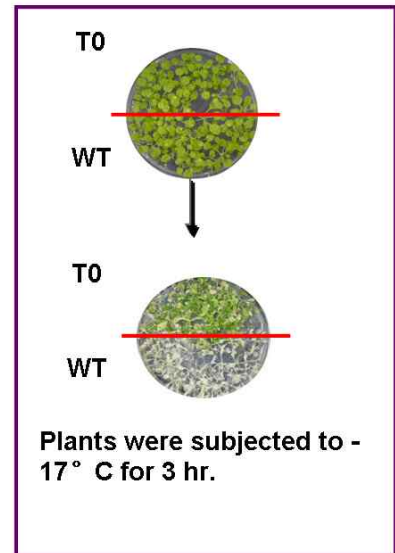
Salt tolerance



Drought tolerance



Cold tolerance



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 잔디 품종 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것이다.

3. 유용 유전자 도입을 통한 잔디 품종 개발 (주관 및 협동 기관 공동연구)

주관 기관인 제노마인(주)과 협동 기관인 제주대는 공동으로 잔디 관리가 용이한 왜화형 잔디 품종을 개발하기 위하여 주관 기관이 확보하고 있는 왜화 유도 유전자(Fig. 6 참조)를 협동 기관이 보유하고 있는 잔디 형질전환 기술(Fig. 7 참조)에 적용하여 형질전환체 개발을 수행하였으며(Fig. 8, 9 참조), 연구팀은 이러한 형질전환체의 외래 유전자 발현 분석 연구를 수행하였다(Fig. 10 참조).

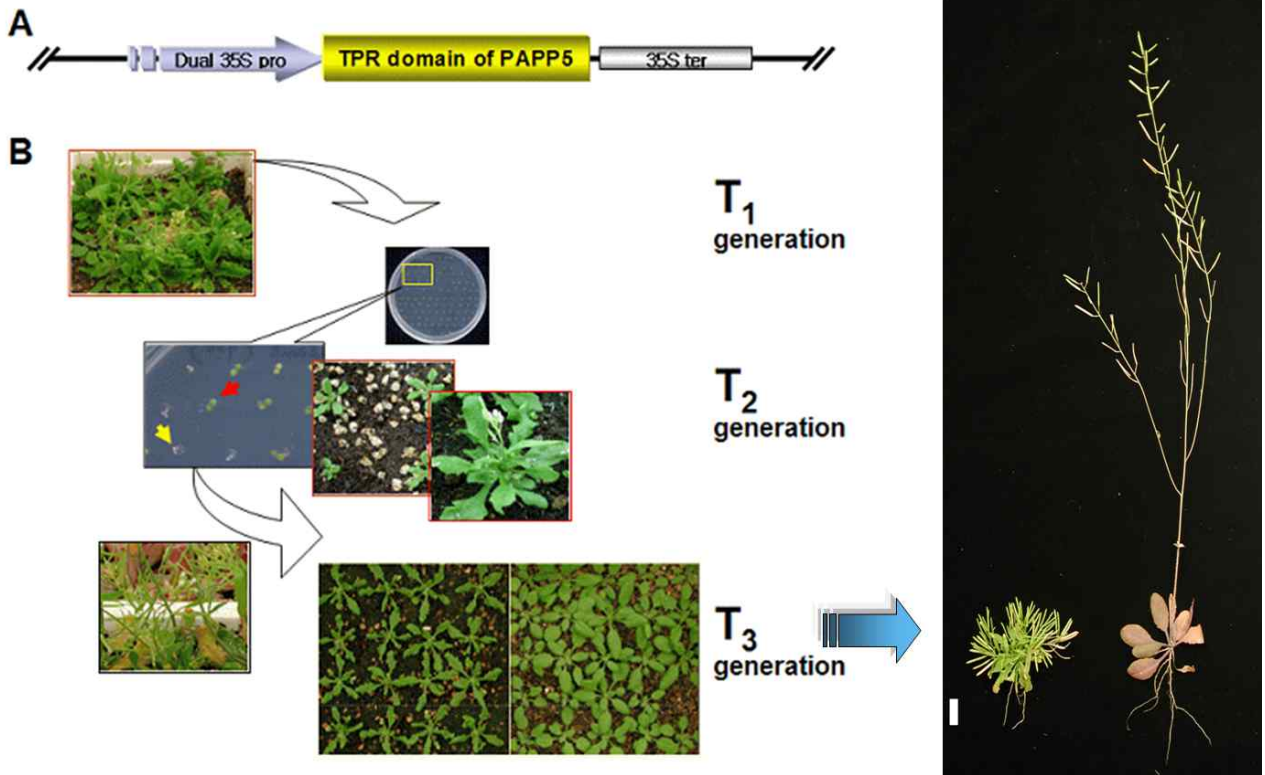


Fig. 6. PAPP5 유전자의 TPR domain 과발현을 통한 애기장대의 표현형질

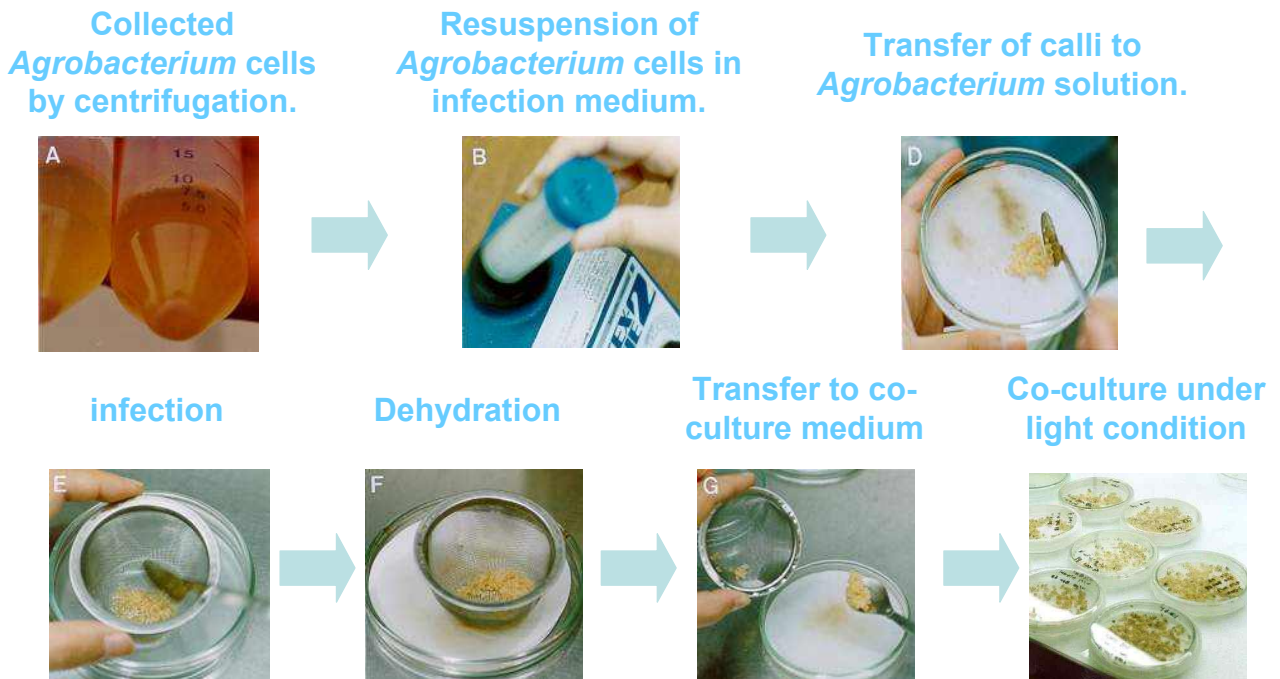


Fig. 7. 확립된 잔디 품종의 형질전환 기술 기법

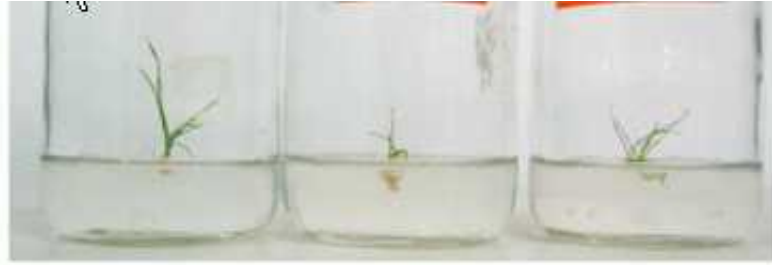


Fig. 8. PAPP5 유전자의 TPR 영역을 포함하는 아그로박테리움을 들잔디의 캘러스에 감염시킨 후 선발배지에서 배양과정을 통해 형성된 잠정 형질전환 shoot.



Fig. 9. 온실 순화 중인 잠정 TPR-형질전환 들잔디 식물체

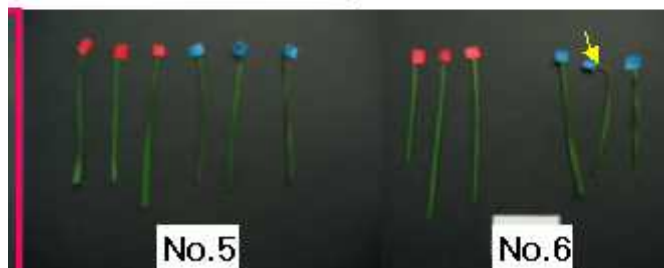
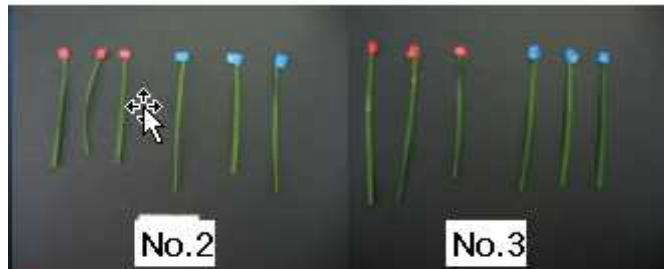
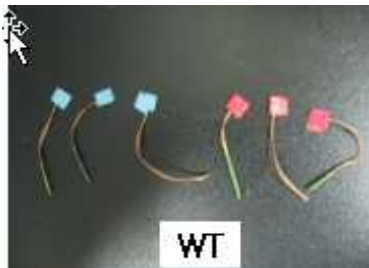


Fig. 10. TPR-형질전환체의 바스터 저항성 분석. 바스터 살포 후 형질전환 잔디 (2, 3, 5, 6)는 모두 생존한 반면 야생종 잔디 (WT)는 모두 괴사되었음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발수행 내용 및 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
잔디 품종 개량 유용 유전자 발굴	<ul style="list-style-type: none"> · Plant Functional genomics · Direct approach 	<ul style="list-style-type: none"> · Activation tagging, promoter trapping, advanced RAM approach, chemical mutagenesis · 변이체 선별 · 후보 유전자 발굴 및 기능 검정
우량 형질전환 잔디의 개발	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환 · 형질전환 잔디의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> · 유용 유전자에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 · 잔디 형질전환 기법 · 형질전환체 선별 및 재분화
형질전환 잔디의 기능 연구	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환체 유전자 발현 분석 · 형질전환체 기능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> · PCR/Southern blot/RNA gel blot 등 · 왜성/녹기 지연/복합 저항성에 대한 표현형

1. Plant Functional Genomics

본 사업에서 적용한 식물의 기능성 유전체 연구 기법은 주관기관인 제노마인(주)에서 확보하고 있는 activation tagging, promoter trapping, advanced RAM approach 및 chemical mutagenesis 등을 들 수 있으며 그들의 원리 및 방법은 Figs. 3-5에서 제시하였다.

2. 변이체 선별

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

3. 후보 유전자 발굴 및 기능 검정

확보된 변이체로부터 각 기법에 적절한 방법을 통하여 유전자 정보를 확보하고 이중 녹화 연장, 다양한 환경 스트레스 저항성, 그리고 왜화 조절 등과 관련된 신기능성 유용 유전자의 가치를 가지는 유전자를 선별한다. 일반적으로 activation tagging 변이체 pool에서 확보된 변이체

의 유전자 분리는 주로 TAIL-PCR을 수행하여 얻어지며, promoter trapping 변이체 pool에서 확보된 변이체의 유전자 분리는 plasmid rescue를 통하여, 그리고 advanced RAM 변이체 pool에서 얻어진 변이체의 유전자 분리는 INVERSE-PCR을 통하여 얻어진다.

선별된 유전자의 기능을 재검정하기 위하여 reverse genetics를 적용한다. 이러한 연구를 통하여 얻어진 유전자의 gain-of-function과 loss-of-function 변이체의 표현형을 재확인하고, 그들의 표현형질에 대한 생리·생화학적 현상을 구명한다. 특히 reverse genetics를 통하여 얻어진 변이체의 생리·생화학적 연구는 그 분야의 전문가에게 많은 자문과, 가능하면 공동연구를 통하여 유전자의 기능을 강화하고자 한다.

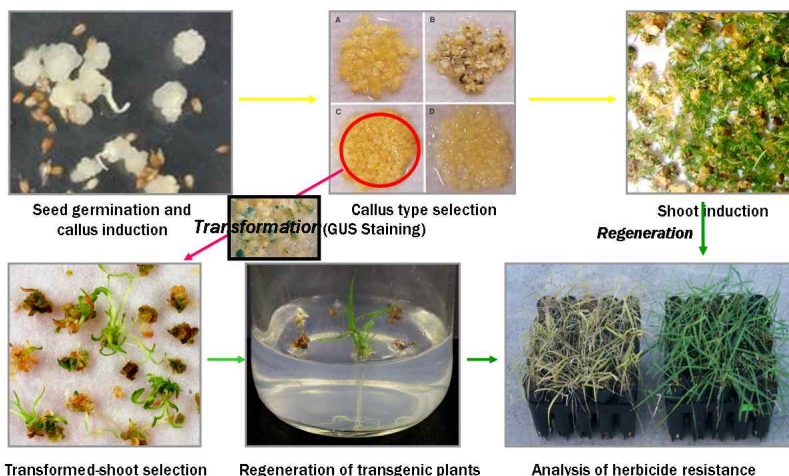
노화 지연과 같은 내부 환경 스트레스 저항성 관련 변이체의 기능 검정은 우선 녹화 연장과 관련된 사항으로 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하며 또한 분자생물학적 분석은 노화시 발현이 증가되는 유전자를 indicator로 하여 유전자 발현을 분석하여 조사한다. 이와 더불어 내부 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 암처리 뿐만 아니라 methyl jasmonate, ABA, ethylene, oxidative stress (H₂O₂ 등) 등에 대한 반응도 조사한다.

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 조사한다.

4. 잔디 형질전환 기법

고효율의 재생력을 지닌 잔디의 종자유래 캘러스 분화조건으로 유전자 형질전환용 재료로서 유지, 증식한다. 유용 유전자가 포함된 플라스미드가 들어있는 아그로박테리움과 잔디 캘러스를 10일간 공동배양한 후 cefotaxime으로 agrobacterium을 제거시킨다. 균이 제거된 캘러스는 1 mg/L의 bialaphos가 첨가된 shoot 유도 배지에 치상하여 2주간 배양시킨 후 2.5 mg/L의 bialaphos가 첨가된 배지로 옮겨 다시 2주 간 배양시킨다. 선별된 shoot는 3 mg/L의 bialaphos가 첨가된 뿌리 유도 배지에 치상하여 1~2개월 동안 배양시킨 후 순화과정을 거쳐 온실 내에서 재배한다(Fig. 7 참조).

5. 잔디 형질전환체 선별 및 재분화



6. 형질전환체의 도입유전자의 확인 및 발현 분석

개발된 형질전환 잔디를 대상으로 도입 유전자의 존재여부를 확인한다. 일차로 도입유전자(선발 마커 및 목표유전자)에 대한 genomic PCR을 수행한다. Genomic PCR 결과 positive로 확인된 형질전환잔디에 대해서 도입유전자의 발현 분석을 실시한다. 목표 유전자의 발현분석은 total RNA로부터 1차 cDNA를 제조한 후 PCR을 수행하여 확인한다. 또한 선발마커로 사용한 제초제저항성 유전자의 경우 해당유전자의 항체를 포함하는 strip을 이용하여 확인이 가능하며 이후 western blot 분석을 통해 단백질수준에서 유전자 발현분석이 가능하다.

7. 형질전환체의 왜성/녹기 지연/복합 저항성에 대한 표현형 및 기능 분석

개발된 형질전환 잔디는 온실실험, 포장실험을 통해 그 표현형(왜성, 환경스트레스 저항성, 녹기 연장 등)을 분석하여, 실용화의 가능성을 탐색한다. 스트레스 저항성 및 녹기 연장 표현형을 정량적으로 측정하기 위해 광합성 효율, 엽록소 함량, 개체 생존율 등을 분석한다. 이와 같은 표현형 검정을 통해 선별된 품종들의 생리·생화학적 기능 분석을 통하여 우량 잔디 형질전환체를 개발할 계획이다. 아울러 들잔디의 경우 지표식물로 재배되기 때문에 형질전환된 들잔디에 코발트 등으로 돌연변이 처리를 하여 꽃가루가 비산되지 않는 GMO 안정성 식물을 개발한다.

제 2 절. 잔디 품종 개량 유용 유전자 발굴

1. 기확보 유전자 기능 재검정

가. *PAPP5* 유전자의 **TPR domain**: *PAPP5*의 TPR 도메인의 기능을 재검정하기 위하여 우성 음성 돌연변이(dominant negative mutation)를 통한 역 유전적 접근(reverse genetic approach)을 이용하였다. TPR 도메인 코딩 부위를 증폭하여 pNB96 벡터에 클로닝하였다. 제조된 벡터를 pNB96-TPR' 이라 명명하였다(Fig. 11). pNB96-TPR 벡터를 전기충격법으로 아그로박테리움 *AGL1*에 도입한 후, 화기 수침 방법에 따라 형질전환된 아그로박테리움으로 애기장대를 형질전환시켰다. 25 μ g/ μ l의 DL-PPT (Duchefa Biochemie BV)를 이용하여 형질전환 식물을 선발하였다. 이후, DL-PPT 저항성의 분리를 토대로 하여 상동형 T3 종자들을 분리하였다. T3 식물체들을 백색광 하에서 배양한 결과, 상기 식물체들은 야생형에 비해 짧은 신장, 다수의 신초(multiple shoots) 및 꽃 신초 절간의 왜성화(dwarfing of the floral shoot internodes)를 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 12). 이는 *PAPP5*의 TPR 도메인을 식물체에 도입하여 과발현시키면 식물체에 왜성을 도입할 수 있음을 나타낸다.



Fig. 11. 유전자 기능 재검정을 위한 pNB96-TPR vector construct

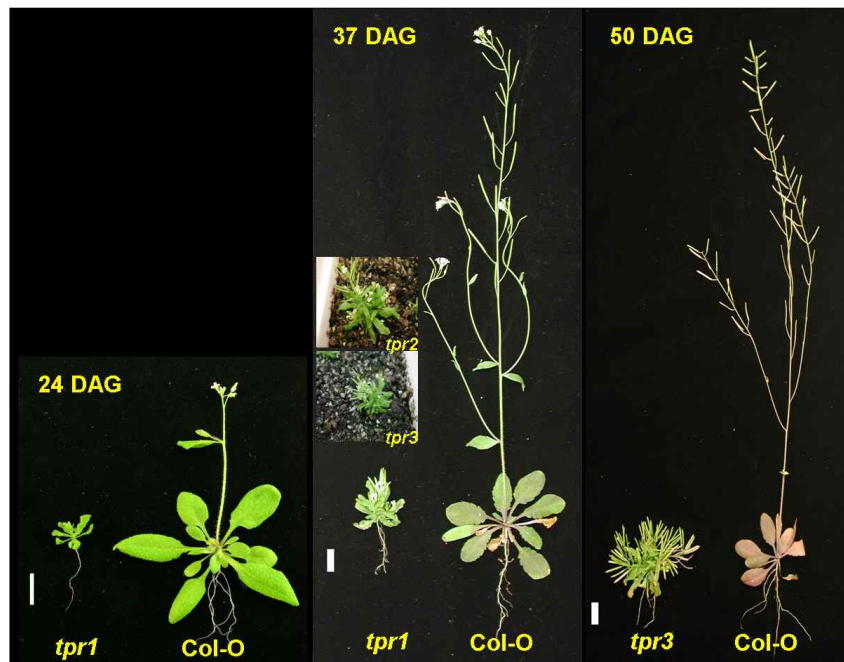


Fig. 12. pNB96-TPR 벡터 도입을 통한 애기장대 야생형과 변이체(*tpr1*, *tpr2*, *tpr3*)의 표현형적 비교 분석

나. *AtSIZ*: *AtSIZ*가 NaCl 스트레스 반응에 저항성을 가진다는 것을 재검정하기 위하여 본 연구팀은 *AtSIZ* 유전자를 과발현하는 형질전환 식물체를 제조하고 이들 식물체가 NaCl 스트레스에 대해 저항성을 갖는지를 확인하였다. 먼저, *AtSIZ*를 과발현하는 식물을 제조하기 위해 CaMV(cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터를 가진 pBII21 바이너리 벡터에서 GUS 코딩 부분을 대체하여 *AtSIZ* cDNA를 연결한 후, 제조된 재조합 벡터를 야생형 애기장대에 진공침투법으로 삽입하였다. 이로부터 얻어진 형질전환체를 선별하기 위해 50 µg/L 카나마이신을 포함하는 MS 플레이트에서 배양하여 형질전환된 식물체를 선별한 다음, 동형접합 T2 식물에서 총 RNA를 얻어 표지된 *AtSIZ* cDNA를 탐침으로 하여 노던 블롯 분석을 수행하여 pBII21-*AtSIZ*-2-4 및 pBII21-*AtSIZ*-19-4는 야생형 식물에 비해 강한 *AtSIZ* 발현을 보였고 이는 삽입된 *AtSIZ*가 실제 높은 정도로 발현된다는 것을 의미한다. 이러한 변이체를 이용하여 고농도의 NaCl 스트레스에서 *AtSIZ* 과발현 식물체의 표현형을 조사하였다. 먼저 NaCl 스트레스를 유도하기 위해, 26일 동안 재배한 식물에 400 mM NaCl을 4시간 동안 처리하고, 8일 후에 표현형을 조사하였다. Fig. 13에서 보는 바와 같이, 야생형은 고농도의 salt 처리에 의하여 심각한 표현형적 변이, 특히 잎의 황화 현상이 일어나는 반면, *AtSIZ* 과발현 형질전환 식물체인 pBII21-*AtSIZ*-2-4와 pBII21-*AtSIZ*-19-4는 salt 처리에 의한 표현형적 변이가 거의 일어나지 않았다. 그리고 *AtSIZ* 과발현 형질전환 식물체는 고농도의 NaCl에 대하여 증가된 저항성을 보여 300mM NaCl을 10일 정도 처리하였을 때, 야생형 식물은 살아남지 못했지만 *AtSIZ* 과발현 식물체는 약 70%가 생존하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 *AtSIZ*가 고농도의 NaCl 스트레스에 대한 적응 반응에 관여함을 확인시켜 주는 것이다.



Fig. 13. Phenotypic confirmation of transgenic plants for the overexpression of *AtSIZ* on 8 days after 400 mM NaCl treatment for 4 hours.

다. **ORE7(부록 1 참조)**: *ORE7*이 노화 지연에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것을 재검정하기 위하여 본 연구팀은 CaMV 35S promoter 조절 하에 full-length *ORE7/ESC* 유전자가 발현되는 벡터를 제조하고, 이를 이용하여 *ORE7* 유전자가 과발현하는 형질전환 식물체를 생산하여 이들 식물체가 노화에 있어 지연 효과를 갖는지를 확인하였다. 그 결과, 형질전환 식물체는 야생형에 비하여 뚜렷한 잎의 노화 지연 표현형을 가질 뿐 아니라 종자에 대한 수확성 증대가 확인되었다(Fig. 14).

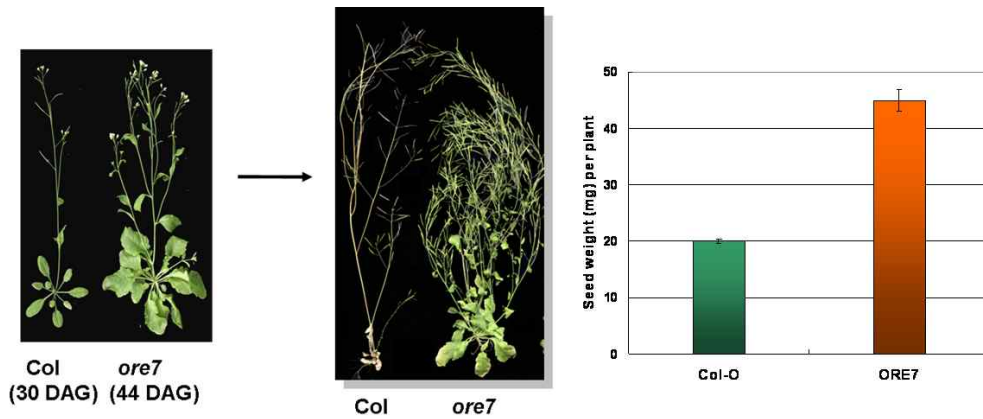


Fig. 14. *ORE7* 과발현 변이체의 노화지연 및 생산성 증대(종자 수확량 증대)에 대한 표현형적 특징

본 연구팀은 이러한 노화 지연 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특징 외에 내·외적 스트레스에 대해 본 유전자가 어떤 역할을 담당하는 지를 밝히기 위하여 추가 연구를 수행하였다. *ORE7* 유전자를 과발현시킨 애기장대 형질전환체에서 스트레스 관련 호르몬 (Methyl Jasmonate, ABA, Ethylene) 처리하였을 때 야생형에 비해 뛰어난 스트레스 저항성을 나타냈으며(Fig. 15), 또한 H_2O_2 를 처리하여 산화스트레스에 대한 저항성도 분석한 결과 뛰어난 저항성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 16).

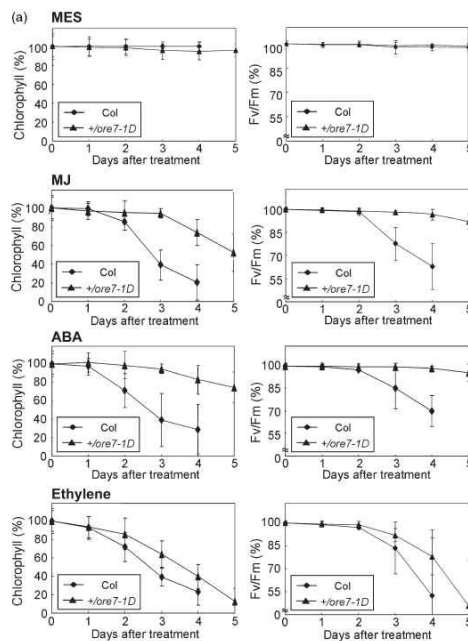


Fig. 15. *ORE7* 과발현체의 스트레스 호르몬 처리에 대한 저항성

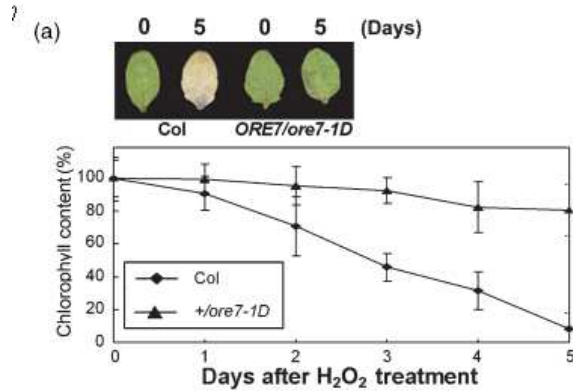


Fig. 16. ORE7 과발현체의 산화스트레스 저항성

2. 유용 유전자 발굴: *AtGA2ox4* (부록 2 참조)

기능성 유전체 연구를 통해 선별된 10개의 유용 유전자 기능 검증 중 slender seedling 표현형을 가지는 GIR113765 라인에 대하여 집중하였다. 상기 변이체의 표현형을 유발하는 *AtGA2ox4* 유전자의 기능을 보다 자세히 분석하기 위하여 sense 그리고 antisense construct를 제작하여 direct approach를 통하여 표현형 분석을 수행하였다. pSEN-*AtGA2ox4* 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조군(*AtGA2ox4* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 비교하여 볼 때, 놀랍게도 식물의 전 기관에 걸쳐 왜화 현상이 유도되었으며, 형질전환 개체에서 이러한 왜화 현상의 정도의 차이는 유전자의 과발현이 개체마다 다르게 나타남에 기인하는 것으로 판단된다. 한편 pSEN-anti*AtGA2ox4* 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조군과 비교하여 볼 때, 부분적으로 slender seedling 표현형을 가지기는 하나 크게 표현형 변화가 유발되지 않았다. 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 30일째(Fig. 17), 그리고 40일째(Fig. 18) 수행하였다.

pSEN-*AtGA2ox4* 구성체를 가지고 있는 *SEN::AtGA2ox4-10* 변이체 라인은 Col-0(애기장대 야생형)과 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 잎과 줄기 등 대부분의 기관에서 왜화 현상이 유도되었으며, 이러한 왜화 현상은 개체마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 유전자의 과발현이 개체마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 그러나 뿌리 발달에 있어선 야생형과 비교해 보았을 때, 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 또한 식물의 개화시기에 있어서도 야생형과 큰 차이가 없음을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 변이체의 왜화 현상은 C₁₉-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 *AtGA2ox4*의 과발현으로 인해 활성 지베렐린의 불활성 지베렐린으로의 전환으로 인하여 활성 지베렐린의 함량 부족에 기인하는 것으로 추측된다. 한편 pSEN-anti*AtGA2ox4* 구성체를 가지고 있는 *atga2ox4-4* 변이체 라인은 애기장대 야생형과 비교하여 볼 때, 전체적으로 약간 길고 가느다란 표현형을 가지고 있으며, 줄기가 조금 더 신장된 것으로 나타났다. 그러나 전체적으로 볼 때 *atga2ox4-4* 변이체 라인의 표현형은 애기장대 야생형 표현형과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 *AtGA2ox4* 유전자의 발현 억제가

야기한 활성 지베렐린의 함량 증가가 GA 20-oxidase와 GA 3-oxidase의 feedback 메커니즘에 의하여 조절됨으로써 변이체의 표현형 변이가 크게 유발되지 않는 것으로 추측된다. *AtGA2ox4* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 왜화 현상은 타 작물의 생산성 증대에 적용할 수 있는 중요한 요인으로 작용할 수 있을 것이다.

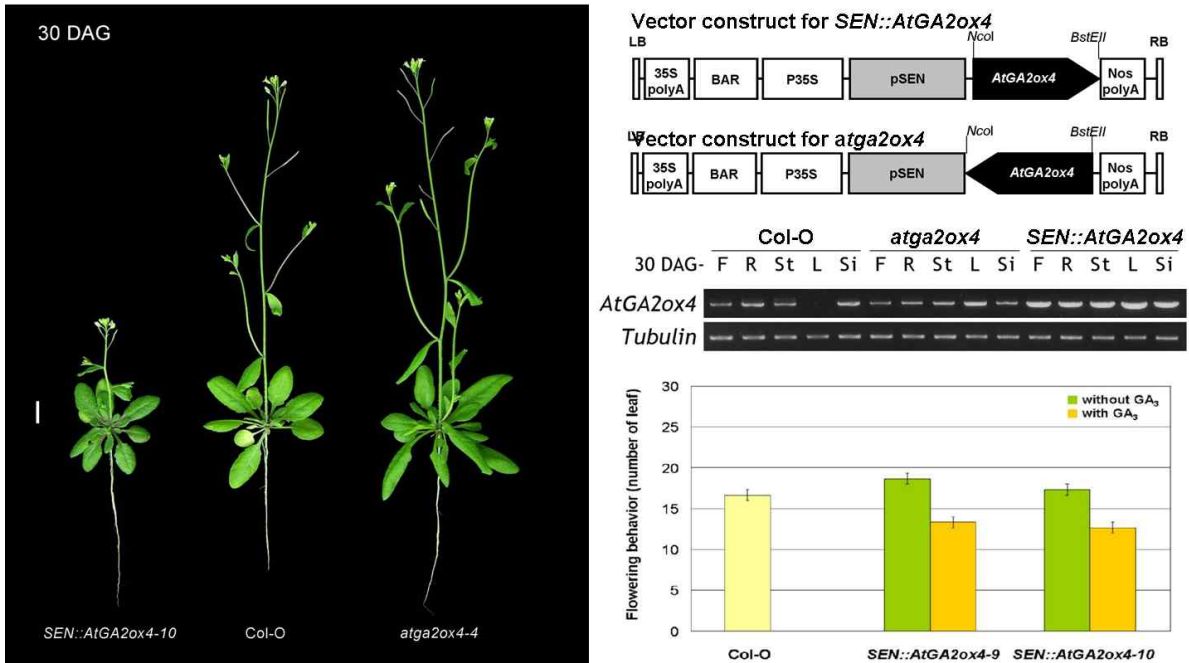


Fig. 17. Phenotypic characterization of T2 transgenic plants transformed with the 'sense' (*SEN::AtGA2ox4*) and 'antisense' (*atga2ox4*) construct for *AtGA2ox4* gene during 30 days after germination, and gene expression in the various organs. DAG, days after germination; Scale bar, 1 cm; F, flowers;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

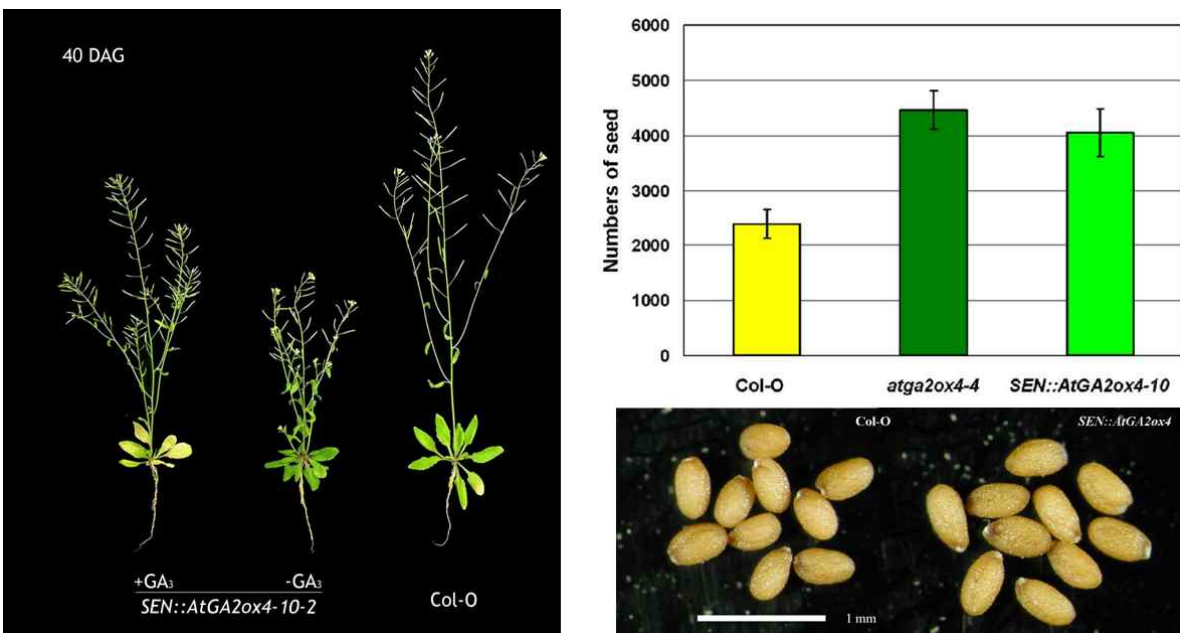


Fig. 18. Phenotypic characterization of T2 transgenic plants transformed with the 'sense' (*SEN::AtGA2ox4*) and 'antisense' (*atga2ox4*) construct for *AtGA2ox4* gene during 40 days after germination, and numbers of seed in the plants. DAG, days after germination.

특히 흥미로운 점은 왜화 현상이 유발되는 변이체 라인의 종자 생산성은 야생형에 비하여 오히려 증가하고 있다는 사실이다. Fig. 18에서 보는 바와 같이, pSEN-AtGA2ox4 구성체를 가지고 있는 *SEN::AtGA2ox4-10* 변이체 라인은 Col-0(애기장대 야생형)과 비교하여 볼 때 종자의 크기에 있어서는 큰 차이를 가지지 않으나 종자 생산성에 있어서 오히려 증가하는 현상을 보였으며 이러한 *AtGA2ox4* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 왜화 현상은 타 작물의 생산성 증대에 적용할 수 있는 중요한 요인으로 작용할 수 있다. Fig. 18에서 종자의 갯수는 1 개체 당 생산된 종자의 갯수를 의미한다.

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

*AtGA2ox4*의 과발현에 의한 애기장대 GA 2-oxidase 관련 유전자의 발현 양상을 비교해 보면 다음과 같다. C₁₉-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 유전자 집단에서 전 기관에서 발현되는 *AtGA2ox2*와 *AtGA2ox6*의 발현은 야생형과 변이체 사이에서 큰 차이를 나타내지 않았으나, *AtGA2ox2*의 경우 잎에서의 발현은 변이체에서 조금 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 뿌리에서 발현이 거의 없는 *AtGA2ox1*의 경우 야생형과 변이체를 비교하였을 때, 변이체에서 잎과 줄기에서 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 잎에서 발현이 거의 없는 *AtGA2ox3*의 경우 줄기에서 발현이 감소하는 것을 알 수 있었다. 한편 C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 유전자 집단에서 *AtGA2ox7*의 경우 꽃과 뿌리에서 특이적으로 발현되며, *AtGA2ox8*의 경우 꽃과 뿌리에서 발현의 정도가 높은 반면 줄기와 silique에서는 상대적으로 발현의 정도가 낮았다. 이러한 유전자의 발현은 *AtGA2ox4*와 마찬가지로 잎에서는 거의 나타나지 않았다. 이러한 유전자에 대한 발현 정도를 야생형과 변이체를 비교하였을 때, *AtGA2ox7*의 경우 변이체에서 뿌리에서의 발현 증가를 유발되었으며, *AtGA2ox8*의 경우 *AtGA2ox7*와 마찬가지로 변이체에서 뿌리에서의 발현 증가 현상이 나타났으며, 특이한 점은 줄기에서의 발현은 변이체에선 감소 현상이 유발된다는 것이다. C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 과발현은 애기장대에서 본 유전자인 *AtGA2ox8*와 마찬가지로 왜화 현상을 유발한다고 알려지고 있다 (Schomburg *et al.*, 2003). 상기 연구 결과를 분석해 보면 C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는

*AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 과발현은 주로 sink 기관인 뿌리에서 다양한 대사 작용을 유발하여 왜화 현상을 유발하는 반면, C₁₉-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 본 유전자인 *AtGA2ox4*의 과발현은 주로 source 기관인 잎에서 다양한 대사 작용을 유도하여 왜화 현상을 유발하는 것으로 제안할 수 있을 것이다. 그리고 C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 발현은 직접적이든, 간접적이든 *AtGA2ox4*의 발현에 의해 조절을 받을 것으로 추측되며, 이러한 제안은 식물체의 왜화 현상 유도가 본 유전자에 의해 단독적으로 일어나는지 아니면 본 유전자와 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 상호 작용의 의해 일어나는지에 대해 보다 많은 연구를 필요로 할 것이다.

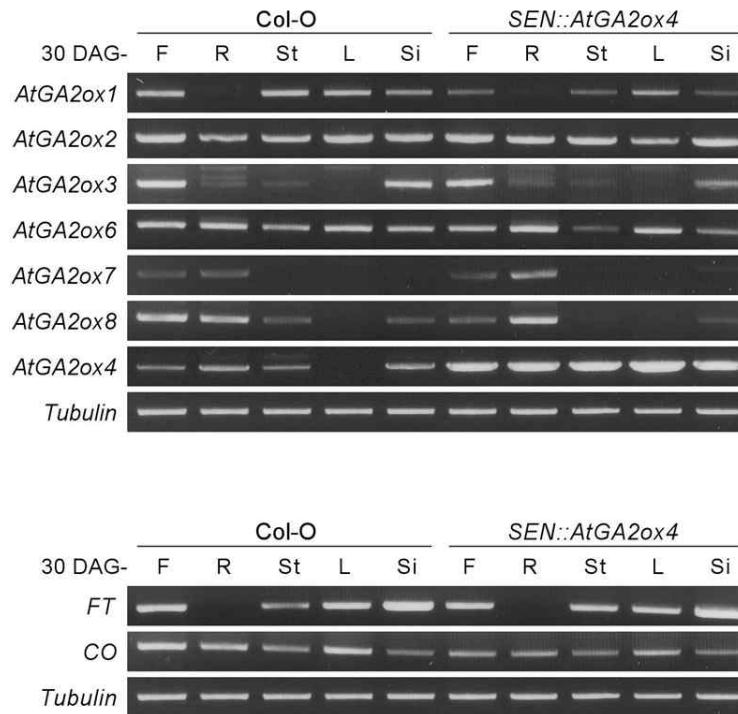


Fig. 19. Transcript accumulations for GA 2-oxidase-related genes and flowering time-related genes in the various organs of *Arabidopsis* Col-0 and *SEN::AtGA2ox4* plants. F, flowers; R, roots; S, stems; L, leaves; Si, siliques.

한편 본 유전자가 지베렐린 대사 작용에 있어서 feedback mechanism에 관여하고 최종적으로 지베렐린 이화 작용에 관여하는지를 확인하기 위하여 *SEN::AtGA2ox4* 변이체에서 GA20-oxidase를 coding하는 *AtGA2ox1*과 *AtGA2ox2*, 그리고 GA3-oxidase를 coding하는 *AtGA3ox1*에 대한 유전자 발현을 조사하였다. Fig. 20에서 보는 바와 같이 *SEN::AtGA2ox4* 변이체는 야생형에 비하여 이들 유전자에 대한 발현이 모두 증가하였으며, 세부적으로 조사해 보았을 때, 특히 잎에서의 상기 유전자의 발현이 모두 증가되었으며, 이러한 유전자 발현은 모두 GA₃가 처리되었을 때 야생형의 유전자 발현 수준으로 회복됨을 알 수 있었다. 이러한 현상을 분석해 보면, *AtGA2ox4*의 과발현은 식물체내 지베렐린 함량 부족 현상을 유발하고, 이와 같은 활성 지베렐린 함량 부족은 지베렐린 합성 유전자의 발현을 유도하는 것으로 확인할 수 있었다. 따라서 본 유전자가 지베렐린 이화 작용에 관여함을 알 수 있었으며, 본 유전자에 의한 활성 지베렐린 함량 부족은 지베렐린 합성 유전자의 발현을 유도하는 것으로 사료된다. 또한 이와 같은 유전자 발현 조절

의 대부분이 앞에서 조절되는 것으로 추측된다.

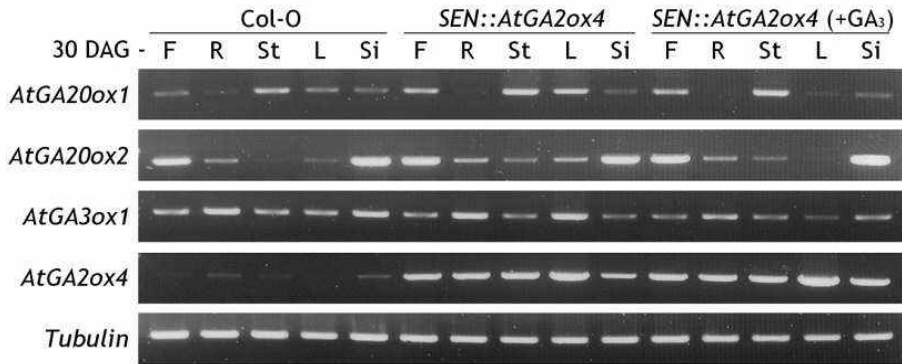


Fig. 20. Transcript accumulations for feedback mechanism-related genes of GA metabolism in the various organs of *Arabidopsis* Col-0 and *SEN::AtGA2ox4* plants. F, flowers; R, roots; S, stems; L, leaves; Si, siliques.

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

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

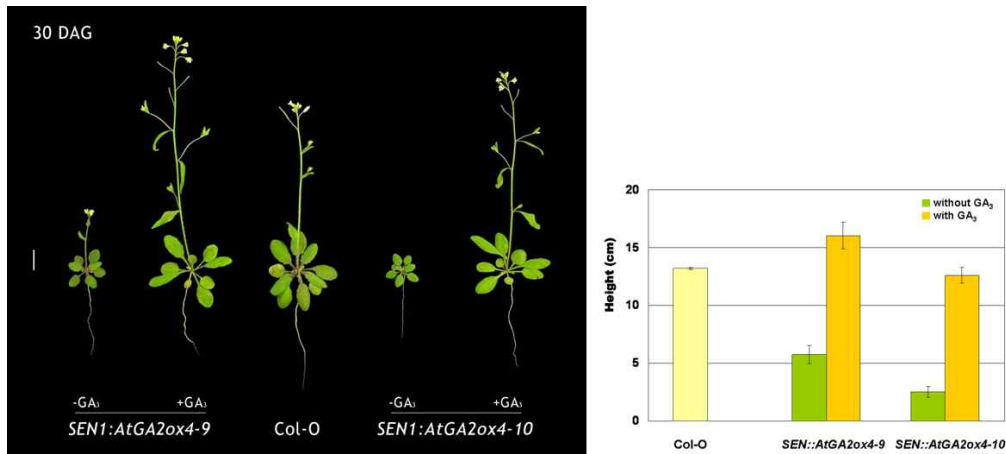


Fig. 21. Responses of *SEN::AtGA2ox4-9* and *SEN::AtGA2ox4-10* mutants against GA₃ treatment at 30 DAG (days after germination), respectively. For application for GA to plants growing on soil, 10⁻⁴M GA₃ was sprayed once a week. (Bar=1 cm).

상기에서 언급한 바와 같이 *AtGA2ox4*의 과발현은 잎에서의 특이적 발현 증가로 인하여 식물체의 왜화 형질을 유발한다고 제안되었다. 이러한 사실을 단백질 수준에서 확인하기 위하여 발아 후 30일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *SEN::AtGA2ox4* 변이체, 그리고 GA₃ 처리에 표현형 회복이 일어난 *SEN::AtGA2ox4* 변이체로부터 각각 단백질을 분리하여 이차원 전기영동을 통하여 단백질 발현 양상을 조사하였다(Fig. 22).

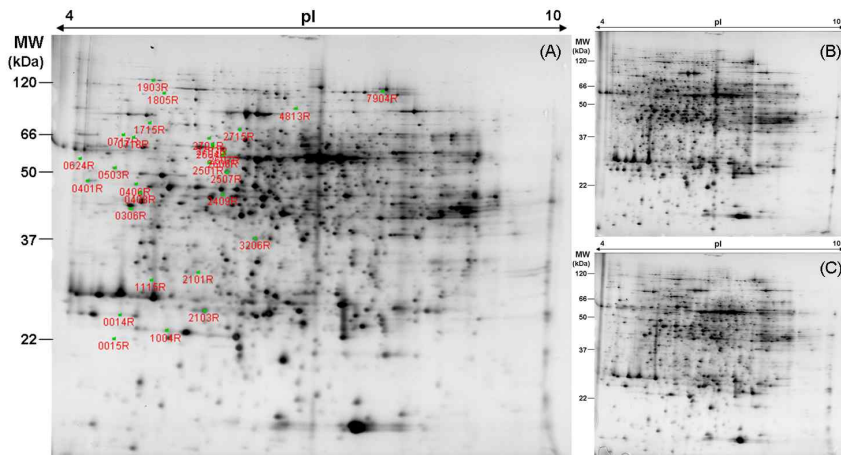


Fig. 22. Proteome analysis caused by the overexpression of *AtGA2ox4* in the wild type (A), *SEN::AtGA2ox4* without GA₃ treatment (B), and *SEN::AtGA2ox4* with GA₃ treatment (C). Red letters indicate that *AtGA2ox4*-upregulated proteins, of which the expressions are reversible for GA₃ application.

Table 6은 애기장대에서 *AtGA2ox4* 유전자의 과발현에 의해 up-regulation되고 GA₃ 처리에 의해 단백질의 발현이 야생형의 수준으로 회복된 단백질에 대한 분석 결과이다. 흥미롭게도 본 연구에서 *AtGA2ox4* 유전자의 과발현에 의해 down-regulation된 단백질들은 거의 찾아볼 수 없었다. 표 2의 결과에서 보듯이, 무엇보다도 흥미로운 점은 *AtGA2ox4* 유전자의 과발현이 상당히 많은 엽록체 타겟 단백질의 발현 증가를 유발한다는 점이다. 본 연구에서 분석된 단백질 그룹 중 50% 이상의 단백질이 엽록체 타겟 단백질인 것으로 나타났으며, 나머지 단백질은 세포질과 다

른 세포 소기관 타겟 단백질인 것으로 밝혀졌다. 이러한 사실은 앞서 언급한 *SEN::AtGA2ox4* 변이체에서 *AtGA2ox4* 유전자의 잎 기관에서의 특이적 발현 증가와 밀접한 연관이 있는 것으로 나타났다. 따라서 *AtGA2ox4* 유전자의 잎 기관에서의 특이적 발현 증가는 왜화 현상 유도과 관련된 여러 엽록체 타겟 단백질들의 발현 증가를 유도하는 것으로 추측할 수 있다. 그리고 지베렐린 신호 전달과 관련된 단백질의 발현 증가 및 내·외재적 환경 변화에 따른 단백질의 발현 증가 등이 세포질 혹은 다른 세포 소기관에서 주로 이루어졌다. 이러한 사실은 *AtGA2ox4* 유전자는 source 기관인 잎의 엽록체 타겟 단백질의 발현 조절을 유도하고, 이를 통하여 최종적으로 sink 기관에서 형질이 나타나게 되어 식물의 왜화 현상이 조절되는 것으로 추측된다.

Table 6. Up-regulated proteins caused by the overexpression of *AtGA2ox4*, of which the expressions are reversible for GA₃ treatment.

Spot No.	Mw	Arabidopsis protein Name	Locus Tag.
Chloroplast target proteins			
14	25.92	LHCB6 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII); chlorophyll binding	
15	22.30	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	
306	43.09	SBPASE (sedoheptulose-bisphosphatase); phosphoric ester hydrolase	AT3G55800
401	48.75	RPS1 (ribosomal protein S1); RNA binding	AT5G30510
408	46.25	CHL11 (CHLORINA 42); magnesium chelatase	AT4G18480
624	54.07	ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit N-methyltransferase, putative	
1004	23.48	LHCA4 (Photosystem I light harvesting complex gene 4); chlorophyll binding	
1115	31.24	chlorophyll a/b binding protein (LHCP AB 180)	
1715	73.57	ABC1 family protein	AT4G31390
2101	32.37	CA1 (CARBONIC ANHYDRASE 1); carbonate dehydratase/ zinc ion binding	
2103*	26.59	ATFER1 (ferretin 1); ferric iron binding	AT5G01600
2409	45.98	3-isopropylmalate dehydrogenase, chloroplast, putative	AT5G14200
2507	50.73	ADG1 (ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE SMALL SUBUNIT 1); glucose-1-phosphate adenyltransferase	AT5G48300
2604	59.62	ATP synthase CF1 alpha subunit	
2701	64.11	ALDH10A8 (Aldehyde dehydrogenase 10A8); 3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase	AT1G74920
Cytosol and other organelle target proteins			
503**	51.78	26s proteasome AAA-ATPase subunit RPT5a	AT3G05530
1805**	96.01	UBP14 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 14); ubiquitin-specific protease	AT3G20630
717***	66.33	RCN1 (ROOTS CURL IN NPA); protein phosphatase type 2A regulator	AT1G25490
1903*	123.37	Transcription factor/ transcriptional activator; response to stress	AT3G19290
2715*	69.35	putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	AT1G09780
0406	48.04	Serpin, putative/ serine protease inhibitor, putative	AT1G47110
0718	64.88	Protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit	
2501	52.84	Gamma-glutamylcystein synthetase	
2606	54.92	Strong similarity to alanine aminotransferase	AT1G17290
2703	61.15	Dihydrolipoamide acetyltransferase	AT3G13930
7904	99.47	Aconitase	AT3G16420

* indicates Stress-related proteins; ** indicates GA signalling-related proteins; *** indicates regulating proteins of hypocotyl elongation.

애기장대에서 GA 2-oxidase의 기능을 가지는 유전자는 2가지 그룹으로 나눌 수 있다. 먼저 GA₁₂를 불활성 형태인 GA₁₁₀으로 전환시키는 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*, 그리고 GA₉와 GA₄를 불활성 형태인 GA₅₁과 GA₃₄로 전환시키는 *AtGA2ox1*에서 *AtGA2ox6*까지의 6개 유전자로 나눌 수 있다. 본 연구팀은 *AtGA2ox4* 유전자가 실질적으로 GA 2-oxidase의 기능을 가지는 지, 그리고 기능을 가진다면 어떤 기질 특이성을 가지는 지를 확인하기 위하여 *AtGA2ox4* 과발현체와 야생형의 GAs quality를 조사하였다. 그 결과 *AtGA2ox4* 과발현체는 야생형에 비하여 GA₁₂, GA₉, 그리고 GA₄의 함량에 대한 감소 현상을 나타내었으며, GA₉와 GA₄ 함량 감소 현상이 GA₁₂의 함량 감소 현상에 비하여 훨씬 특징적으로 나타났다. 따라서 *AtGA2ox4* 유전자는 GA₉와 GA₁₂를 기질로 하는 GA 2-oxidase의 기능을 가지는 것으로 판단된다. 그리고 *AtGA2ox4* 과발현체와 야생형

의 GA₉와 GA₄의 함량을 비교하였을 때, 과발현체는 GA₉의 함량이 GA₄의 함량보다 현저한 감소 현상을 나타내는 것으로 보아, *AtGA2ox4* 유전자는 GA₄보다 GA₉에 대한 기질 특이성이 높은 GA 2-oxidase의 기능을 가지는 것으로 판단된다(Table 7과 Fig. 23).

Table 7. Changes of GAs quality between *Arabidopsis* Col-0 and *SEN::AtGA2ox4* plants

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

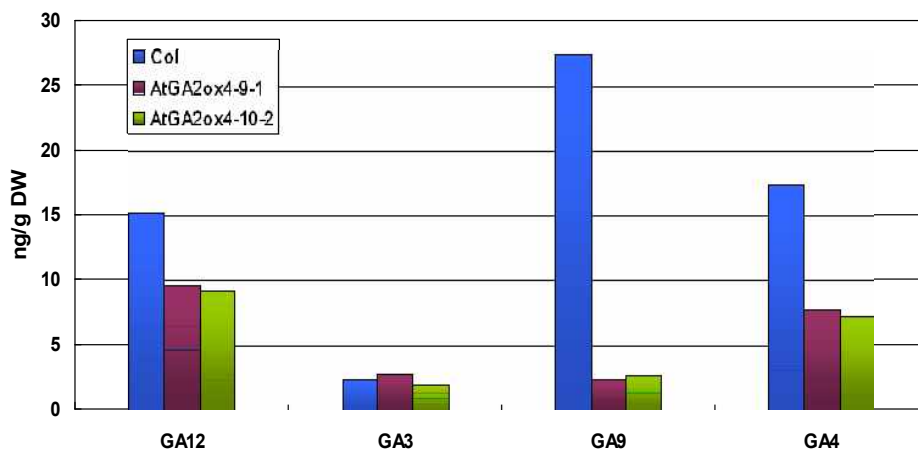


Fig. 28. Changes of contents of GA₁₂, GA₃, GA₉, and GA₄ between *Arabidopsis* Col-0 and *SEN::AtGA2ox4* plants

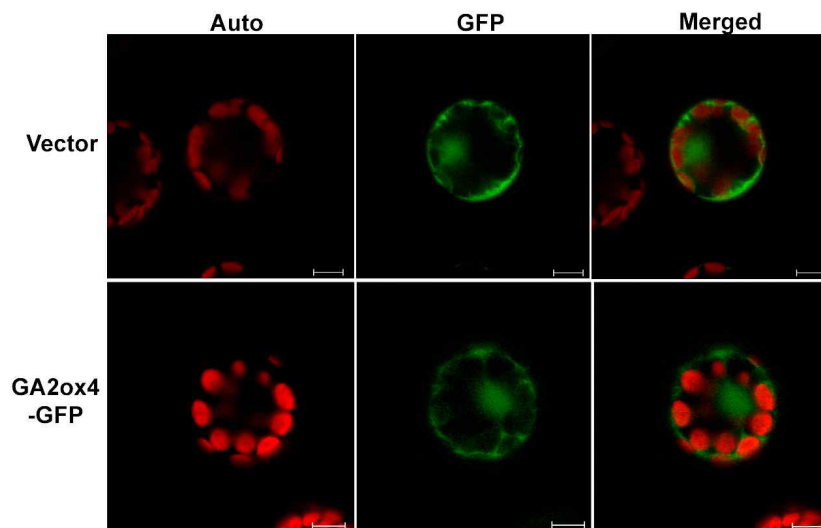


Fig. 29. Nuclear and cytosolic localization of GFP-*AtGA2ox4*. The full length *AtGA2ox4* gene fused to the coding sequence of the GFP gene was introduced into *Arabidopsis* protoplasts. After 18 h of incubation, localization of GFP-*AtGA2ox4* was examined by confocal microscopy.

AtGA2ox4 유전자의 세포내 위치를 확인하기 위하여 본 연구팀은 먼저 reporter gene으로 GFP를 함유하고 *AtGA2ox4* 유전자가 삽입된 pAtGA2ox4-GFP 벡터를 제작하였다. 이후 *AtGA2ox4*의 세포내 위치를 확인하기 위해서 pAtGA2ox4-GFP 벡터를 애기장대 원형질체에 transfection한 후 형광 현미경을 이용하여 확인하였다. 그 결과 *AtGA2ox4::GFP*의 발현이 핵과 세포질에서 초록 형광으로 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 29). Auto에서 붉은 색으로 보이는 기관은 엽록체이다. 이는 *AtGA2ox4* 단백질이 핵과 세포질에서 기능을 수행한다는 것을 보여주는 것이다.

3. 유용 유전자 발굴: *ATHG1* (AT-hook protein of Genomine 1, 부록 3 참조)

본 연구팀은 advanced RAM 변이체로부터 얻어진 유용 기능성 유전자 후보에서 신기능성 유용 유전자를 발굴하기 위하여 전사인자 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. 그 결과 GIR212709 변이체는 white-lethal, albinism 그리고 심각한 성장억제 등의 표현형적 특징을 가지며 *At4G17800* 유전자의 발현 억제를 통하여 유발된 것으로 밝혀졌다(Fig. 30). 본 유전자의 과발현은 식물체에서 어떤 표현형적 특징을 가지는지를 확인한 결과, *At4G17800* 유전자의 과발현은 T1 형질전환 식물체에서 현저한 노화 지연이라는 표현형적 특징을 유도하였다(Fig. 31). 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.



Fig. 30. advanced RAM approach를 통해 확보된 GIR212709 변이체 라인의 표현형적 특징

pCSEN-ATHG1 벡터(Fig. 31A)로 형질전환된 T₁ 애기장대 *ATHG1 ox-a* 및 *ox-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 *ox-b* 변이체들

이 노화 지연의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 형질전환 개체에서 이러한 노화 지연 현상의 정도의 차이는 유전자의 과발현이 개체마다 다르게 나타남에 기인하는 것으로 판단된다 (Fig. 31B). 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 제초제 저항성으로 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 60일째 수행하였다(Fig. 31C). pCSEN-ATHG1 구상체를 가지고 있는 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체 라인은 애기장대 야생형(Col-0)과 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 이러한 노화 지연 현상은 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 architecture의 변화를 통하여 유도되는 것으로 판단된다.



Fig. 31. *ATHG1* 과발현 벡터(A) 및 형질전환체의 표현형적 특징(B, C), 종자수확량(D), 그리고 유전자 발현(E)

ATHG1 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체 노화 지연 현상이 작물의 생산성 증대를 유발할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이체 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6*의 라인별 종자 수확량을 애기장대 야생형과 비교해 보았다. *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체 라인들은 모두 애기장대 야생형에 비하여 종자의 수확량이 약 1.8배 이상 증가하는 것으로 나타났으며, 이러한 사실은 *ATHG1* 유전자는 노화 지연을 통하여 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다(Fig. 31D). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라

는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 *ATHG1* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 발아 후 25일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체의 잎으로부터 전체 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 RT-PCR을 수행한 결과, 애기장대 야생형에 비하여 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체의 *ATHG1* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 31E), 이러한 사실은 본 변이체가 *ATHG1* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

ATHG1 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T₂ 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 *ox-6*의 경우 잎의 황화 현상이 55일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 60일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 32A). 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 *ox-6*의 경우 발아 후 55일이 되었을 때도 측정 초기의 40% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다(Fig. 32B). 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 *ox-6*의 경우 발아 후 60일까지 활성의 감소가 거의 일어나지 않았다(Fig. 32C). 상기 결과로부터, *ATHG1* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명 연장 효과는 *ATHG1* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

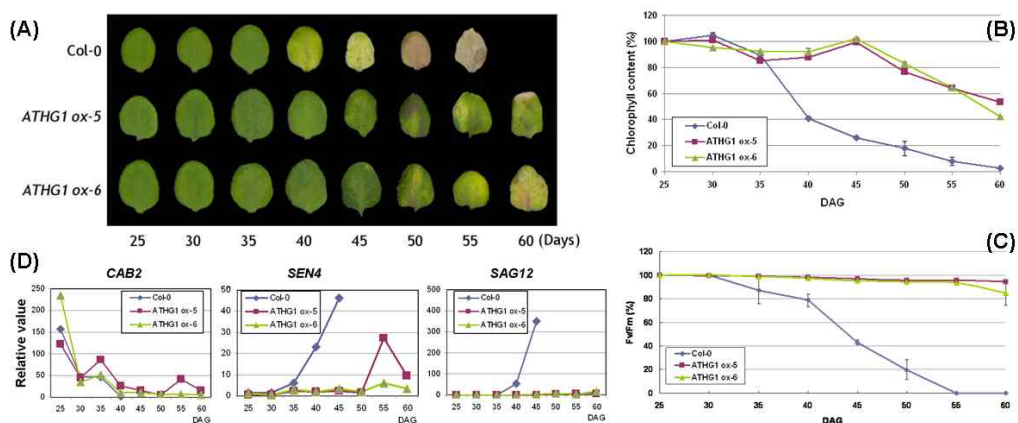


Fig. 32. *ATHG1* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량(B), 광합성 효율(C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상(D)

야생종과 *ATHG1 ox-5* 및 *ATHG1 ox-6* 변이체에서 노화관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 각 노화관련 유전자들

의 발현양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다. 노화 마커 유전자로는 *SAG12*, *SEN4* 및 *CAB2* 유전자를 사용하였으며, qRT-PCR 양성 대조구로는 *ACT8* 유전자를 사용하였다. 야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였다. 그러나 *ATHG1* 과발현 변이체, 특히 *ATHG1 ox-5* 변이체에서는 이들 유전자의 발현 감소 양상이 지연됨을 알 수 있었다. 한편, 노화단계에서 발현이 증가되는 유전자로 알려진 두 유전자, 즉 *SAG12* 및 *SEN4*와 같은 노화 관련 유전자들의 발현도는 야생종에서 발아 후 35일 이후 증가하여 45일째 최대의 발현치를 가지는데 비해, *ATHG1 ox-5* 변이체에서는 *SEN4*의 발현이 55일에 최대치를 나타냈으나 야생형의 발현 정도에는 훨씬 미치지 못하는 것으로 나타났다. 그리고 *ATHG1 ox-6*의 경우 *SEN4*의 발현이 55일째 약간 증가하는 것으로 나타났으나 그 발현 정도가 극히 미미한 것으로 보인다. 또한 *SAG12*의 발현에 있어서도 *ATHG1 ox-5*와 *ox-6* 변이체 모두는 발아 후 60일까지 거의 발현이 되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 32D). 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.

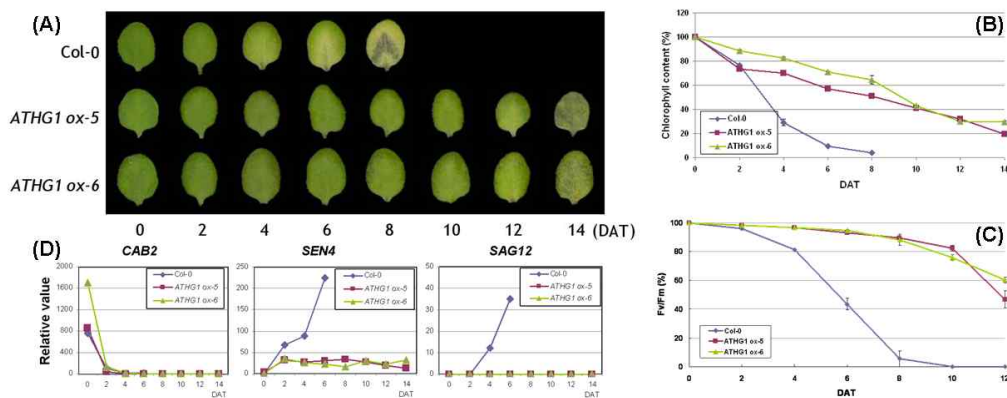


Fig. 33. *ATHG1* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량(B), 광합성 효율(C), 그리고 노화 마커 유전자의 발현 양상(D)

노화를 촉진한다고 알려진 암 처리에 대한 *ATHG1* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 발아 후 25일째 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액(2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 8일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATHG1 ox-5*와 *ox-6*의 경우 잎의 황화 현상이 12일 이후부터 나타났고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 33A). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암처리 후 6일 이후 급격한 감소를 보여 암처리하지 않은 상태의 약 10% 정도의 수치를 나타냈으나, *ATHG1 ox-5*와 *ox-6*의 경우, 6일째에도 50% 이상의 엽록소 함량을 나타냈다(Fig. 33B). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소

함량 변화와 같이 *ATHG1* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(Fig. 33C). 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(Fig. 33D).

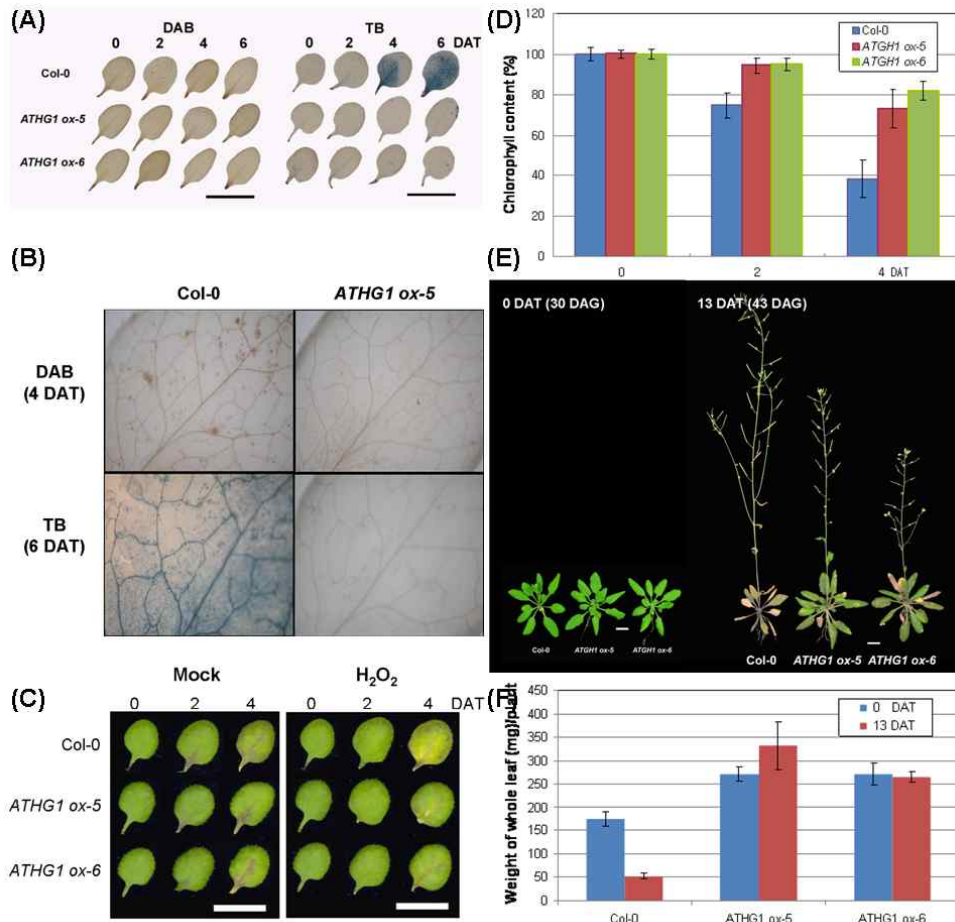


Fig. 34. *ATHG1* 과발현 형질전환체의 세포 사멸(A와 B), H₂O₂ 스트레스에 대한 표현형적 특징 및 엽록소 함량(C와 D), 그리고 가뭄 스트레스에 대한 표현형적 특징 및 잎 무게 변화(E와 F)

ATHG1 과발현 변이체의 노화 진행에 따른 세포 사멸 및 H₂O₂의 축적을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 발아 후 25일째 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 detach하여 6일간 암상태에서 매 2일 간격으로 잎을 취하여, 세포 사멸 분석은 TB(0.05% Lactophenol-Trypan blue) 염색 방법을 사용하였으며(Koch and Slusarenko, 1990), H₂O₂ 축적에 대한 분석은 DAB (3,3'-diaminobenzidine-4HCl, 0.05%, pH 5.8) 염색 방법(Thordal-Christensen *et al*, 1997)을 사용하여 염색한 후 현미경 하에서 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후 잎의 세포 사멸 및 H₂O₂의 축적이 급격하게 일어나 6일째 최대치를 이루었다. 이러한 사실은 잎의 노화 진행은 세포 사멸과 더불어 ROS의 축적, 특히 H₂O₂의 축적을 유발한다는 것을 알려주고 있다. 한편 *ATHG1* 과발현 변이체에서는 암처리 동안 세포 사멸 및 H₂O₂의 축적이 현저히 지연됨을 보여 주었다

(Fig. 34A, B). 따라서 *ATGHI*은 식물의 노화 지연을 통하여 세포 사멸 및 H_2O_2 의 축적 지연을 유발하는 것으로 판단된다. *ATHGI* 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, *ATHGI* 과발현 변이체에서는 4일째에도 잎의 황화 현상이 거의 유발되지 않았고 또한 엽록소 함량에 있어서도 초기 상태의 70% 이상을 유지하고 있었다(Fig. 34C, D). 이러한 사실은 *ATGHI*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

한편 본 유전자가 가뭄스트레스에 대해서도 저항성을 제공하는지를 확인하기 위하여 발아 후 30일된 *ATHGI*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 *ATHGI*의 과발현 변이체는 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 가뭄 처리에 의한 잎의 무게 감소가 거의 일어나지 않았다(Fig. 34E, F). 이러한 사실은 *ATHGI*이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

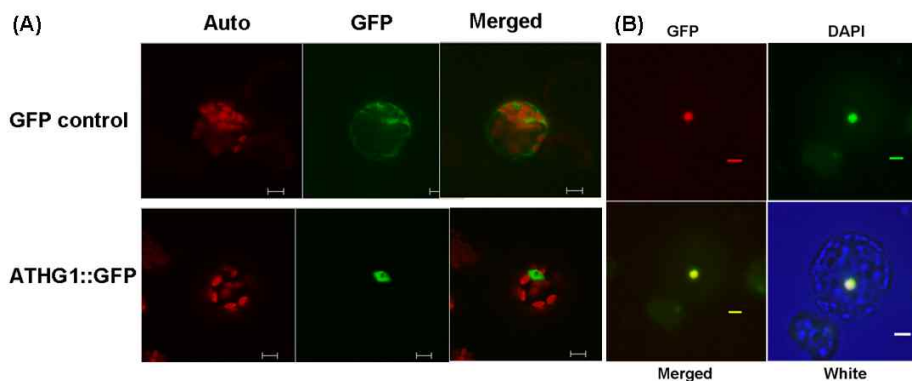


Fig. 35. Reporter 유전자 GFP를 이용한 *ATHGI*의 세포내 위치(A)와 DAPI를 통한 핵내 발현 확인(B)

ATHGI 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 *ATHGI* 단백질이 핵으로 이동하는지 여부를 확인하였다. 먼저 reporter gene으로 GFP를 함유하고 *ATHGI* 유전자가 삽입된 p*ATHG1*-GFP 벡터를 제작하였다. 이후 *ATHGI*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(Fig. 35A). Auto에서 붉은 색으로 보이는 기관은 엽록체이다. 이러한 융합 단

백질의 발현 부위가 핵임을 재확인하기 위하여 핵을 염색하는 DAPI를 이용하여 염색한 결과, ATHG1::GFP의 발현이 핵에서 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 35B). 이는 ATHG1 단백질이 핵으로 이동되어 핵 속에서 기능을 수행한다는 것을 보여주는 것이다.

4. 유용 유전자 발굴: *GSDL2* (Genomine Senescence Delay Line 2)

Advanced RAM 변이체로부터 얻어진 유용 기능성 유전자 후보에서 신기능성 유용 유전자를 발굴하기 위하여 전사인자 등 식물 성장·발달 조절관련 유전자들에 대한 sense and/or antisense construct를 제작하고 이를 애기장대에 도입하여, 변이체의 표현형적 기능 분석 및 유전자의 기능 분석을 수행하였다. 이중 GIR213464 변이체의 유전정보인 At4G35760은 유전자 과발현을 통하여 T1 형질전환 식물체에서 노화 지연이라는 표현형적 특징을 유도하였다. 본 연구팀은 At4G35760 유전자를 *GSDL2* (Genomine Senescence Delay Line 2)로 명명하고, 식물의 수명 연장 및 스트레스 내성 기능을 갖는 *GSDL2* 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다.

애기장대의 hypothetical protein(GeneBank accession number NP 567988)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 *Bgl*III의 서열이 포함된 정방향 프라이머(*Bgl*III/At4G35760 SOE-F, 5'-AGA TCT ATG ATG GCG AGG TTT GTT TCT GT-3')와, 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *Xba*I의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*Xba*I/At4G35760 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA CTG AAG TTG ATT GGT CTC ATT-3')를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 애기장대 cDNA로부터 PCR을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 40.4 kDa의 분자량을 갖는 376개의 아미노산을 암호화하는 1,131 bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 7 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였으며, 이는 *GSDL2*(Genomine Senescence Delay Line 2)로 명명되었다. 상기 유전자가 암호화하는 *GSDL2* 단백질의 등전점(isoelectric point)은 4.71로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "*GSDL2*" 혹은 "*GSDL2* 유전자"라 하고, 단백질은 "*GSDL2*" 혹은 "*GSDL2* 단백질"이라고 한다).

상기 유전자가 식물의 수명 연장 및 스트레스 내성 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *GSDL2* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *GSDL2* 전사체의 발현을 변화시켰다.

제한효소 *Bgl*III의 서열이 포함된 정방향 프라이머 및 제한효소 *Xba*I의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 *GSDL2* cDNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *Bgl*III와 *Xba*I으로 절단하고, inducible promoter인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 *GSDL2* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*GSDL2* 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 *SEN1* 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

한편, Fig. 36A는 pCSEN 벡터에 *GSDL2* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*GSDL2* 재조합

벡터를 도시한 그림이다. 상기 pCSEN-GSDL2 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션(electroporation)방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 이용하여 애기장대 형질전환을 수행한 후, 형질전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T₁)를 수확하였다. 대조군으로는 형질전환하지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 GSDL2 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환한 애기장대를 사용하였다. pCSEN-GSDL2 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대 GSDL2 ox는 대조군(GSDL2 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 발아 후 65일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 GSDL2 ox 변이체들이 수명 연장 정도의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 형질전환 개체에서 이러한 수명 연장 현상의 정도의 차이는 유전자의 과발현이 개체마다 다르게 나타남에 기인하는 것으로 판단된다. 아울러 본 형질전환 개체들은 야생형에 비하여 개체 크기에 있어 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 36B).

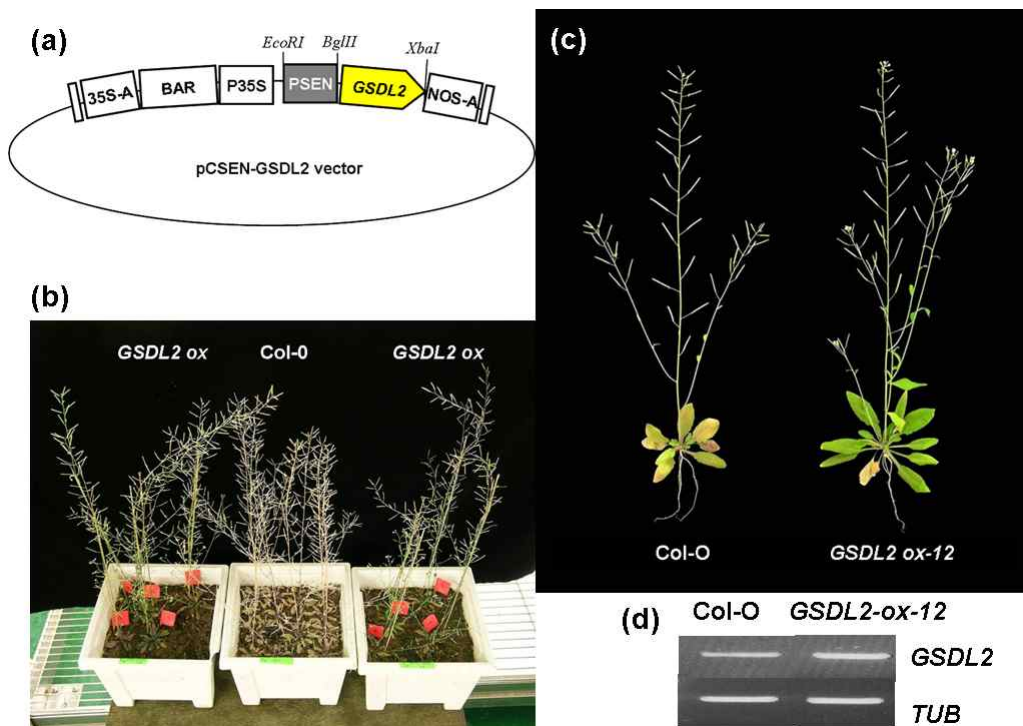


Fig. 36. GSDL2 유전자에 대한 벡터 및 표현형적 특징

이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째 수행하였다(Fig. 36C). pCSEN-GSDL2 구성체를 가지고 있는 GSDL2 ox-12 변이체 라인은 애기장대 야생형(Col-0)과 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 수명 연장 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 이러한 수명 연장 현상은 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 유전자의 과발현이 라인마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 아울러 이들 변이체들은 수명 연장 표현형뿐만 아니라 수명 연장 동안 개체 크기에 있어서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 사실은 GSDL2 유전자는 수명 연장과 더불어 식물의 개체 크기 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로

생각된다.

수명 연장표현형을 가지는 변이체의 *GSDL2* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 발아 후 25일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *GSDL2 ox-12* 변이체의 잎으로부터 전체 RNA를 각각 추출하여 RT-PCR을 수행한 결과, 애기장대 야생형에 비하여 *GSDL2 ox-12* 변이체의 *GSDL2* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 36D), 이러한 사실은 본 변이체가 *GSDL2* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

GSDL2 과발현 변이체의 수명 연장 형질을 확인하기 위하여, T₂ 세대에서 발아 후 15일 이후부터 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 5일마다 표현형 관찰, 광합성 활성 및 엽록소 함량을 측정하여 야생형 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 25일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 35일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *GSDL2 ox-12*의 경우 잎의 황화 현상이 35일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 45일째부터 진행됨을 확인할 수 있었다(Fig. 37A). 이러한 사실로 미루어보아, *GSDL2* 유전자는 식물체 수명 연장에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다.

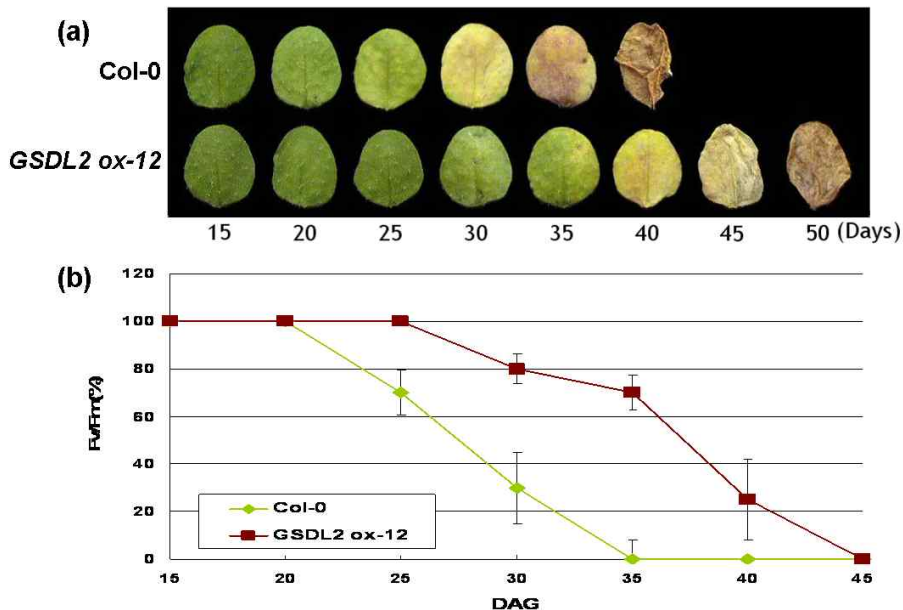


Fig. 37. *GSDL2* 과발현체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징 및 광합성 효율 변화

광합성 효율은 오 등의 방법(*Plant Journal* 12:527, 1997)을 이용하여 측정하였다. 우선 각 DAG(day after germination)의 잎을 15분간 암 처리한 후, 식물 효율 분석기(Plant Efficiency Analyzer) (Hansatech Instruments, Morfolk, UK)를 이용하여 엽록소의 형광을 측정하였다. 광합성 효율은 엽록소의 형광도 특성을 이용한 PS II (photosystem II)의 광화학적 효율(photochemical efficiency)로 나타내었는데, 형광도 최대치(maximum value of fluorescence; F_m)에 대한 최대 변형 형광도(maximum variable fluorescence; F_v)의 비율(F_v/F_m)로 나타내었다. 상기 수치가 높을수록 광합성 효율이 우수함을 나타낸다. 그 결과, Fig. 37B에 도시된 바와 같이, 야생종은 발아 후 25일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 35일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, *GSDL2 ox-12*의 경우 발아 후 35일부터 활성의 급격한 감소가 일어났다. 상기 결과로부터, *GSDL2* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수

명연장의 효과는 *GSDL2* 유전자에 의한 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

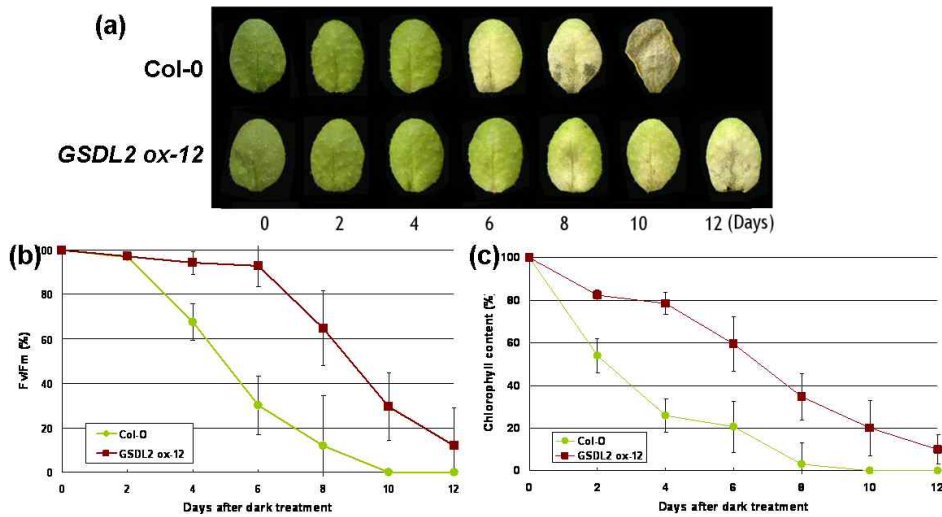


Fig. 38. *GSDL2* 과발현체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징, 광합성 효율 및 엽록소 함량 변화

노화를 촉진한다고 알려진 암 처리에 대한 *GSDL2* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 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, 잎 엽록소 함량 및 광합성 효율을 상기와 동일한 방법으로 측정하여 야생형 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 6일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *GSDL2 ox-12*의 경우 잎의 황화 현상이 6일 이후부터 나타나고 8일째부터 잎의 괴사가 진행되었다(Fig. 38A). 광합성 효율 변화에 있어서 야생종의 경우, 광합성 효율이 암처리 후 6일째 이후 급격한 감소를 보이는 반면, *GSDL2 ox-12*의 경우 암 처리 후 10일째에 야생형의 6일째 광합성 효율과 비슷하게 나타났다(Fig. 38B). 이러한 사실은 *GSDL2*의 과발현이 암 처리에 의한 잎의 노화를 지연시키는 것을 의미하며, 이는 본 유전자가 식물체의 수명 연장을 유도하는데 중요한 역할을 담당하는 생화학적 지표로 삼을 수 있다. 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 Transactions* 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였다. 그 결과 암 처리에 의한 엽록소 함량 변화는 광합성 효율 변화와 같이 *GSDL2* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(Fig. 38C).

*GSDL2*의 과발현 변이체에 대한 염 저항성(drought tolerance) 분석은 3mM MES 용액에 150mM NaCl을 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 2일 간격으로 잎의 표현형적 특징, 광합성 효율 및 엽록소 함량을 측정을 통하여 스트레스에 대한 저항성 정도를 분석하였다. 애기장대 야생형의 경우 NaCl 처리 후 4일째부터 잎의 황화 현상과 더불어 괴사 현상이 유발되는 반면, *GSDL2* 과발현 변이체에서는 6일째에도 잎의 황화 현상만 약간 유발되었을 뿐 잎의 괴사 현상은 거의 일어나지 않았다(Fig. 39A). 이러한 표현형적 특징을 광합성 효

을과 엽록소 함량 변화와 같은 생리·생화학적 조사를 통하여 분석하였다. 그 결과 광합성 효율은 야생형이 NaCl 처리 후 6일째 초기 상태의 30% 정도로 급격히 감소한 반면, *GSDL2* 과발현 변이체에서는 6일째에도 초기 상태의 70% 정도를 유지하고 있었다(Fig. 39B). 이러한 사실은 *GSDL2* 과발현 변이체가 6일 동안의 NaCl 처리에서도 여전히 광합성 능력을 가지고 있음을 나타내며, 이는 *GSDL2* 유전자가 염 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다. 또한 엽록소 함량 변화에 있어서도 *GSDL2* 과발현 변이체는 앞선 광합성 효율과 같은 양상을 나타내었다(Fig. 39C). 이러한 사실은 *GSDL2*가 식물의 수명 연장뿐만 아니라 식물의 염 스트레스에 대한 저항성도 제공한다는 것을 의미한다.

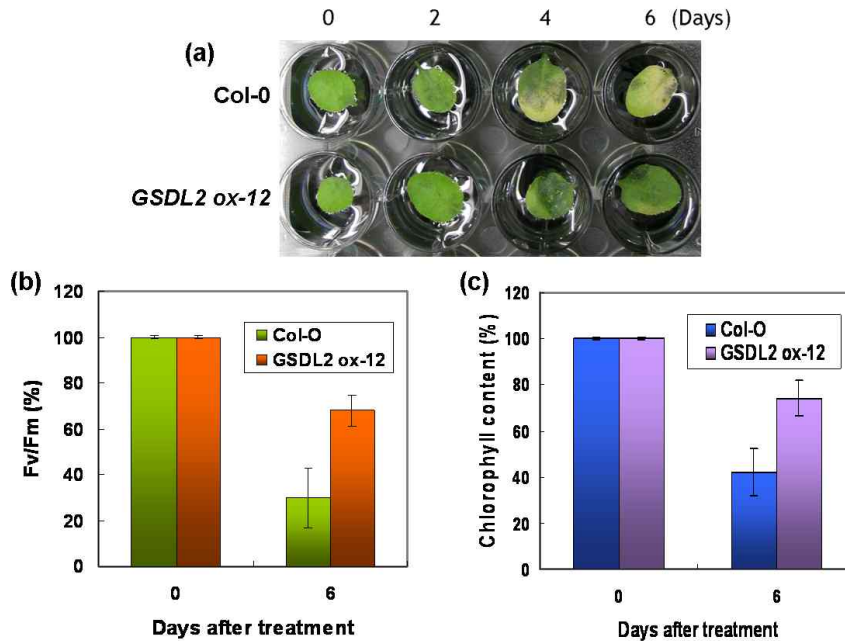


Fig. 39. *GSDL2* 과발현체의 NaCl 처리에 대한 표현형적 특징, 광합성 효율 및 엽록소 함량 변화

GSDL2 과발현 변이체가 외부 환경 스트레스의 하나인 산화적 스트레스에 대한 저항성을 가지는지를 확인하기 위하여 3mM MES 용액에 4mM H₂O₂을 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 2일 간격으로 잎의 표현형적 특징, 광합성 효율 및 엽록소 함량을 측정하여 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형의 경우 H₂O₂ 처리 후 4일째 잎의 황화 현상과 더불어 괴사 현상이 유발되는 반면, *GSDL2* 과발현 변이체에서는 4일째에도 잎의 황화 현상만 약간 유발되었을 뿐 잎의 괴사 현상은 거의 일어나지 않았다(Fig. 40A). 이러한 표현형적 특징을 광합성 효율과 엽록소 함량 변화와 같은 생리·생화학적 조사를 통하여 분석하였다. 그 결과 광합성 효율은 야생형이 H₂O₂ 처리 후 4일째 초기 상태의 10% 정도로 급격히 감소한 반면, *GSDL2* 과발현 변이체에서는 4일째에도 초기 상태의 60% 정도를 유지하고 있었다(Fig. 40B). 이러한 사실은 *GSDL2* 과발현 변이체가 4일 동안의 H₂O₂ 처리에서도 여전히 광합성 능력을 가지고 있음을 나타내며, 이는 *GSDL2* 유전자가 산화적 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다. 또한 엽록소 함량 변화에 있어서도 *GSDL2* 과발현 변이체는 앞선 광합성 효율과 같은 양상을 나타내었다(Fig. 40C). 이러한 사실은 *GSDL2*가 식물의 수명 연장뿐만 아니라 식물의 염 스트레스 및 산화적 스트레스에 대한 저항성도 제공

한다는 것을 의미하며, 본 유전자는 다양한 환경 스트레스 조건하에서도 수명이 연장될 수 있음을 제시하고 있어 우량 작물 개발에 있어 매우 중요한 유전자로 판단된다.

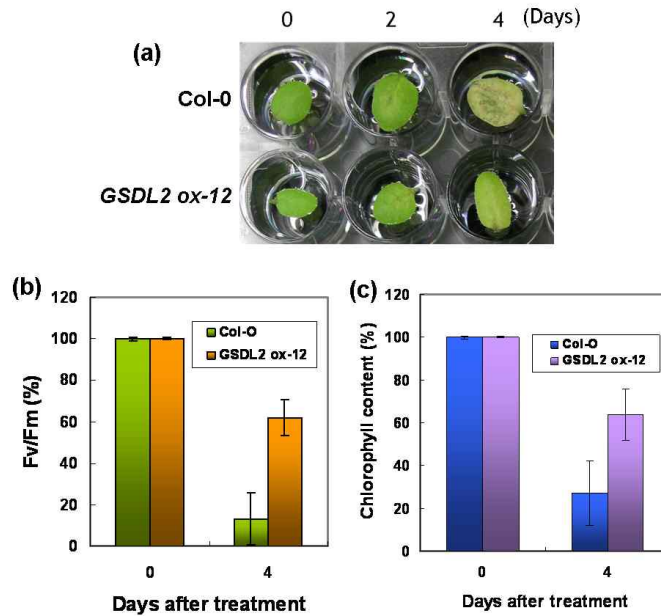


Fig. 40. GSDL2 과발현체의 H₂O₂ 처리에 대한 표현형적 특징, 광합성 효율 및 엽록소 함량 변화

5. 유용 유전자 발굴: *ARF2* (Auxin Response Factor 2, 부록 4 참조)

본 연구팀은 EMS mutagenesis를 통하여 확보된 변이체로부터 노화 지연 표현형을 가지는 *ore14-1* 변이체를 선별하여 노화에 대한 연구를 수행하였다. 이러한 mutation은 식물의 생장에 있어서 pleiotropic effect를 가지며, 표현형적 특징은 다음과 같다; aerial organ의 성장 증가, floral bud opening의 억제, 개화 지연, 그리고 줄기 노화에 있어서의 억제(Fig. 41).

ore14-1 변이에 관여하는 유전자를 동정하기 위하여 map-based cloning을 수행하였다. CAPS marker를 통한 초기 genetic mapping을 통하여 chromosome 5의 LFY locus에 인접한 *ORE14*를 찾을 수 있었다. 야생형과 변이체의 *ORE14*의 염기서열을 비교한 결과, *ore14-1* 변이체에서 auxin response factor 2를 encode하는 At5g62000 유전자의 translational start에서 1673 위치의 치환(G→A)이 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 42). 이러한 mutation은 ARF2 단백질의 558번 위치에서 조기 stop codon으로의 전환(Trp→STOP)을 유발한다. 따라서 *ore14-1* 변이체의 표현형적 특징은 *ORE14* 유전자의 기능 소실에 의하여 유발되었음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *ORE14* 유전자의 knock-out 변이체에서 확인하였다(data not shown).

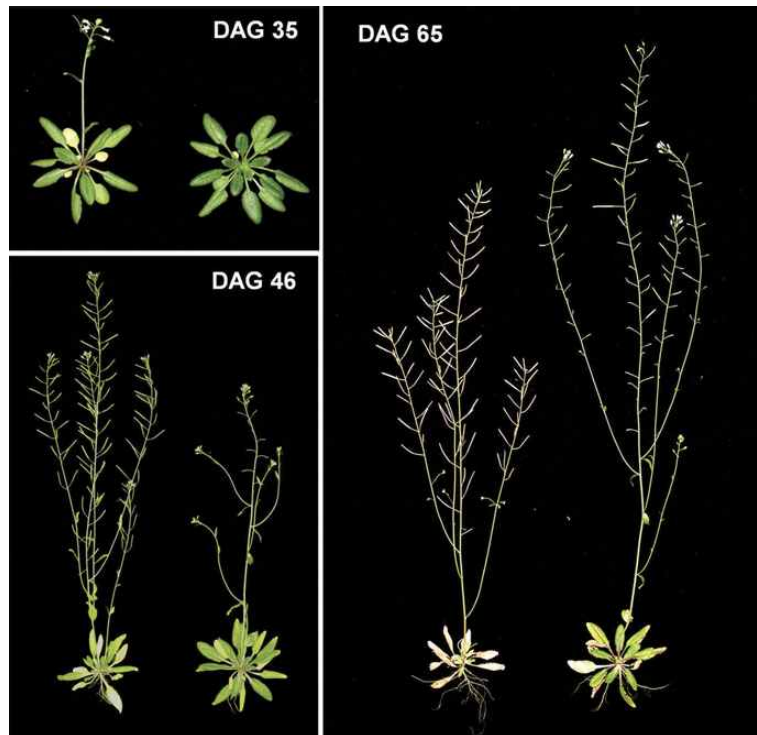


Fig. 41. Whole-plant phenotypes of *Arabidopsis* wild-type ('Col', left) and *ore14-1* mutant (right) plants at 35, 46, and 65 d after germination (DAG).

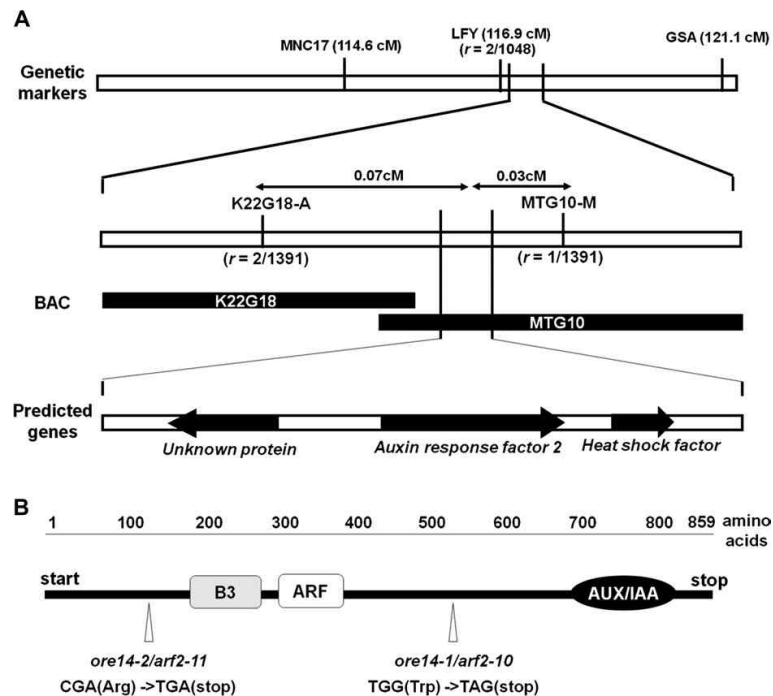


Fig. 42. ORE14 is auxin response factor 2 (ARF2). (A) Map-based cloning of ORE14. The number of recombination events between CAPS markers and the ORE14 locus (r) is shown; BAC, bacterial artificial chromosome; cM, centimorgan. (B) Schematic representation of ORE14 with positions of the *ore14-1* and *14-2* mutations; B3, DNA binding domain; ARF, auxin response region; AUX/IAA, domain involved in dimerization with other ARFs or Aux/IAA.

ore14-1 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, emergence 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽 (rosette leaf)을 매 4일마다 생존율, 광합성 활성, 엽록소 함량, 그리고 ion leakage를 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 28일 이후 잎의 황화 현상이 급격하게 나타났으며 36일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ore14-1* 변이체의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 44일 이후 천천히 진행됨을 확인할 수 있었다(Fig. 43A). 이러한 사실로 미루어보아, *ORE14* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 노화에 따른 생존율, 광합성 활성, 그리고 엽록소 함량 변화는 야생종의 경우 28일 이후부터 급격한 감소를 보이는 반면, *ore14-1* 변이체는 32일 이후 천천히 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 43B-D). 한편 ion leakage 변화는 이와 반대로 *ore14-1* 변이체에서 증가 현상이 현저히 지연됨을 확인할 수 있었다(Fig. 43E). 상기 결과로부터, *ore14-1* 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *ORE14* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

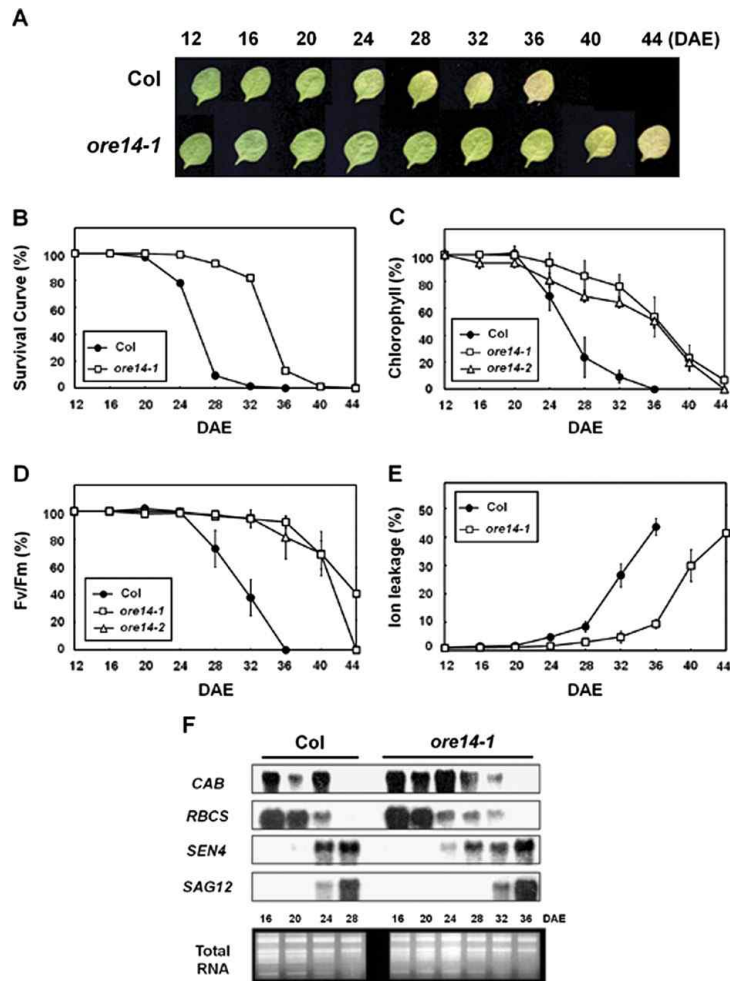


Fig. 43. Extended leaf longevity in *ore14/arf2* mutants. (A) Age-dependent senescence phenotype, (B) Survival curve, (C) chlorophyll contents, (D) photochemical efficiency (Fv/Fm) of PSII, (E) membrane ion leakage, and (F) Age-dependent changes in gene expression.

야생종과 *ore14-1* 변이체에서 노화관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 각 노화관련 유전자들의 발현양상을 Northern blotting을 통해 확인하였다. 노화 마커 유전자로는 *CAB*, *RBCS*, *SEN4*, 및 *SAG12* 유전자를 사용하였다. Northern blotting 양성 대조구로는 EtBr에 염색되는 total RNA를 사용하였다. *CAB*과 *RBCS* 유전자의 경우, 노화가 지속되는 동안 그들의 발현이 반비례적으로 감소하는 반면, *SEN4* 및 *SAG12* 유전자의 경우, 노화가 지속되는 동안 그들의 발현이 비례적으로 증가하는 현상을 보인다. 야생형에 비하여 *ore14-1* 변이체의 경우, 이러한 유전자 발현의 감소 및 증가 현상이 현저히 저하됨을 확인할 수 있었다(Fig. 43F). 노화를 촉진한다고 알려진 암 처리에 대한 *ore14-1* 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성은 앞서 언급한 age-dependent senescence와 같은 경향을 가졌다(Fig. 44). 이러한 사실을 종합해보면 *ORE14* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

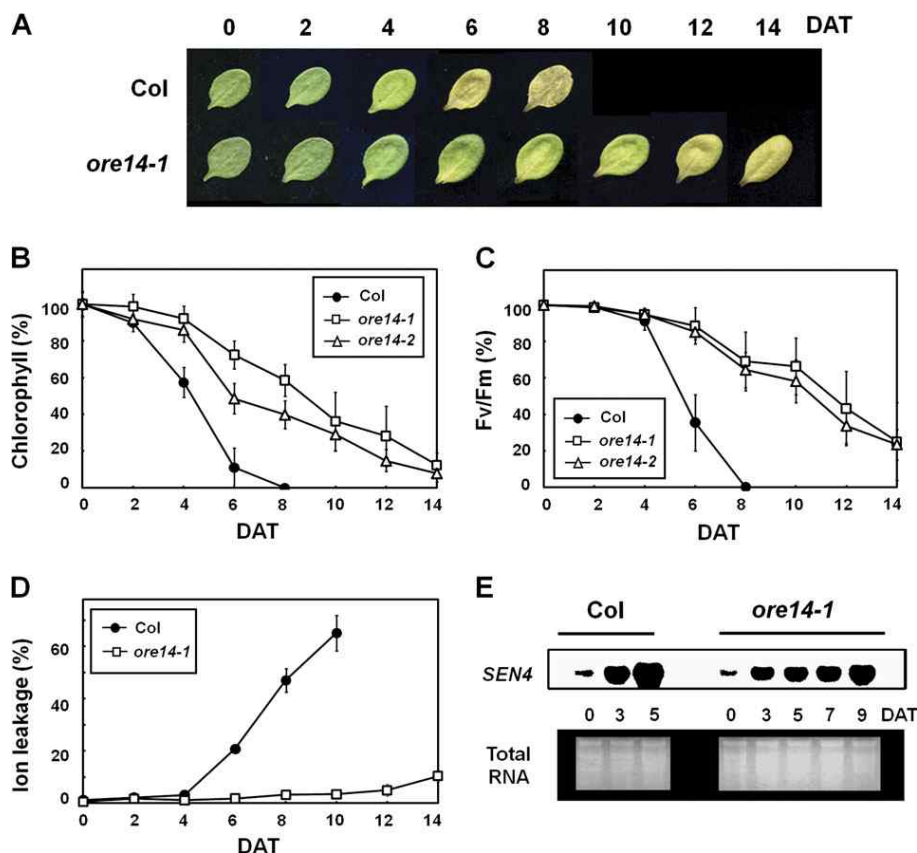


Fig. 44. Delayed leaf senescence of *ore14/arf2* mutants during dark-induced senescence. (A) dark-induced leaf senescence phenotype, (B) chlorophyll contents, (C) photochemical efficiency (Fv/Fm) of PSII, (D) membrane ion leakage, and (E) Age-dependent changes in gene expression.

ore14-1 변이체에서 나타나는 식물 잎의 노화 지연과 더불어 외부 환경 스트레스의 하나인 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공하는지를 확인하기 위하여 외부 H₂O₂ 스트레스 처리에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형의 경우 H₂O₂ 처리 후 4일째 잎의 황화 현상 및 엽록소 함량 감소가 현저히 유발되는 반면, *ore14-1* 변이체에서는 4일째에도 잎의 황화 현상이 거의 유발되지 않았고 또한 엽록소 함량에 있어서도 초기 상태의 80% 이상을 유지하고 있었다(Fig. 45). 이러한 사실은 *ORE14*가 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

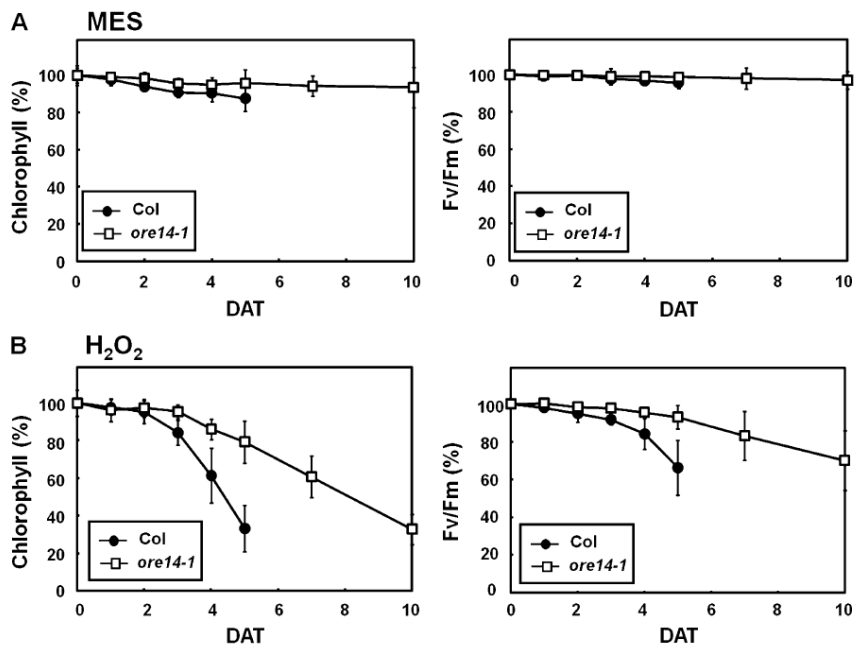


Fig. 45. Delay of leaf senescence in the *ore14-1* mutant during senescence accelerated by oxidative stress. The third and fourth rosette leaves were detached at the age of 12 d and incubated under continuous light in MES buffer alone (A) and with 15 mM hydrogen peroxide (B). Chlorophyll content and photochemical efficiency are presented as average per cent values 6SD, relative to those of leaves incubated in light (n=24). DAT, days after treatment.

제 3 절. 잔디 형질전환

1. 형질전환용 벡터 construct 제작

본 연구팀은 기확보된 유용 유전자에 대한 잔디 형질전환체를 개발하기 위하여 다양한 constitutive promoter(dual 35S, 4X 35S enhancer element, and ubiquitin promoter)를 사용하여 유전자 발현 construct를 제작하여 형질전환을 수행하였다. 적용 유전자는 TPR domain, *AtSIZ* 그리고 *ORE7*이며, 이들에 대한 construct는 다음과 같다:

- TPR domain: pNB96-TPR (Fig. 11 참조)
- *AtSIZ*: pNB96-*AtSIZ*, IG-2::*AtSIZ* (Fig. 46)
- *ORE7*: 4X 35S::*ORE7*, IG-2::*ORE7* (Fig. 47)

한편 발굴된 신규 유용 유전자에 대한 잔디 형질전환체를 개발하기 위하여 constitutive ubiquitin promoter를 사용하여 유전자 발현 construct를 제작하여 형질전환을 수행하였다. 적용 유전자는 *AtGA2ox4*, *ATHG1(GSDL1)* 그리고 *GSDL2*이며, 이들에 대한 construct는 다음과 같다:

- IG-2::*AtGA2ox4*, IG-2::*GSDL1*, IG-2::*GSDL2* (Fig. 48)

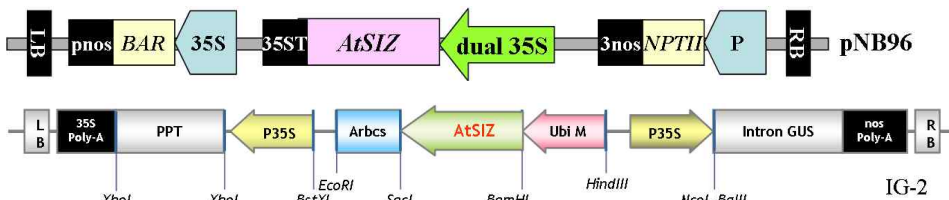


Fig. 46. 잔디 형질전환을 위한 *AtSIZ*에 대한 vector construct. pNB96-*AtSIZ*(위), IG-2::*AtSIZ*(아래)

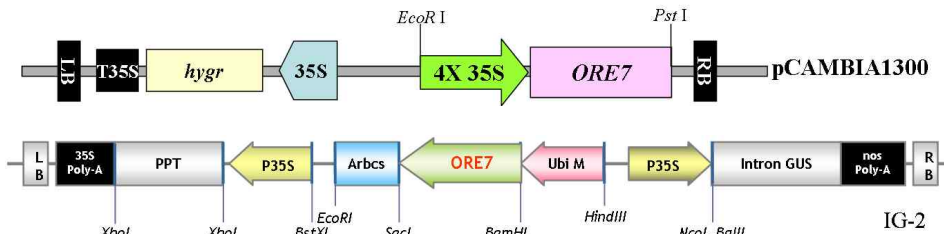


Fig. 47. 잔디 형질전환을 위한 *ORE7*에 대한 vector construct. 4X 35S::*ORE7*(위), IG-2::*ORE7*(아래)

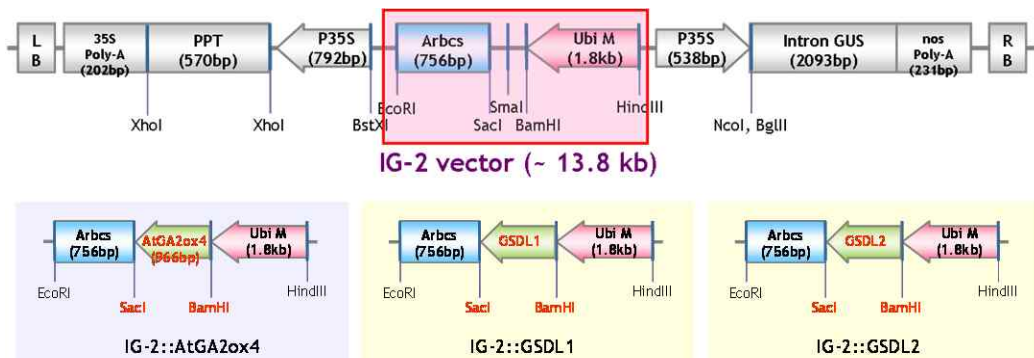


Fig. 48. 잔디 형질전환을 위한 *AtGA2ox4*, *ATHG1(GSDL1)*, 그리고 *GSDL2*에 대한 vector construct

2. 잔디 형질전환 효율 개선

재분화 능력이 뛰어난 **callus** 선발 및 **현탁배양법**을 이용한 증식효율성적합성 조사: 들잔디의 경우 이미 선행연구를 통해 캘러스 유도, 증식 및 재분화 조건을 확립하였고 아그로박테리움을 이용한 형질전환법도 개발하였지만 현재까지 잔디의 재분화율과 형질전환율은 그다지 높지 않아 형질전환체 생산이 매우 어렵다. 특히 유전적으로 고정된 품종이 존재하지 않으며 각각의 종자의 유전자형이 동일하지 않기 때문에 기존에 확립된 형질전환 프로토콜만으로는 안정적인 형질전환 식물체의 확보가 어려운 현실이다. 또한 캘러스 유도 후 형질전환이 가능한(재분화 능력이 있는) 캘러스를 선발하기까지 약 6개월이라는 긴 시간이 필요하고 일정기간이 지나면 그 능력을 상실하는 단점이 있다. 따라서 본 연구기간동안 형질전환이 가능한(재분화 능력이 있는) 캘러스를 효율적으로 선발함과 동시에 증식/유지 할 수 있는 방법으로 현탁배양법의 적합성을 검토하였다.

먼저, 들잔디의 성숙 종자(Fig. 49A)로부터 캘러스를 유도하고(Fig. 49B-H), 정상적인 식물체로 재분화하는 캘러스만을 선발하여 MS 캘러스 증식배지에서 증식하였다(Fig. 50). 들잔디 유래의 캘러스들은 2주마다 계대배양하여 증식시킨 후 재분화 실험을 수행하고 재분화 능력이 있는 캘러스 line만을 증식/유지하였다(Fig. 51). 각각의 성숙종자에서 유래한 들잔디 캘러스의 재분화능을 검토한 결과, 각 종자 유래의 캘러스마다 재분화능에 큰 차이를 보였다. 그 중 37번 종자에서 유래한 캘러스 line에서 가장 높은 재분화율을 확인할 수 있었다. 재분화능이 가장 높은 것으로 확인된 캘러스 line(37번 종자에서 유래한 캘러스 line)의 일부를 현탁배양하여 증식한 후 그 증식세포를 관찰하고(Fig. 52), 재분화 실험을 수행한 결과 현탁배양에 의하여 얻어진 캘러스는 고체배지에서 증식/유지된 캘러스보다 훨씬 높은 재분화 능력을 가지고 있음을 확인하였다(Fig. 53). 따라서 현탁배양을 이용한 들잔디 캘러스를 이용할 경우 형질전환 효율이 크게 증가할 것으로 기대하고 있다(SCI급 논문투고 준비 중).

들잔디 외에 경제적가치가 매우 큰 Creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L., cv. Pencross)도 종자를 확보하여 캘러스를 유도하였으며(Fig. 49I-J), 이를 통하여 고효율 형질전환 시스템을 확립하였다.

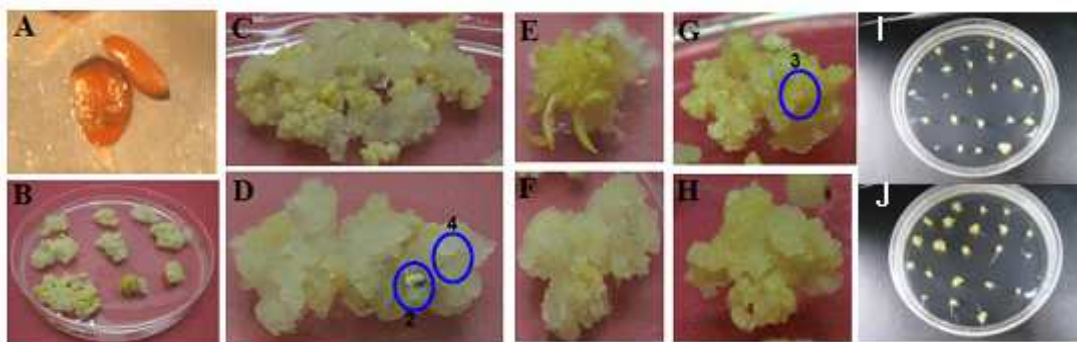


Fig. 49. 들잔디의 성숙종자로(A)부터 유도/증식된 캘러스들(B-H)과 Creeping bentgrass에서 유도중인 캘러스(I, J).



Fig. 50. 형질전환 가능한(재분화 능력이 있는) 캘러스의 선발 및 증식. A: 증식중의 캘러스, B와C: 증식중의 캘러스의 모양, D: 재분화능이 있는 캘러스.

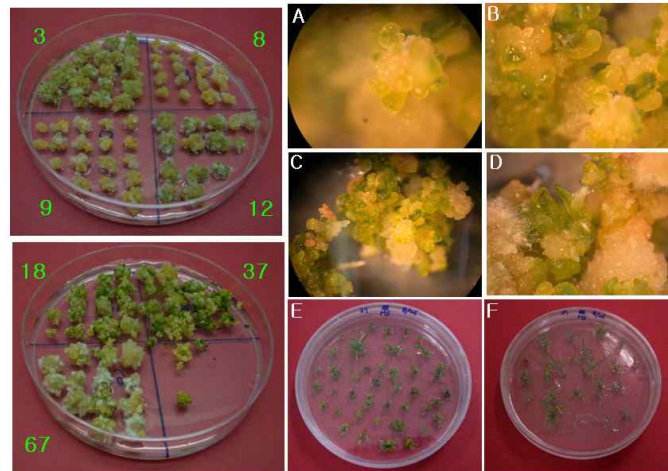


Fig. 51. 각각 다른 종자에서 유도/증식한 캘러스의 재분화

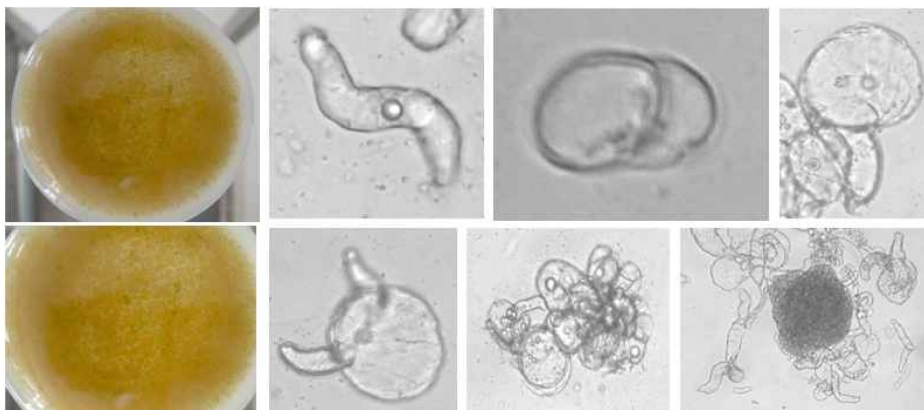


Fig. 52. 현탁배양에 의해 증식한 캘러스의 세포분열 형태. A : Elongated cell, B: rounded cells, C: embryonic cell with a transverse and unequal division pattern, D: embryonic cellular aggregate, E: compact cell aggregate with a globular embryo.

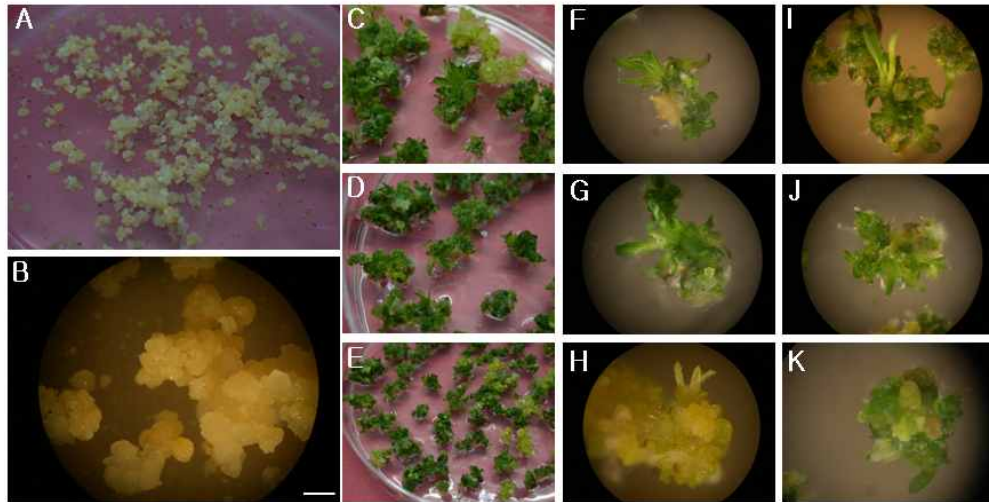


Fig. 53. 현탁배양에 의해 선발한 캘러스 line의 증식(A, B) 및 재분화(C-K)

제 4 절. 잔디 형질전환체 생산 및 개발

1. 잔디 기능 분석을 위한 기초 연구

목표형질인 왜성, 녹기연장, 스트레스 내성 분석 등의 기능 분석을 위한 기초 연구를 수행하였다. 먼저 잔디의 왜성을 정량적으로 분석하기 위하여 야생형 잔디 지상부의 형태적 특성을 조사하여 이를 지표로 삼고자 한다(Table 8).

Table 8. 잔디 지상부의 형태적 특성 분석

초고 (cm)	엽장 (cm)	엽폭(cm)	엽각	최하위높이(cm)	엽록소함량 (mg/g)
19.9±3.9	17.8±3.3	5.5±0.8	24.5±5.1	3.8±0.7	1.04±0.19

두 번째로, 잔디 잎의 노화를 분석하기 위한 생리 실험 조건을 탐색하였다. 모델식물이나 담배, 콩 등의 작물에서 노화 분석에 이용되는 방법인 detached leaf을 암처리하여 노화를 인위적으로 유도하였다. 유식물 상태에서도 노화 유도가 가능하므로 잔디 노화지연 표현형 분석 시 충분히 활용이 가능할 것이다. 노화 진행 정도는 leaf yellowing으로 일차 점검하고 정량분석을 위해 엽록체 함량을 조사하였다(Fig. 54).

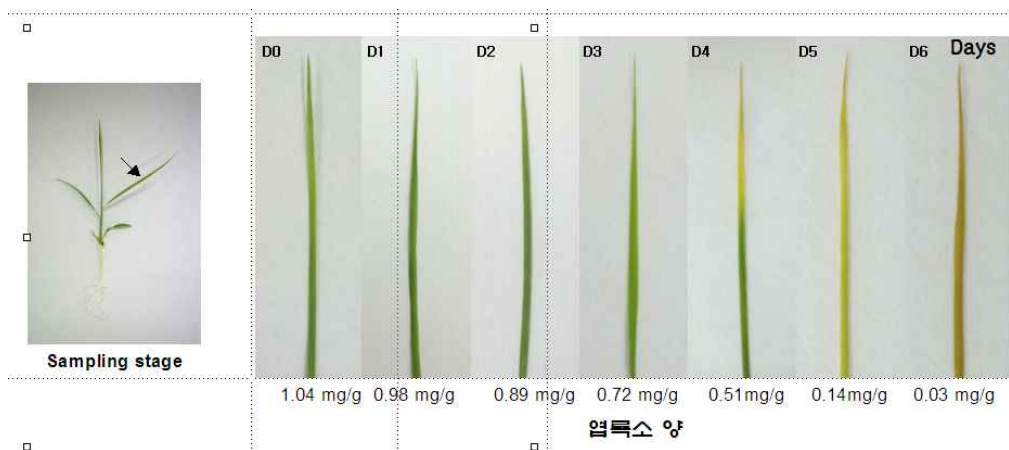


Fig. 54. 암 처리후 detached 잎의 노화 진행 정도

잔디의 노화특이 마커의 선별을 위해 DEG (Differentially Expressed gene) 기법을 이용해 정상의 잎과 노화가 진행된 잎의 특이 발현 유전자를 탐색하였다. Total RNA는 정상 잎과 노화가 반 정도 진행되어진 잎에서 Invitro gene사의 Trizol을 사용하여 추출하였다. 정상 잎과 노화가 진행된 잎의 total RNA로부터 1차 cDNA는 Seegene사의 GeneFishing kit에서 제공하는 ACP (annealing control primer)를 사용하여 Promega사의 Reverse Transcription System을 통해 합성하였다. 각각의 sample에서 합성된 1차 cDNA는 특이적 DEG를 선별을 위해 GeneFishing kit에서 제공하는 30종의 arbitrary ACT primer로 PCR을 수행하여 특이 발현 유전자를 선별하였다. 실험결

과 30개의 arbitrary primer set로부터 정상 잎(Green stage)에서 발현이 높은 2개의 DEG (21ZG1-3, 24ZG1-1)를 분리하였으며 노화가 진행된 잎(senescence stage)에서 발현이 높은 4개의 DEG (5ZS1-2, 6ZS1-3, 6ZS1-4, 27ZS1-1)를 분리하였다(Fig. 55). 현재 각 DEG 유전자들의 염기서열을 결정한 후 database를 이용하여 각 clone들을 분석하고 있다(Table 9).

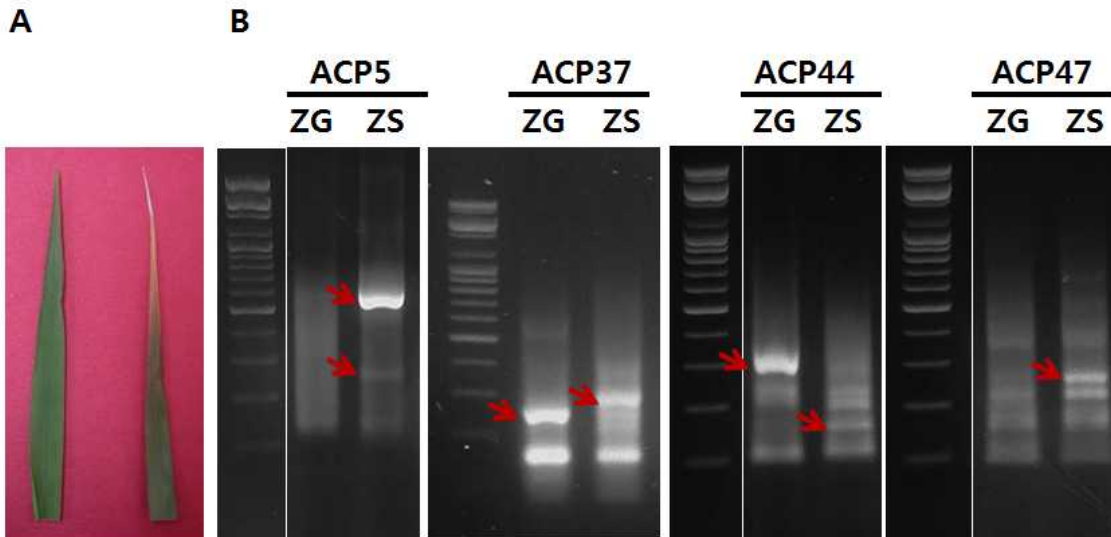


Fig. 55. 성숙한 녹색 잎과 노화가 진행되는 잎의 cDNA로부터 얻어낸 DEG screening의 결과. (A) 실험에 사용된 성숙한 녹색 잎(Green stage)과 노화가 진행된 잎(senescence stage), (B) 성숙한 녹색 잎과 노화가 진행된 잎 특이 발현 DEG. ZG : Zoysiagrass green stage, ZS : Zoysiagrass senescence stage.

Table 9. DEG clone의 염기서열 분석결과

Clone	Accession number	Organism and cDNA homology
5ZS1-2	NP_001043344	<i>Oryza sativa</i> hypothetical protein
6ZS1-3	NP_001151338	<i>Zea mays</i> plant specific subfamily of the SGNH-family of hydrolases
6ZS1-4	Q8S2U8	<i>Zea mays</i> Plasma membrane H ⁺ -transporting ATPase-like protein
27ZS1-1	XP_002447205	<i>Sorghum bicolor</i> Ion transport protein
21ZG1-3	NP_001064711	<i>Oryza sativa</i> hypothetical protein
24ZG1-1	O48550	<i>Zantedeschia aethiopica</i> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit

2. TPR-잔디 형질전환체 생산 및 개발

가. TPR-잔디 형질전환체 생산

고효율 잔디 형질전환 방법을 이용하여 유용성(왜화 유도)이 검증된 애기장대 TPR (Tricopeptide repeat domain of PAPP5 in *Arabidopsis*) 영역을 도입시켜 얻은 형질전환 잔디를 생산하였다. 이들 형질전환 잔디는 순화과정을 거친 후(Fig. 56), 바스타 페인팅 방법으로 1차 선발하였고 저항성을 보인 형질전환체를 대상으로 바스타를 살포하여 최종 선발하였다(Fig. 57). 현재 TPR 영역이 도입된 형질전환 몽고잔디는 8 line 확보하였다.

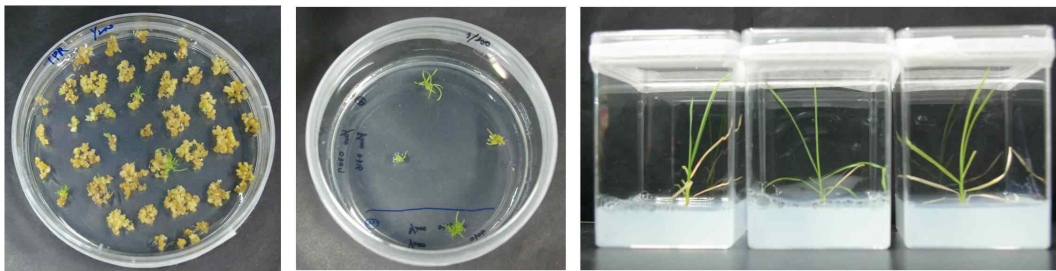


Fig. 56. TPR 영역이 들어있는 형질전환 몽고잔디의 생산. 형질전환체는 phosphinotricin (3-5ppm)이 들어있는 배지에서 선발.

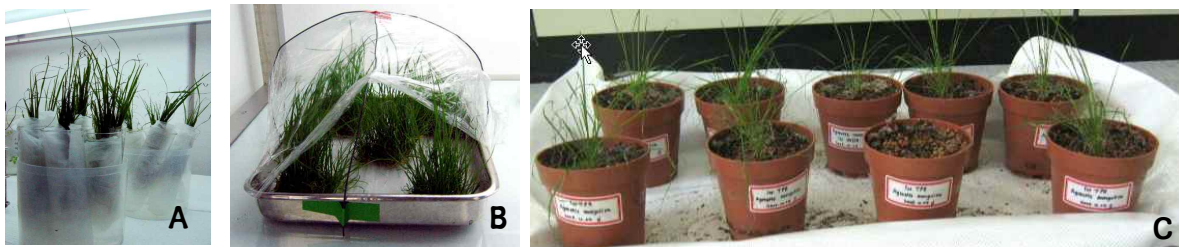
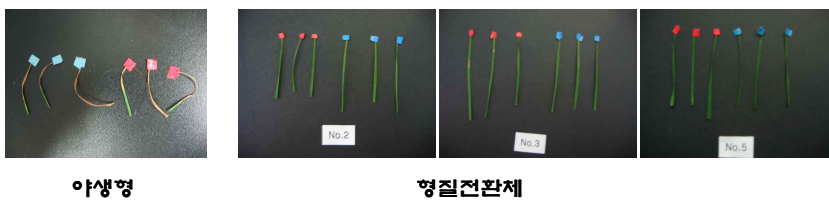


Fig. 57. 형질전환 몽고잔디 순화



야생형

형질전환체



야생형

형질전환체

Fig. 58. TPR-형질전환체의 바스타 저항성 분석. 상단: 페인팅 방법을 이용하여 바스타 저항성 분석. 하단: 바스타 살포 1주일 후 표현형.

나. TPR-잔디 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석

바스타 살포 후 생존한 형질전환 잔디들에 대해서 유전자 도입 및 발현 분석을 실시하였다. 목표 유전자 도입 여부는 PCR 방법으로, 그리고 유전자 발현 여부는 RT-PCR 방법으로 분석을 수행하였다. 야생형과 TPR-형질전환 잔디의 Genomic DNA(gDNA)를 분리한 후 *PAT*(바스타 저항성 유전자) 및 왜성유도 유전자(*AtTPR*)의 primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과, 형질전환 잔디에서 도입 유전자가 존재함이 확인되었으며, 또한 도입된 유전자의 발현을 확인하기 위해 total RNA를 분리한 후 1차 cDNA를 합성하였고 이 cDNA를 대상으로 *PAT* 및 *TPR* primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과, 분석한 형질전환 잔디에서 도입유전자의 발현이 최종 확인되었다(Fig. 59). 이러한 결과는 TPR domain이 정상적으로 잔디로 삽입되었고, 잔디에서 정상적으로 발현한다는 것을 증명한다.



Fig. 59. 형질전환 잔디의 *TPR* 및 *PAT* 유전자 도입 및 발현분석

다. TPR-잔디 형질전환체의 왜성 표현형 분석

TPR 영역이 도입된 형질전환 잔디의 표현형분석 결과 8개 line 가운데 6개 line에서 야생형 잔디에 비해 왜성을 나타냄을 확인 하였다. 분석에 사용하였던 형질전환 잔디는 T0 세대로 순화 시 초기 식물의 생육상태에 차이가 있었으므로 관찰된 왜성 표현형을 재확인하기 위해 식물의 지상부를 2 cm만 남기고 절단 한 후 성장상태를 비교하였다. 일차 분석 결과와 마찬가지로 cutting 90일 이후 관찰 했을 때, TPR 형질전환식물체에서 왜성 표현형을 나타냄을 확인 할 수 있었다.

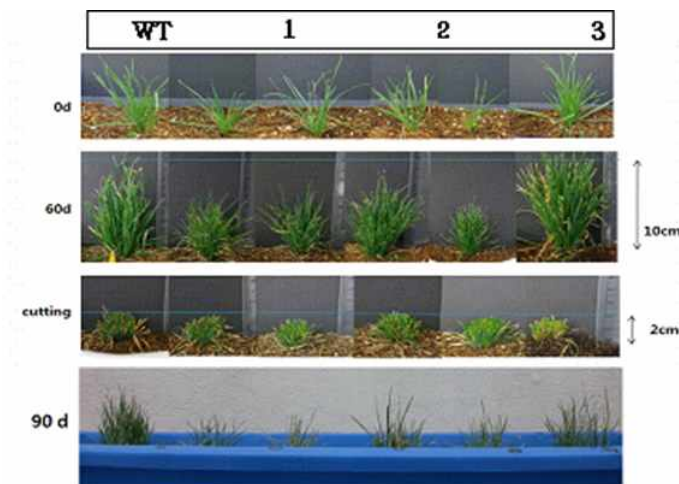


Fig. 60. *TPR* 유전자를 도입한 형질전환 몽고잔디의 왜성 표현형

3. AtSIZ-잔디 형질전환체 생산 및 개발

가. AtSIZ-잔디 형질전환체 생산

환경스트레스 내성 유도 유전자인 *AtSIZ*는 몽고잔디와 creeping bentgrass, 들잔디에 각각 도입시켰다. 잠정 형질전환체는 바스타 페인팅 방법으로 1차 선발하였고 저항성을 보인 형질전환체를 대상으로 PAT 단백질 발현 여부를 분석하는 strip test를 실시하여 최종 선발하였다(Figs. 61-63). 현재 *AtSIZ* 유전자가 도입된 몽고잔디는 7 line, 벤투그라스는 3 line, 들잔디는 2 line을 확보하였다.



Fig. 61. *AtSIZ*를 도입시킨 형질전환 몽고잔디

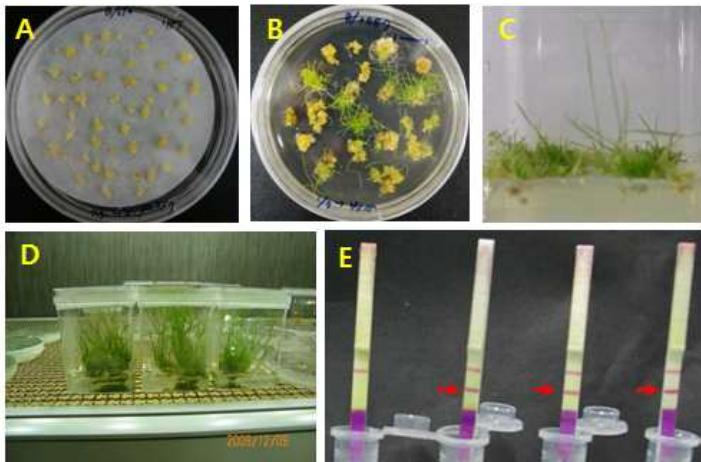


Fig. 62. 형질전환 bentgrass의 선발 및 유전자도입 확인(*AtSIZ*). A, 캘러스 선발; B, Shoot 유도 및 선발; C, Root 유도 및 선발; D, 형질전환 식물; E, 형질전환체 확인 테스트

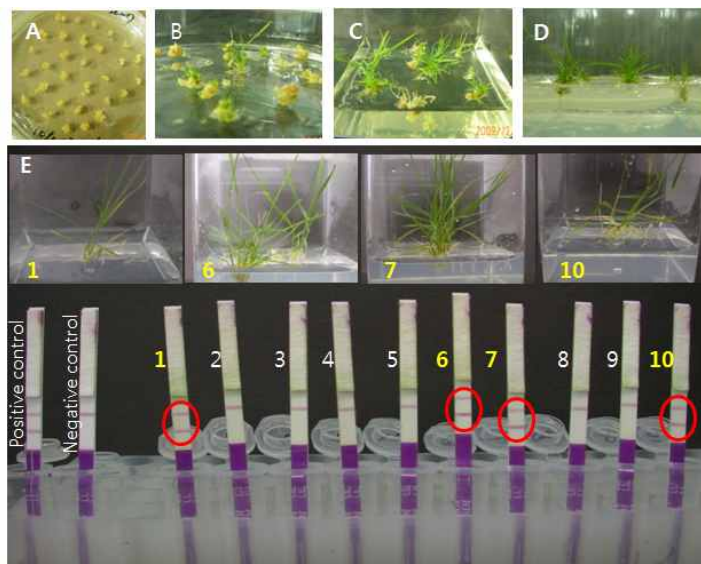


Fig. 63. 형질전환 들잔디의 선발 및 유전자도입 확인(*AtSIZ*). A, 캘러스 선발; B와 C, Shoot 유도 및 증식; D, Root 유도 및 선발; E, 형질전환 식물과 형질전환체 확인 테스트

나. *AtSIZ*-잔디 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석

바스타 살포 후 생존한 형질전환 잔디들에 대해서 유전자 도입 및 발현 분석을 실시하였다. 목표 유전자 도입 여부는 PCR 방법으로, 그리고 유전자 발현 여부는 RT-PCR 방법으로 분석을 수행하였다. 야생형과 *AtSIZ* 형질전환 잔디의 Genomic DNA(gDNA)를 분리한 후 목표 유전자 (*AtSIZ*)의 primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과, 유전자의 도입이 확인되었으며, 또한 도입된 유전자의 발현은 RT-PCR 방법을 통해 확인하였다(Fig. 64).

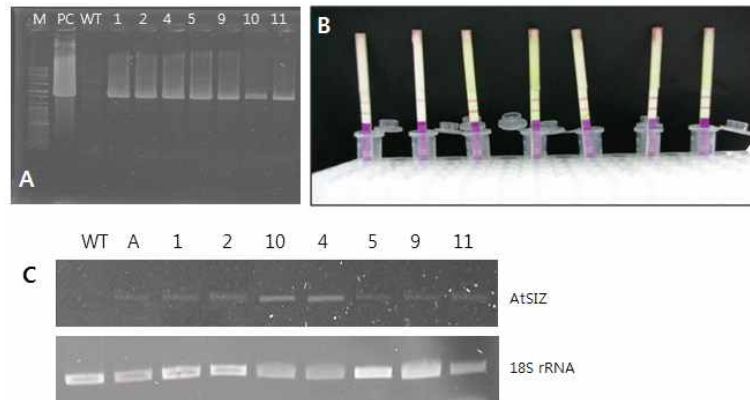


Fig. 64. *AtSIZ* 유전자의 도입 및 발현 확인. A, genomic-PCR; B, PAT protein detection; C, RT-PCR

다. *AtSIZ*-잔디 형질전환체의 스트레스 저항성 표현형 분석

AtSIZ 유전자가 도입된 형질전환 식물을 순화하여 형질전환 식물전용 온실에서 재배하여 건조 스트레스 및 염 스트레스 저항성을 검토하였다.

건조 스트레스 저항성을 검토한 결과, 야생형과 형질전환체 5번 line은 처리 후 14일 째 되는 날부터 잎의 고사가 시작되었으며 21일 후에는 완전히 고사된 반면 형질전환체 11번 line은 처리 한 달 후 고사하였으며, 다른 형질전환 식물체 line 4, 9, 10번은 처리 후 한 달이 지난 후에도 여전히 생존함을 관찰할 수 있었다(Fig. 65). 건조 처리한 식물체의 생리적인 변화를 분석하기 위해 잎의 수분함량과 엽록소 함량을 조사한 결과 표현형과 일치하는 결과를 얻었다. 현재 생리분석 실험은 반복실험을 통해 재확인 중에 있다.

200 mM NaCl 처리 후 28일이 지난 식물체들의 염 저항성을 비교한 결과, 야생형 잔디는 고사하였으나 형질전환 식물 line 4, 5, 9번은 여전히 생존/증식하고 있음이 관찰되었다(Fig. 66). NaCl 처리 후 야생형 잔디와 형질전환 잔디의 엽록소 함량을 측정된 결과, 건조 스트레스 처리 후의 결과와 같이 야생형 잔디의 엽록소 함량은 급격히 감소하였으나 형질전환 잔디 line들에서는 엽록소 함량이 천천히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 67). 또한 절단된 엽초를 25 mM NaCl 용액에서 incubation 시켰을 때 *AtSIZ* 형질전환 식물들은 야생형식물체보다 염 스트레스에 대한 저항성이 향상되었음이 확인되었다(Fig. 68).

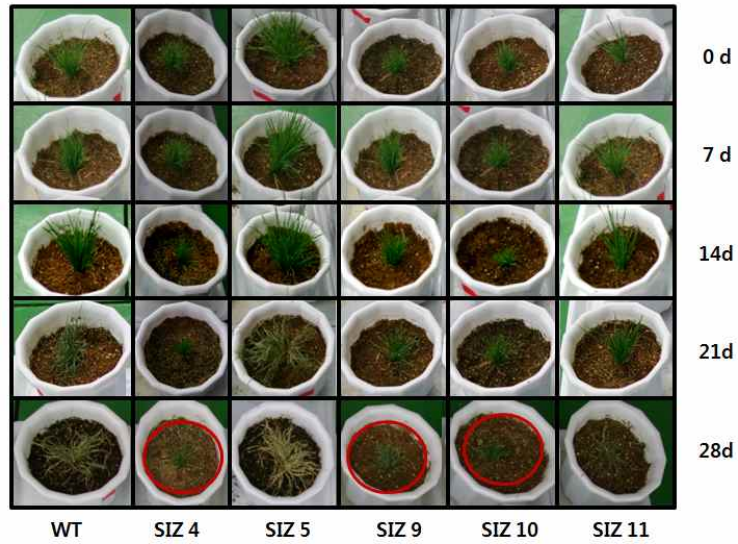


Fig. 65. *AtSIZ* 유전자가 도입된 몽고잔디의 건조 스트레스 저항성 테스트

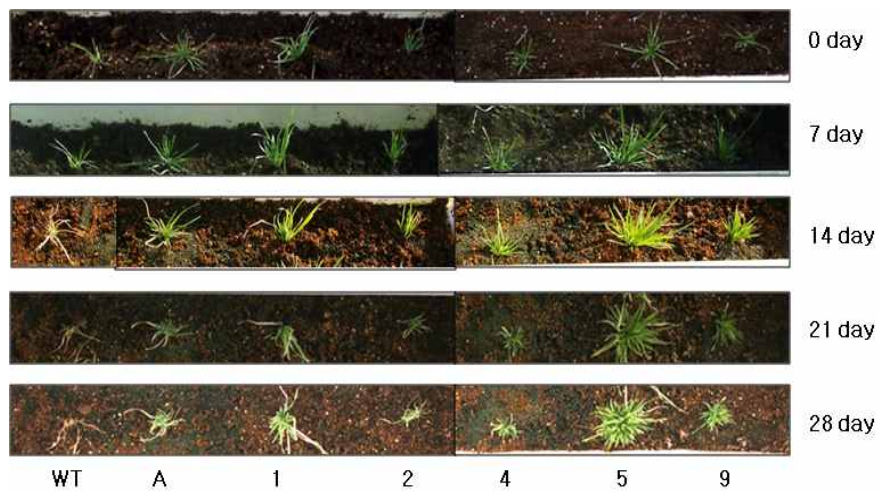


Fig. 66. *AtSIZ* 유전자가 도입된 몽고잔디의 염(200 mM NaCl) 스트레스 저항성 테스트

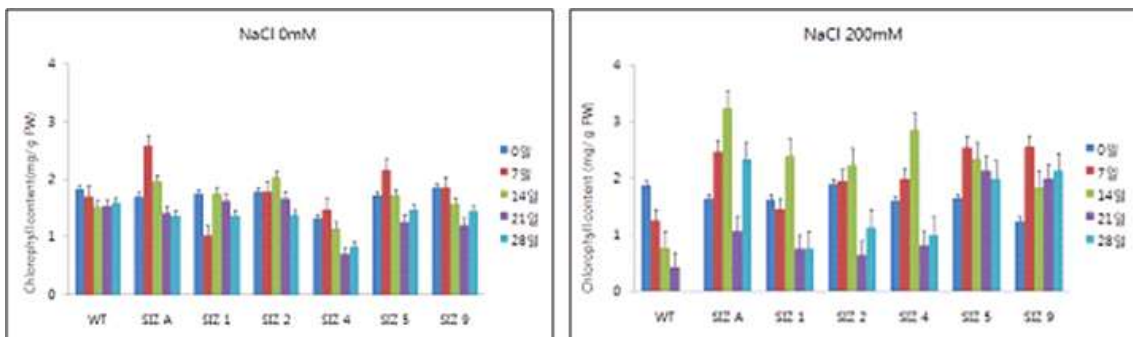


Fig. 67. *AtSIZ* 유전자가 도입된 몽고잔디의 염(200 mM NaCl) 처리 후 엽록소 함량의 변화

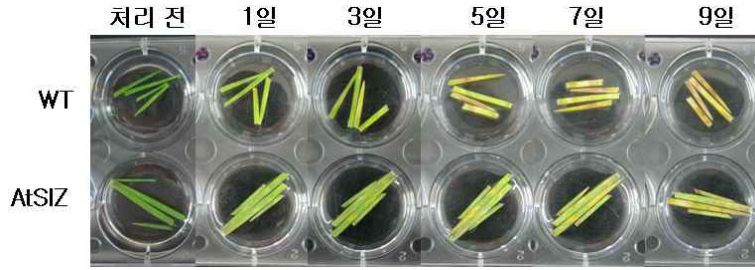


Fig. 68. *AtSIZ*가 도입된 형질전환 몽고잔디의 염스트레스 저항성(NaCl 25mM)

4. ORE7-잔디 형질전환체 생산 및 개발

가. ORE7-잔디 형질전환체 생산

ORE7 유전자는 애기장대에서 분리된 노화의 음성조절자로서 녹기 연자장을 목적으로 잔디에 형질전환하였다. 기 확립된 현탁배양 체계를 이용하여 들잔디 및 Creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L., cv. Pencross) 각각에 *ORE7* 유전자 도입을 시도하였다. 16개체의 잠정 형질전환 Creeping bentgrass 식물체가 선발되었으며(Fig. 69), 들잔디의 경우 현재 형질전환체 선별 및 일차 기능분석을 수행 중에 있다. 선발된 Creeping bentgrass를 대상으로 선발 마커인 바스터 저항성 PAT 단백질 발현분석을 통해 형질전환체임을 최종 확인 하였다(Fig. 70).

MS + maltose 30g/l, BA 1mg/l, PPT 5mg/l, cefotaxim 250mg/l

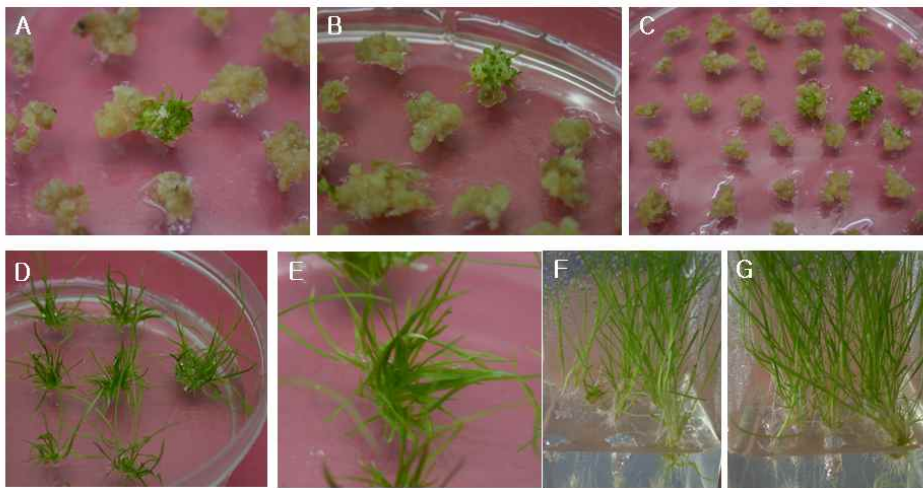


Fig. 69. *ORE7* 유전자를 포함하는 아그로박테리움을 bentgrass 캘러스에 감염시킨 후 선발배지에서 형성된 형질전환체

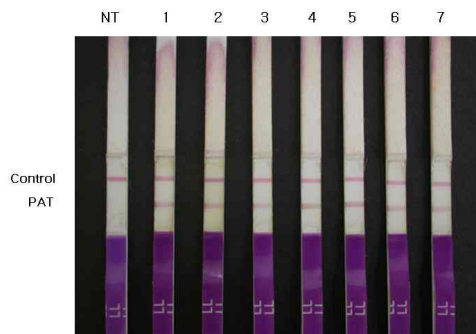


Fig. 70. *ORE7* 유전자를 도입시킨 creeping bentgrass 형질전환식물의 PAT 단백질 분석

나. ORE7-잔디 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석

PAT 단백질 발현분석 결과 양성 반응을 보인 형질전환체로부터 Genomic DNA를 분리한 후 PCR 및 Southern blot 분석을 실시하였다. ORE7 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과, 분석한 모든 형질전환체에서 유전자 도입이 확인되었다. 또한 T-DNA 바깥에 존재하는 Vir 유전자-specific primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 모두 negative 특성을 가졌다(Fig. 71). 이러한 결과는 증폭된 ORE7 PCR product가 *Agrobacterium*에 의한 contamination이 아니라는 것을 나타낸다.

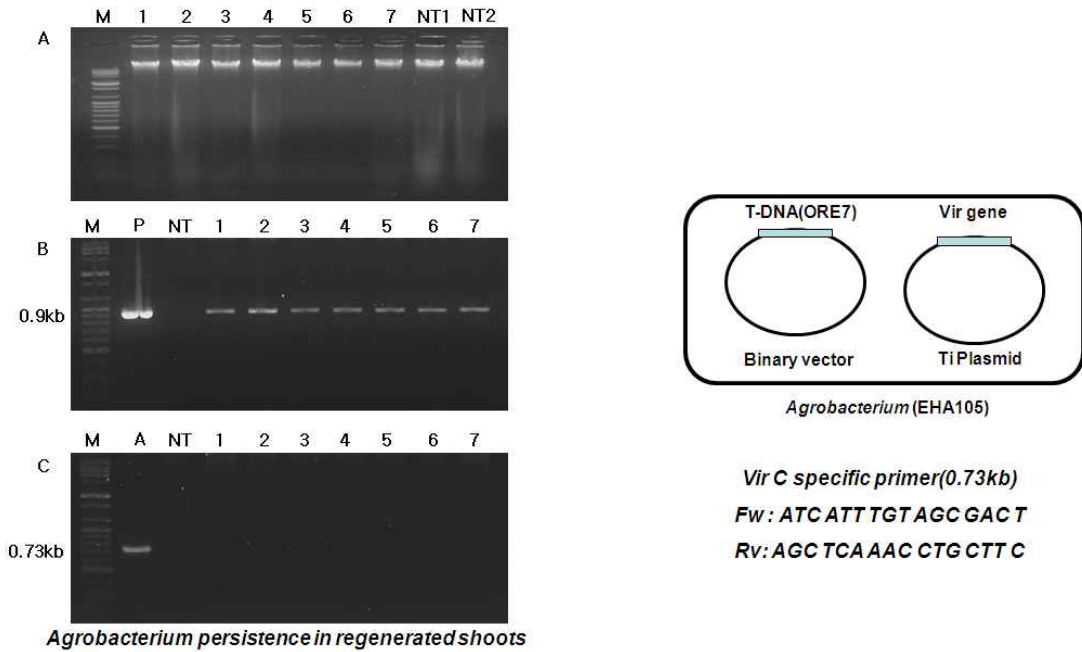


Fig. 71. creeping bentgrass 형질전환 잔디에서의 ORE7 gene 의 도입확인. (A) 형질전환 식물체에서 분리된 Genomic DNA, (B) ORE7 primer를 이용한 PCR 산물, (C) VirC primer를 이용한 PCR 산물

도입된 ORE7 유전자의 발현 분석은 RT-PCR 방법으로 수행하였으며, 그 결과 모든 변이체에서 ORE7 유전자가 정상적으로 발현됨을 확인하였다(Fig. 72). 이러한 분석을 통하여 확보된 16 형질전환 잔디들이 각각 독립적인 line인지 확인하기위해 genomic Southern blot 분석을 수행하였다. 그 결과 이들은 2개의 독립적인 형질전환 line들로 판명되었다(Fig. 73).

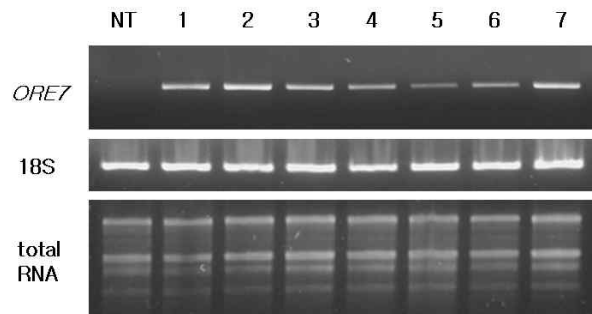


Fig. 72. RT-PCR 방법을 이용한 형질전환 Creeping bentgrass의 ORE7 유전자 발현 분석.

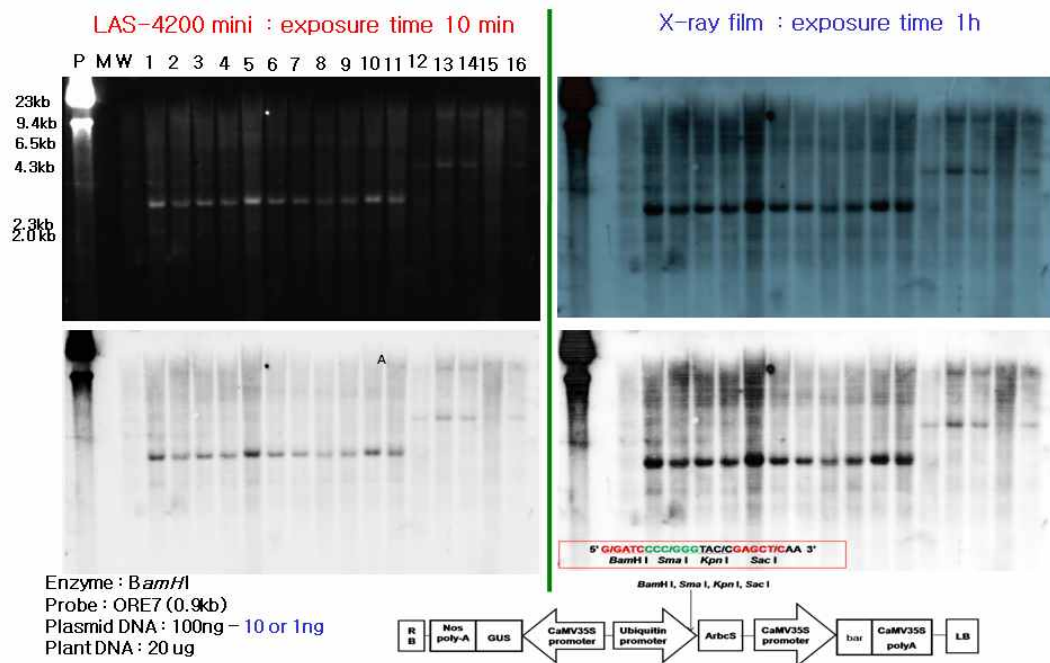


Fig. 73. *ORE7* 형질전환체의 Genomic Southern blot 분석.

다. *ORE7*-잔디 형질전환체의 녹기 연장 및 스트레스 저항성 표현형 분석

ORE7-잔디 형질전환체의 표현형을 분석하기 위해 Fig. 74와 같이 형질전환체를 순화시킨 후, 그들의 녹기연장과 스트레스 저항성에 대한 표현형적 분석을 수행하였다.

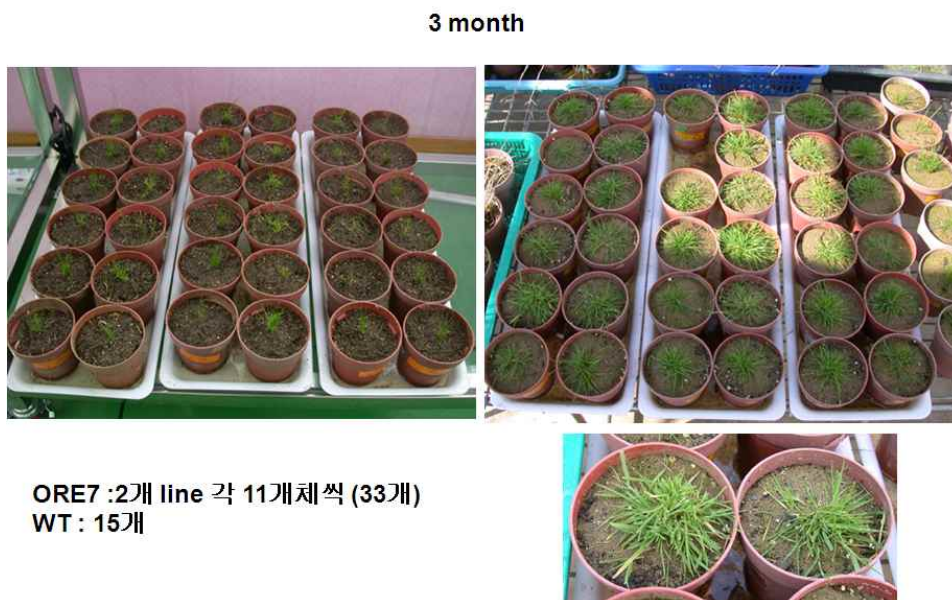


Fig. 74. *ORE7*-잔디 형질전환체(creeping bentgrass)의 순화 과정

ORE7-잔디 형질전환체의 잎 노화 표현형을 Dark Assay 방법을 이용하여 분석하였다. Dark 처리는 잎의 노화를 인위적으로 유도하는 가장 일반적인 방법으로서 본 연구에서는 순화된 형질전환 잔디로부터 비슷한 연령의 잎을 절단한 후 dark 상태에서 노화가 진행되는 관찰하였다. Fig. 75에서 보는 바와 같이 야생형 잔디의 경우, dark 처리 4일 후에 노화가 시작되어 14일 후에는 완전히 갈변되었으나, *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 잔디는 14일 후에도 녹기를 유지하고 있음이 확인되었다. 또한 노화 진행 정도를 정량적으로 분석하는데 이용되는 PhotosystemII의 광합성 효율을 측정한 결과 표현형적 특징과 마찬가지로 형질전환 잔디에서 노화가 상당히 지연됨을 재확인 할 수 있었다.

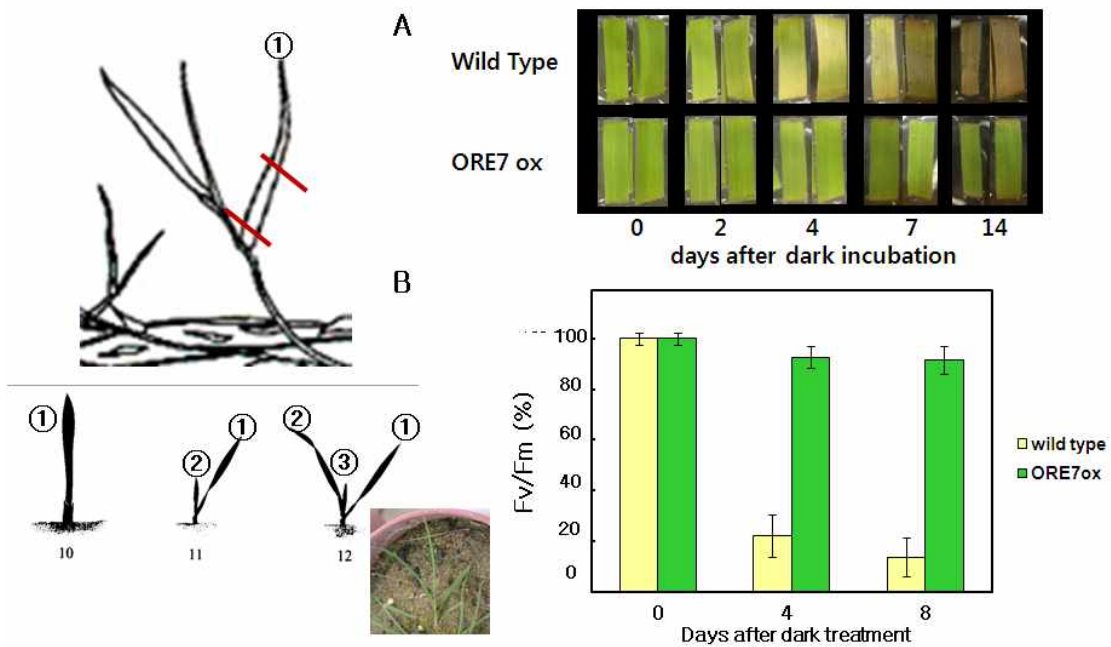


Fig. 75. *ORE7* 형질전환체의 dark 처리에 의해 유도된 노화 표현형. A. 가시적 노화 표현형 B. 광합성효율 분석결과

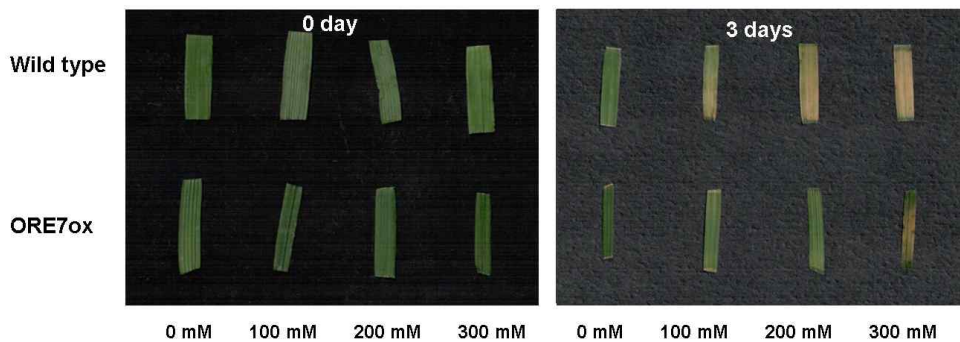


Fig. 76. *ORE7* 형질전환체의 3일 동안 다양한 NaCl 농도 처리에 의해 유도된 표현형적 특징

한편, 녹기 연장에 대한 표현형적 특징을 가지는 ORE7-잔디 형질전환체가 또한 염 스트레스에 대해서도 저항성을 가지는지를 확인하기 위하여 본 연구팀은 detach한 잔디 잎을 0-300 mM NaCl 용액에 3일 동안 incubation하여 그들의 표현형적 특징을 분석하였다. 그 결과 ORE7-잔디 형질전환체는 야생형에 비하여 염 스트레스에 의한 황화 현상이 지연되었으며(Fig. 76), 이러한 사실은 ORE7-잔디 형질전환체가 염 스트레스에 대하여 저항성을 가짐을 의미한다.

5. AtGA2ox4-, ATHG1-, 그리고 GSDL2-잔디 형질전환체 생산

기 확립된 고효율 잔디 형질전환 기법을 통하여 *AtGA2ox4*, *ATHG1*, 그리고 *GSDL2* 유전자를 들잔디로 형질전환하여 선별배지에서 선별 작업을 통하여 잠정 형질전환체를 확보하고 있는 상태이다(Figs. 77-79). 이러한 잠정 형질전환체는 유전자 도입 및 발현 분석을 수행하고 있으며, 일차 기능 분석이 완료되면 표현형적 분석 등 이차 형질전환체 기능 분석을 수행할 예정이다.

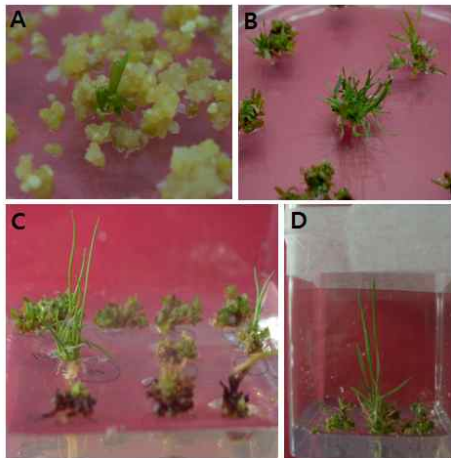


Fig. 77. *AtGA2ox4* 유전자를 포함하는 아그로박테리움을 들잔디 캘러스에 감염시킨 후 선발배지에서 형성된 형질전환체

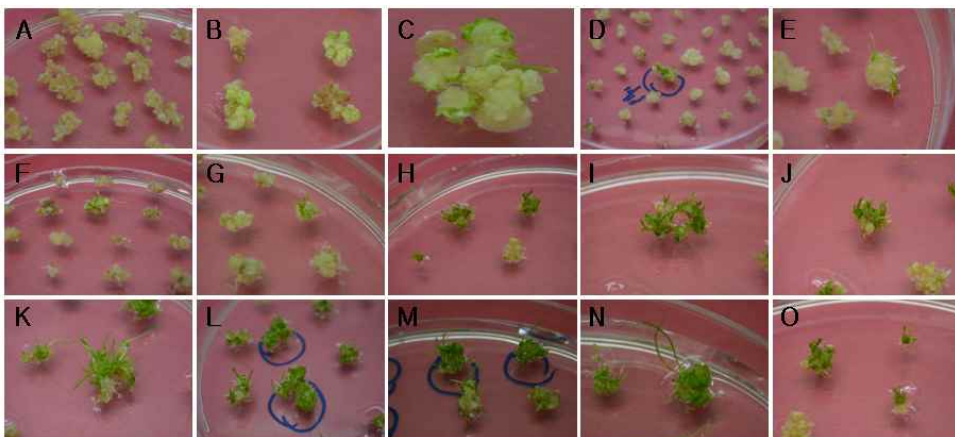


Fig. 78. *ATHG1* 유전자를 포함하는 아그로박테리움을 들잔디 캘러스에 감염시킨 후 선발배지에서 형성된 슈트.

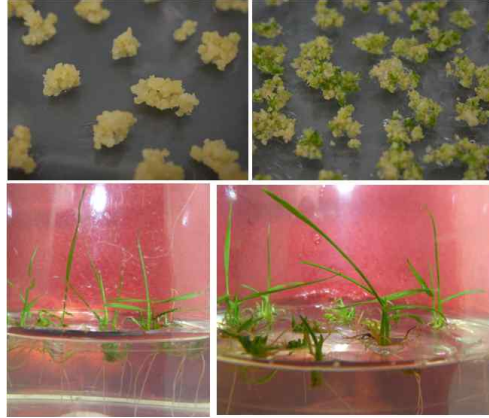


Fig. 79. *GSDL2* 유전자를 포함하는 아그로박테리움을 들잔디 캘러스에 감염시킨 후 선발배지에서 형성된 슈트

6. 방사선 동위원소 조사를 통한 GMO 안정성 변이체 개발 (부록 5 참조)

잔디의 경우 지표식물로 재배되기 때문에 형질전환된 잔디에 돌연변이 처리를 하여 꽃가루가 비산되지 않는 식물을 개발할 경우 상품화에 매우 유리하다. 이러한 화분 비산에 따른 유전자 이동 가능성 문제를 해결하기 위하여 제초제 저항성 형질전환 잔디를 대상으로 수분, 수정시기에 감마선(^{60}Co)을 조사하여 비추대형 돌연변이체를 분리하는데 성공하였으며, 본 연구 결과를 SCI급의 논문인 *Breeding Science*에 2009년 발표하였다(Fig. 80). 이와 같은 방사선 동위원소를 통한 돌연변이체 개발은 이후 개발되는 형질전환체의 우량화에 많은 도움을 주리라 판단된다.



Fig. 80. 감마선 조사에 의해 생산된 비추대 돌연변이 표현형. A, 야생형 들잔디. B. 비추대 제초제 저항성 형질 전환 들잔디 돌연변이체

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 목표 달성도

구분	세부연구목표	연구 개발 수행 내용	달성도(%)
1차 년도	잔디 품종 개량 유용 유전자 발굴 · 기확보 유전자의 기능 재검정 (3건) · 유용 유전자 발굴 (1종) · ORE7 형질전환용 벡터 construct 제작	· AtSIZ, ORE7, TPR 기능 재검정 (3건) · 유용 유전자 AtGA2ox4 발굴 (1종) · ORE7에 대한 2종의 형질전환용 벡터 construct 제작	100
	우량 형질전환 잔디의 개발 · TPR domain 및 AtSIZ: 형질전환/형질전환체 확보 (2종) · ORE7 형질전환 (1종)	· TPR domain 및 AtSIZ: 형질전환/형질전환체 선별 및 확보 (2종) · ORE7 형질전환 (2종의 벡터 사용)	100
	형질전환 잔디의 기능 연구 · 형질전환 잔디의 순화, 유전자 도입 및 발현 분석 · 잔디 기능 분석 기초 연구	· TPR domain/ AtSIZ 형질전환체 순화, 유전자 도입/발현 분석 및 표현형적 분석 · 잔디 기능 분석 기초 연구	100
	지적소유권 확보(국내 논문 게재, 1건)	· 국내 특허 출원 (1건) · 국제 전문학술지 논문 게재 (1건)	200
2차 년도	잔디 품종 개량 유용 유전자 발굴 · 유용 유전자 발굴 (2종) · 신규(I) 유전자 형질전환용 벡터 construct 제작	· ATHG1, GSDL2 유전자 발굴 (2종) · AtGA2ox4에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작	100
	우량 형질전환 잔디의 개발 · ORE7 형질전환체 확보 · 신규(I) 유전자 형질전환 · 기 확보된 잔디 형질전환체 후대 검정 실시 (2종)	· ORE7 형질전환체 확보 · AtGA2ox4 유전자 형질전환 · TPR/AtSIZ 형질전환체 도입유전자 안정성 확인 · 들잔디/몽고잔디, creeping bentgrass 형질전환 효율 개선/형질전환 연구	100
	형질전환 잔디의 기능 연구 · TPR/AtSIZ 형질전환 잔디의 1차 표현형 분석 · ORE7 형질전환 잔디의 순화, 유전자 도입 및 발현 분석	· TPR/AtSIZ 형질전환 잔디의 유전자 발현 분석 및 2차 표현형 분석 · ORE7 형질전환 잔디의 순화 완료, 유전자 도입 및 발현 분석 실시 예정 · 방사선 동위원소 조사를 통한 GMO 안정성 변이체 개발 및 잔디의 노화 분자마커 개발	100
	지적소유권 확보 · 국내 특허 출원 (1건) · 국외 논문 게재 (1건)	· 국제(PCT) 특허 출원 (1건) · 국외 논문 게재 (1건)	100

구분	세부연구목표	연구 개발 수행 내용	달성도(%)
최종 평가 (3차 년도)	잔디 품종 개량 유용 유전자 발굴 · 기확보 유전자의 기능 재검정 (3건) · 유용 유전자의 발굴 (3건) · ORE7, 신규 유전자 3종 형질전환용 벡터 construct 제작	· AtSIZ, ORE7, TPR 기능 재검정 (3건) · AtGA2ox4, ATHG1, GSDL2, ARF2 발굴 (4건) · ORE7, AtGA2ox4, ATHG1, GSDL2에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작	120
	우량 형질전환 잔디의 개발 · 유용 유전자 형질전환 (6종) · 잔디 형질전환체 확보 (4종) · 형질전환체의 후대 검정 실시 (3종)	· AtSIZ, ORE7, TPR, AtGA2ox4, ATHG1, GSDL2 형질전환 (6종) · AtSIZ, ORE7, TPR, AtGA2ox4 잔디 형질전환체 확보 (4종) · AtSIZ, ORE7, TPR 형질전환체 및 방사선 조사 잔디 품종의 후대 검정 실시 (4종)	100
	형질전환 잔디의 기능 연구 · 형질전환체의 유전자 발현 분석 (4종) · 형질전환체의 생리학적 기능 분석 (3종) · GMO 안정성 확보를 위한 돌연변이 유도	· AtSIZ, ORE7, TPR, AtGA2ox4 형질전환체의 유전자 발현 분석 (4종) · AtSIZ, ORE7, TPR 형질전환체의 생리학적 기능 분석 (3종) · 방사선 조사 GMO 안정성 잔디 품종 개발	100
	지적소유권 확보 · 국내 특허 출원 (3건) · 논문 게재: 국외 (2건), 국내 (1건)	· 국내 및 PCT 특허 출원 (4건) · 논문 게재: 국외 학술지 (3건)	110

제 2 절. 관련분야에의 기여도

1. 활용방안

Advanced RAM approach, promoter trap approach 등의 다양한 기능성 유전체 연구를 통하여 발굴된 노화, 스트레스 저항성 및 왜화 조절 관련 유용 유전자에 대한 지적소유권 확보는 기술사업화의 초석으로 기술이전 등을 통하여 경제적 이익을 제공할 것이다. 이때 지적소유권의 기술사업화에 있어서 고부가 가치 창출을 위하여 관련 전공자(식물 생리·생화학자 등)와의 공동연구를 적극 추진할 것이다.

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

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

본 과제를 통하여 개발된 혹은 개발 중인 형질전환체는 후대 검정을 통하여 표현형적 특성 유지를 확인하고, 이후 환경 안정성 평가를 통하여 신품종 개발에 집중할 예정이다.

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

2. 기대성과

[기술적 측면]

본 연구는 다양한 유전체 기능연구를 적용함으로써 녹기 연장, 스트레스 저항성 및 왜화 조절

관련 유용 기능성 유전자의 대량 발굴 및 이를 활용한 고부가 잔디 신제품 개발을 이룰 수 있으리라 확신하며, 이러한 연구를 통하여 확보된 녹기연장, 스트레스 저항성, 및 왜성 조절 관련 유용 유전자에 대한 지적 소유권 확보는 향후 국가 생명공학 산업화의 경쟁력을 가지는데 일조를 할 것이다.

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

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

[경제·산업적 측면]

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

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 연구개발 성과

1. 연구성과 목표 및 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표								1	
	달성	1						1		
2차년도	목표	1						1		
	달성	1						1		
3차년도	목표	2						1		
	달성	2						1		
계	목표	3						2	1	
	달성	4						3		

2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구 분
		주저자	교신저자	공동저자				
2007년 12월	Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plant	임평옥	남홍길	김유미 등	Plant Journal	52(6)	국외	SCI
2009년 3월	Production of unbolting lines through gamma-ray irradiation mutagenesis in genetically modified herbicide-tolerant <i>Zoysia japonica</i>	배태웅	이효연	김준기 등	Breeding Science	59	국외	SCI
2010년 3월	Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity	임평옥	남홍길	이인철 등	J of Experimental Botany	61(5)	국외	SCI

3. 특허출원/등록 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2007년 11월	식물~ ¹⁾	제노마인(주)	대한민국	10-2007-0115458					
2008년 11월	Poly~ ²⁾	제노마인(주)	PCT	KR2008/006679					
2010년 2월	식물의~ ³⁾	제노마인(주)	대한민국	10-2010-0011652					
2010년 2월	ATHG1~ ⁴⁾	제노마인(주)	PCT	KR2010/000767					

¹⁾식물 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도

²⁾Polypeptide inducing dwarfism of plants, polynucleotide coding the polypeptide, and those use

³⁾식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

⁴⁾ATHG1 Protein Delaying Senescence and Providing Stress Tolerance of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use

4. 인력활용/양성 성과

가. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
7	1	4	1	1		7			7

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

Advanced RAM approach, promoter trap approach 등의 다양한 기능성 유전체 연구를 통하여 발굴된 노화, 스트레스 저항성 및 왜화 조절 관련 유용 유전자에 대한 지적소유권 확보는 기술사업화의 초석으로 기술이전 등을 통하여 경제적 이익을 제공할 것이다. 이때 지적소유권의 기술사업화에 있어서 고부가 가치 창출을 위하여 관련 전공자(식물 생리·생화학자 등)와의 공동연구를 적극 추진할 것이다.

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

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

본 과제를 통하여 개발된 혹은 개발 중인 형질전환체는 후대 검정을 통하여 표현형적 특성 유지를 확인하고, 이후 환경 안정성 평가를 통하여 신품종 개발에 집중할 예정이다.

3. 연구성과 산업화 계획

우리나라 잔디 생산 산업은 많은 부분을 잔디 수입에 의존하고 있으며 이러한 경제적 불균형은 국가 경제에 막대한 타격을 주고 있다. 일례로 연도별 한지형 잔디 수입 총량을 보면 1995년 약 80만 불에서 2004년 350만 불로 기하급수적인 증가세를 보이는 것을 알 수 있다. 이러한 잔디 품종의 수입은 잔디 품종의 해외 의존성이 높아 해외 상황에 따라 국내 잔디 생산이 좌우되는 문제를 초래할 뿐만 아니라 시장 자체도 흔들릴 수 있는 문제를 가지고 있다. 최근 국내에서 ‘일동중지’, ‘용천’, ‘밀록’ 등과 같은 잔디 신품종 개발에 박차를 가하고 있으나, 여전히 특정 형질을 요구하는 현대의 다양한 소비자 요구를 완전히 충족시키지 못하는 실정이다. 이와 같은 잔디 품종 생산의 해외 의존성을 줄이기 위해서는 자급자족 기반 구축이 필수적이다. 그리고 국내 농산물의 과잉 생산으로 시장 가격 안정에 어려움을 겪고 있는 만큼 농산물의 시장 질서를 교란하지 않는 작물의 발굴은 매우 중요한 사안이며, 이를 해결해 작물로 잔디의 도입은 매우 훌륭한 해결책이 될 것이다.

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

기술 개발된 우수 잔디 계통에 있어서 왜성, 녹기 연장 잔디 품종 개발은 골프장 등에 주로 적용 가능하며, 환경 스트레스 저항성 잔디 품종 개발은 불리한 환경 조건, 특히 염분이 많이 축적된 바닷가 토양 및 전체적인 온도가 낮은 고지대에 적용 가능하여 그 용도는 매우 높으리라 생각된다. 이러한 잔디 품종의 산업화는 기본적으로 국내 기관 혹은 종자회사와 공동연구를 통하여 품종 개발을 수행하고 이를 통한 수익을 창출하고자하며, 지적소유권에 대한 기술이전은 잔디 품종 개발에 집중하고 있는 종자 회사가 주를 이룰 것이며 시장에 있어서 국내가 우선이며 이후 미국, 유럽 쪽이 그 대상이 될 것이다. 대상 업체는 Monsanto, Jacklin 종자 회사, Scotts 회사 등 미국과 유럽에 위치하고 있는 여러 major 회사가 예상된다. 주관기관인 제노마인(주)는 국외 major 종자회사인 BASF와 기술이전 계약을 실시한 바 있어(2009년 12월), 유용 유전자의 기술이전에 대해 많은 장점을 가지고 있다. 이러한 국외 마케팅의 대부분은 영양 생식 잔디의 수출이 용이하지 않은 관계로 종자 생산을 목적으로 할 것이나, 이 경우 장기 프로젝트로 추진해야 할 것이다. 그리고 국내에서는 단기 프로젝트가 가능한 영양 생식 잔디 품종 개발에 집중할 것이며, 특히 삼성, 현대, LG 및 코오롱 등의 다수의 골프장을 보유하고 있는 대기업이 주 마케팅 대상이 될 것이다. 국내 마케팅의 영역은 공동 연구를 통한 품종 개발, 그리고 이를 통한 공동 사업화 등의 형태가 주가 될 것이다.

제 6 장 참고문헌

- Allemeersch, J, Durinck, S, Vanderhaeghen, R et al.** (2005) Benchmarking the CATMA microarray. A novel tool for *Arabidopsis* transcriptome analysis. *Plant Physiol.* **137**, 588-601.
- Aoyama, T and Chua, NH** (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* **11**, 605-612.
- Aravind, L and Landsman, D** (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4413-4421.
- Bae, CH, T Abe, N Nagata, N Nobuhisa, T Matsuyama, T Nakano and S Yoshida** (2000) Characterization of a periclinal chimera variegated tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Sci.* **151**, 93-101.
- Bae, TW, E Vanjildorj, SY Song, S Nishiguchi, SS Yang, IJ Song, T Chandrasekhar, TW Kang, JI Kim, YJ Koh et al.** (2008) Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide tolerant *Zoysia japonica*. *J. Environ. Qual.* **37**, 207-218.
- Berger, F and Gaudin, V** (2003) Chromatin dynamics and *Arabidopsis* development. *Chromosome Res.* **11**, 277-304.
- Bleecker, AB and Patterson, SE** (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **9**, 1169-1179.
- Boisnard-Lorig, C, Colon-Camona, A, Bauch, M, Hodge, S, Doerner, P, Bancharel, E, Dumas, C, Haseloff, J and Berger, F** (2001) Dynamic analyses of the expression of the Histone::YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell*, **13**, 495-509.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, et al** (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **42**, 567-85.
- Buchanan-Wollaston, V, Earl, S, Harrison, E, Mathas, E, Navabpour, S, Page, T and Pink, D** (2003) The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnol. J.* **1**, 3-22.
- Campisi, J** (2000) Aging, chromatin, and food restriction - connecting the dots. *Science*, **289**, 2062-2063.
- Cary AJ, Liu W, Howell SH** (1995) Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology* **107**, 1075-082.
- Clough, SJ and Bent, AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Ellis CM, Nagpal P, Young JC, Hagen G, Guilfoyle TJ, Reed JW** (2005) AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4563-574.
- Fujimoto, S, Matsunaga, S, Yonemura, M, Uchiyama, S, Azuma, T and Fukui, K** (2004) Identification of a novel plant MAR DNA binding protein localized on chromosomal surfaces. *Plant Mol. Biol.* **56**, 225-239.
- Gan, S and Amasino, RM** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.
- Gepstein S, Sabeji G, Carp MJ, Hajouj T, Neshar MF, Yariv I, Dor C, Bassani M** (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *The Plant Journal* **36**, 629-42.
- Grbic V, Bleecker AB** (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **8**, 595-02.

- 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.
- Guilfoyle TJ, Hagen G** (2007). Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 453-60.
- Guo, Y and Gan, S** (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J.* **46**, 601-612.
- Ha CM, Kim GT, Kim BC, Jun JH, Soh MS, Ueno Y, Machida Y, Tsukaya H, Nam HG** (2003) The BLADE-ON-PETIOLE 1 gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in *Arabidopsis*. *Development* **130**, 161-72.
- Haithcock, E, Dayani, Y, Neufeld, E, Zahand, AJ, Feinstein, N, Mattout, A, Gruenbaum, Y and Liu, J** (2005) Age-related changes of nuclear architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 16690-16695.
- Hajouj T, Michelis R, Gepstein S** (2000) Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiology* **124**, 1305-314.
- He Y, Tang W, Swain JD, Green AL, Jack TP, Gan S** (2001). Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology* **126**, 707-16.
- He, Y and Gan, S** (2002) A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 805-815.
- He, Y, Tang, W, Swain, JD, Green, AL, Jack, TP and Gan, S** (2001) Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiol.* **126**, 707-716.
- Hensel L, Grbic V, Baumgarten DA, Bleecker AB** (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **5**, 553-64.
- Ho, MW, J Cummins and J Bartlett** (2001) Killing fields near you. Terminator crops at large. ISIS News 7/8, February 2001. (<http://www.i-sis.org.uk/isisnews/i-sisnews7-16.php>).
- Jing, H-C, Sturre, MJG, Hille, J and Dijkwel, PP** (2002) *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *Plant J.* **32**, 51-63.
- 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.
- Khan, MS** (2005) Plant biology engineered male sterility. *Nature* **436**: 783-785.
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I** (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 814-19.
- Kim J, Kim Y, Yeom M, Kim JH, Nam HG** (2008) FIONA1 is essential for regulating period length in the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell* **20**, 307-19.
- Kim JH, Woo HR, Kim J, Lim PO, Lee IC, Choi SH, Hwang D, Nam HG** (2009) Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis*. *Science* **323**, 1053-057.
- Kim, HJ, Ryu, H, Hong, SH, Woo, HR, Lim, PO, Lee, IC, Sheen, J, Nam, HG and Hwang, I** (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 814-819.
- Li, G, Hall, TC and Holmes-Davis, R** (2002) Plant chromatin: development and gene control. *Bioessays*, **24**, 234-243.
- Lichtenthaler, HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods*

Enzymol. **18**, 350-382.

- Lim PO, Kim HJ, Nam HG** (2007a) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115-36.
- Lim PO, Kim Y, Breeze E, et al.** (2007b) 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**, 1140-153.
- Lim, PO and Nam, HG** (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Curr. Top. Dev. Biol.* **67**, 49-83.
- Lim, PO, Woo, HR and Nam, HG** (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **8**, 272-278.
- Lin JF and Wu SH** (2004) Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* **39**, 612-28.
- Lin, S-J, Defossez, P-A and Guarente, L** (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **289**, 2126-2128.
- Liscum E, Reed JW** (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology* **49**, 387-00.
- Manavathi, B, Nair, SS, Wang, RA, Kumar, R and Vadlamudi, RK** (2005) Proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein-1 is essential in growth factor regulation of signal transducers and activators of transcription 3 activation. *Cancer Res.* **65**, 5571-5577.
- 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.
- Miao Y, Smykowski A, Zentgraf U** (2008) A novel upstream regulator of WRKY53 transcription during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **10**, (Supplement 1)110-20.
- Miao, Y, Laun, T, Zimmermann, P and Zentgraf, U** (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **55**, 853-867.
- Morisawa, G, Han-Yama, A, Moda, I, Tamai, A, Iwabuchi, M and Meshi, T** (2000) AHM1, a novel type of nuclear matrix-localized, MAR binding protein with a single AT hook and a J domain homologous region. *Plant Cell*, **12**, 1903-1916.
- Morris, KAH, Mackerness, S, Page, T, John, CF, Murphy, AM, Carr, JP and Buchanan-Wollaston, V** (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* **23**, 677-685.
- Nagano, Y, Hirofumi, F, Takehito, I and Yukiko, S** (2001) A novel class of plant-specific zinc-dependent DNA-binding protein that binds to A/T-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4097-4105.
- Nagpal P, Ellis CM, Weber H, et al** (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**, 4107-118.
- Naito, K, M Kusaba, N Shikazono, T Takano, A Tanaka, T Tanisaka and M Nishimura** (2005) Transmissible and nontransmissible mutations induced by irradiating *Arabidopsis thaliana* pollen with γ -rays and carbon ions. *Genetics* **169**: 881-89.
- Nam, HG** (1997) Molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 200-207.
- Noh YS, Amasino R** (1999). Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology* **41**, 181-94.
- Noode'n, LD** (1988) The phenomenon of senescence and aging. In *Senescence and Aging in Plants* (Noode'n, LD and Leopold, AC, eds). San Diego, CA: Academic Press, pp. 2-50.
- 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.

- Okushima Y, Mitina I, Quach HL, Theologis A** (2000) AUXIN RESPONSE FACTOR2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *The Plant Journal* **43**, 29-6.
- Quirino, BF, Noh, YS, Himmelblau, E and Amasino, RM** (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* **5**, 278-282.
- Quirino, BF, Normanly, J and Amasino, RM** (1999) Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol. Biol.* **40**, 267-278.
- Reichman, JR, LS Watrud, EH Lee, CA Bollman, MJ Storm, GA King and CM Smith** (2006) Establishment of transgenic herbicide-resistant creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) in nonagronomic habitats. *Mol. Ecol.* **15**: 4243-255.
- Reilly, K, Gomez-Vasquez, R, Buschmann, H, Tohme, J and Beeching, JR** (2004) Oxidative stress responses during cassava postharvest physiological deterioration. *Plant Mol. Biol.* **56**, 625-641.
- Ruiz, ON and H Daniell** (2005) Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome by expression of beta-ketothiolase. *Plant Physiol.* **138**: 1232-246.
- Schomburg, FM, Bizzell, CM, Lee, DJ, Zeevaart, JAD, and Amasino, RM** (2003). Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* **15**, 151-63.
- Schruff MC, Spielman M, Tiwari S, Adams S, Fenby N, Scott RJ** (2006) The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* **133**, 251-61.
- 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.
- Smart, CM** (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* **126**, 419-448.
- Street IH, Shah PK, Smith AM, Avery N, Neff MM** (2008) The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Plant J* **54**, 1-4.
- Strick, R and Laemmli, UK** (1995) SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell*, **83**, 1137-1148.
- Thanos, D and Maniatis, T** (1992) The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell*, **71**, 777-789.
- Thimm, O, Bla" sing, O, Gibon, Y, Nagel, A, Meyer, S, Kru"ger, P, Selbig, J, Mu"ller, LA, Rhee, SY and Stitt, M** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets on diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* **37**, 914-939.
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T** (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *The Plant Cell* **15**, 533-43.
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ** (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *The Plant Cell* **16**, 533-43.
- Toyama, K, CH Bae, JG Kang, YP Lim, T Adachi, KZ Riu, PS Song and HY Lee** (2003) Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by Agrobacterium-mediated transformation. *Mol. Cells.* **16**, 19-7.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**, 5844-849.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes

- containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* **9**, 1963-971.
- van der Graaff, E, Schwacke, R, Schneider, A, Desimone, M, Flugge, UI and Kunze, R** (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol.* **141**, 776-792.
- Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL** (2008) Integration of auxin and brassinosteroid pathway by auxin response factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**, 9829-834.
- Watrud, LS, EH Lee, A Fairbrother, C Burdick, JR Reichman, M Bollman, M Storm, G King and KV Water** (2004) Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with CP4 EPSPS as a marker. *PNAS* **101**, 14533-4538.
- Weaver, LM, Gan, S, Quirino, B and Amasino, RM** (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* **37**, 455-469.
- Weigel, D, Ahn, JH, Blazquez, MA et al.** (2000) Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**, 1003-1013.
- Wilmoth JC, Wang S, Tiwari SB, Joshi AD, Hagen G, Guilfoyle TJ, Alonso JM, Ecker JR, Reed JW** (2005) NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *The Plant Journal* **43**, 118-30.
- Woo HR, Kim JH, Nam HG, Lim PO** (2004) The delayed leaf senescence mutants of *Arabidopsis*, ore1, ore3, and ore9 are tolerant to oxidative stress. *Plant and Cell Physiology* **45**, 923-32.
- Woo, HR, Chung, KM, Park, JH, Oh, SA, Ahn, T, Hong, SH, Jang, SK and Nam, HG** (2001) ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**, 1779--1790.
- Woo, HR, Goh, CH, Park, JH, Teysseidier, B, Kim, JH, Park, YI and Nam, HG** (2002) Extended leaf longevity in the ore4-1 mutant of *Arabidopsis* with a reduced expression of a plastid ribosomal protein gene. *Plant J.* **31**, 331-340.
- Wu, JL, C Wu, C Lei, M Baraoidan, A Bordoos, MR Madamba, M Ramos-Pamplona, R Mauleon, A Portugal, VJ Ulat et al.** (2005) Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Mol. Bio.* **59**, 85-7.
- Xiong, Y, Contento, AL and Bassham, DC** (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **42**, 535-546.
- Yang, C, BJ Mulligan and ZA Wilson** (2004) Molecular genetic analysis of pollen irradiation mutagenesis in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **164**, 279-88.
- Yoshida, K, Nagano, Y, Murai, N and Sasaki, Y** (1993) Phytochrome-regulated expression of the genes encoding the small GTP-binding proteins in peas. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 6636-6640.
- Yoshida, S, Ito, M, Callis, J, Nishida, I and Watanabe, A** (2002) A delayed leaf senescence mutant is defective in arginyl tRNA:protein arginyltransferase, a component of the N-end rule pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**, 12-137.
- Zheng, G and Yang, YC** (2004) ZNF76, a novel transcriptional repressor targeting TATA-binding protein, is modulated by sumoylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 42410-42421.
- Zhou C, Cai Z, Guo Y, Gan S** (2009) An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiology* **150**, 167-77.

Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants

Pyung Ok Lim¹, Yumi Kim², Emily Breeze³, Ja Choon Koo^{2,4,1}, Hye Ryun Woo^{2,1}, Jong Sang Ryu⁴, Don Ha Park², Jim Beynon³, Alex Tabrett³, Vicky Buchanan-Wollaston³ and Hong Gil Nam^{2,4,5,*}

¹Department of Science Education, Cheju National University, Jeju, Korea,

²Division of Molecular and Life Sciences, POSTECH, Pohang, Kyungbuk, Korea,

³Warwick HRI, University of Warwick, Wellesbourne, Warwick CV35 9EF, UK,

⁴National Core Research Center for Systems Bio-Dynamics, POSTECH, Pohang, Kyungbuk, Korea, and

⁵The I-BIO Graduate School, POSTECH, Pohang, Kyungbuk, Korea

Received 18 May 2007; revised 2 August 2007; accepted 22 August 2007.

*For correspondence (fax +82 542 79 5972; e-mail nam@briic.postech.ac.kr).

¹Present address: Division of Science Education, Chonbuk National University, Jeonju-city, Jeonbuk, Korea.

²Present address: Department of Biology, Washington University, St. Louis, MO 63130, USA.

Summary

Leaf senescence is the final stage of leaf development and is finely regulated via a complex genetic regulatory network incorporating both developmental and environmental factors. In an effort to identify negative regulators of leaf senescence, we screened activation-tagged *Arabidopsis* lines for mutants that exhibit a delayed leaf senescence phenotype. One of the mutants (*ore7-1D*) showed a highly significant delay of leaf senescence in the heterozygous state, leading to at least a twofold increase in leaf longevity. The activated gene (*ORE7/ESC*) encoded a protein with an AT-hook DNA-binding motif; such proteins are known to co-regulate transcription of genes through modification of chromatin architecture. We showed that *ORE7/ESC*, in addition to binding to a plant AT-rich DNA fragment, could also modify the chromatin architecture, as illustrated by an altered distribution of a histone-GFP fusion protein in the nucleus of the mutant. Globally altered gene expression, shown by microarray analysis, also indicated that activation of *ORE7/ESC* results in a younger condition in the mutant leaves. We propose that ectopically expressed *ORE7/ESC* is negatively regulating leaf senescence and suggest that the resulting chromatin alteration may have a role in controlling leaf longevity. Interestingly, activation of *ORE7/ESC* also led to a highly extended post-harvest storage life.

Keywords: leaf senescence, post-harvest storage, AT-hook protein, chromatin architecture, activation tagging, *Arabidopsis*.

Introduction

Leaf senescence is a developmentally programmed process that involves largely catabolic activities leading to the degeneration of the leaf. It is a highly regulated process that requires sequential and orchestrated changes in cellular physiology, biochemistry, and gene expression (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Lim and Nam, 2005; Quirino *et al.*, 2000). One of the distinctive changes that occurs during senescence is a rapid decline in photosynthetic activity. Other metabolic changes include hydrolysis of macromolecules that were accumulated during the growth phase followed by remobilization to the growing parts of plants, such as young leaves and reproductive organs. Therefore, leaf

senescence is a critical phase in the plant life cycle that contributes to the fitness of plants by relocating and recycling nutrients (Bleecker and Patterson, 1997; Nam, 1997; Noodén, 1988).

Although leaf senescence occurs in an age-dependent manner, it can also be initiated or regulated by several other internal and external factors (He and Gan, 2002; Lim *et al.*, 2003). Internal factors that affect senescence include developmental changes such as the formation of reproductive organs and changes in levels of plant growth regulators such as cytokinin, abscisic acid, ethylene, jasmonic acid, and salicylic acid (He *et al.*, 2001; Jing *et al.*, 2002; Morris *et al.*,

2000). External factors include temperature, nutrients, water, pathogen attack, drought, and detachment from the plant (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Quirino *et al.*, 1999; Smart, 1994; Weaver *et al.*, 1998). It has been suggested that all these various factors act in concert in a complex mechanism to finely adjust the life span of a leaf (Lim *et al.*, 2003).

Leaf senescence can be detrimental to yield and quality in agricultural crops and also contributes to post-harvest losses in vegetable and forage crops (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Thus, increased understanding of the mechanisms controlling plant senescence should have great potential for agricultural improvement. Despite this, a genetic strategy to manipulate leaf senescence has been limited, in contrast to the case of fruit ripening where the benefits of controlling post-harvest characters have been well demonstrated. In order to control the timing and progression of senescence, the key regulatory molecules and pathways must be identified. Therefore, we have carried out a series of mutant screens to pinpoint genes that control leaf senescence in the model plant *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 1997; Woo *et al.*, 2001, 2002).

Our initial screen for delayed leaf senescence mutants was focused on loss-of-function mutant pools in order to identify a positive regulator of senescence. However, redundancy between pathways means that loss of a regulatory element in one pathway might not significantly alter the senescence program, thus limiting the scope of this type of screening. We also expected that there might be cases in which senescence is controlled by negative regulators. In order to identify negative regulators of leaf senescence and to overcome the limitations associated with the loss-of-function mutant pool, we screened for delayed leaf senescence mutants in newly generated activation tagged pools of *Arabidopsis*. An advantage of this approach is that an activated gene usually behaves as a dominant, gain-of-function mutation, displaying the mutant phenotypes in the T₁ generation.

In this paper we describe one delayed senescence mutant, *ore7-1D*, that was isolated from an activation tagging pool. This mutant exhibits markedly extended leaf longevity, due to increased expression of the *ORE7* gene that encodes an AT-hook motif protein. In animals and yeast, many AT-hook motif proteins have been shown to have key roles in growth and development and act by modifying the chromosomal architecture to co-regulate transcription of a set of genes. We found that the *ORE7* gene is identical to *ESCAROLA* (*ESC*) (Weigel *et al.*, 2000), a gene that has been previously described but not functionally analyzed *in planta*. Through the analysis of the *ore7-1D* mutant, we suggest that regulation of chromatin structure might be important for the proper progression of leaf senescence. We also demonstrate that regulated expression of *ORE7/ESC* could be used to manipulate the post-harvest storage life of plants.

Results

Isolation of the *ore7* mutant

Approximately 20,000 activation tagged lines of *Arabidopsis* (Col-0) were generated in our laboratory using the pSKI105 vector (Weigel *et al.*, 2000). Upon insertion into the plant genome, this vector allows activation of genes in its vicinity due to the presence of a strong enhancer element (4× 35S CaMV) in the vector. The generated pool was screened for delayed leaf senescence mutants by visually evaluating the degree of leaf yellowing at the T₁ generation. This strategy enabled the identification of negative genetic regulators of leaf senescence, which exhibited delayed leaf senescence when overexpressed. Among the screened activation lines, the line named *oresara7-1D* (*ore7-1D*) exhibited the most noticeable delay of leaf senescence (Figure 1a). Segregation in the T₂ generation indicated that the *ore7* phenotype is due to a semi-dominant mutation caused by activation of a gene in the activation line (data not shown). In homozygous plants the whole developmental process, including leaf emergence and growth, was delayed, this causing difficulties in assessing the effect of the mutation on senescence in individual leaves (Hensel *et al.*, 1993; Woo *et al.*, 2001). However, in the heterozygous plants, where the expression of the activated gene is lower than that in the homozygous plants, the emergence time and growth rate of leaves was almost identical to those of the wild type. Therefore, the experiments described below were carried out using the heterozygous mutant. In addition to the delayed leaf senescence phenotype, the heterozygous *ORE7/ore7-1D* mutant showed slightly shorter petioles, round and enlarged leaves, an increased number of inflorescences, a late flowering phenotype and increased biomass (Figure 1a).

Extended leaf longevity in the *ORE7/ore7-1D* mutant

Visual examination of a single leaf throughout its life span revealed that in the *ORE7/ore7-1D* mutant leaf longevity was extended over twofold, which is one of the most significant extensions of leaf life span that has been reported in *Arabidopsis* (Figure 1b). Similarly the leaf chlorophyll content and the photochemical efficiency of photosystem II (PSII) (F_v/F_m) (Figure 1c,d), which are two physiological senescence markers, were both maintained at higher levels in the *ORE7/ore7-1D* mutant compared with the wild type. Moreover, in the mutant, a photosynthesis-related chlorophyll *a/b*-binding protein gene (*CAB*) was expressed at higher levels at later stages, while the induction of two senescence-associated genes, *SEN4* and *SAG12*, was delayed (Figure 1e). The results together indicated that the *ORE7/ore7-1D* mutation results in a considerable delay of several parameters of leaf senescence and an extension of leaf longevity.

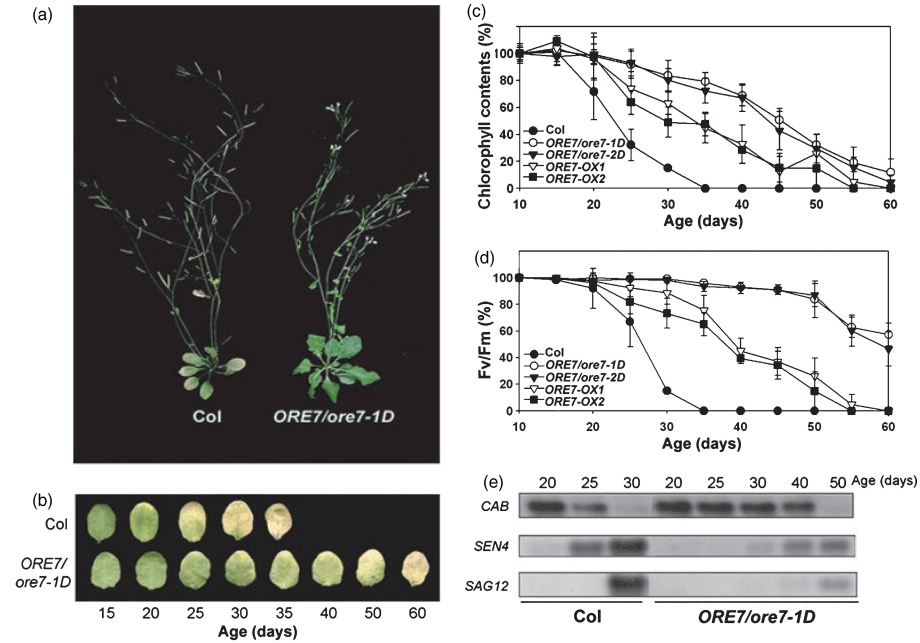


Figure 1. The age-dependent senescence phenotype.

(a) Phenotypes of wild type (Col) and the heterozygous *ORE7/ore7-1D* mutant at the age of 40 days.

(b) The age-dependent senescence phenotype of the fourth rosette leaf of wild type (Col) and the *ORE7/ore7-1D* mutant at different ages. The photographs show representative leaves at each time point.

(c, d) The chlorophyll content (c) and photochemical efficiency (F_v/F_m) of photosystem II (PSII) (d) were measured using the fourth leaf of two independent activation lines (*ORE7/ore7-1D*, *ORE7/ore7-2D*) and overexpressing lines (*ORE7-OX1*, *ORE7-OX2*) at the indicated ages. The F_v/F_m value (maximum variable fluorescence/maximum yield of fluorescence) indicates the maximum quantum yield of PSII electron transport. Error bars indicate the SD; $n = 50$.

(e) Age-dependent changes of gene expression. Total cellular RNAs isolated from wild type (Col) and the *ORE7/ore7-1D* mutant at the indicated ages (days) were probed with the *CAB2*, *SEN4* and *SAG12* genes.

A gene encoding an AT-hook DNA-binding protein is overexpressed in the mutant

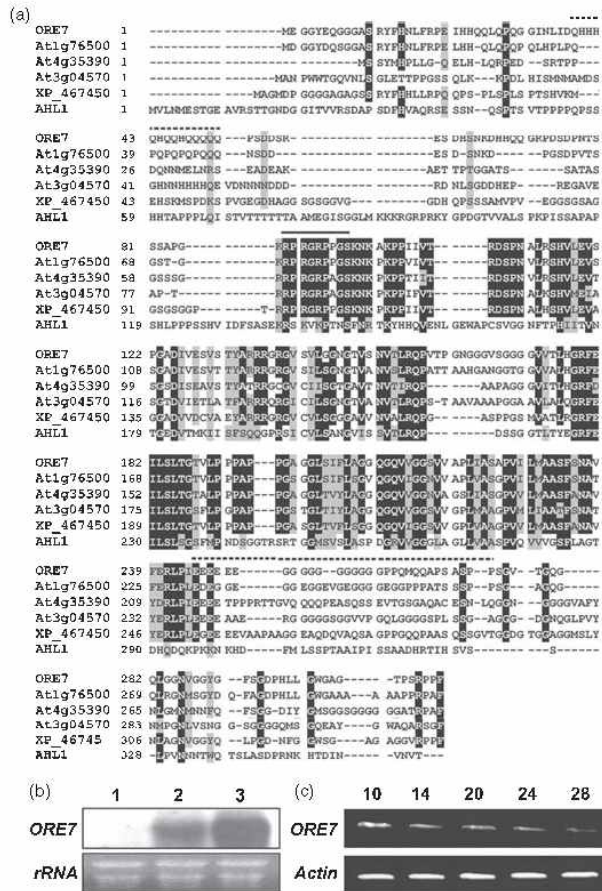
To identify the gene activated in the mutant, the genomic DNA fragment flanking the right border of the T-DNA insertion was isolated by plasmid rescue, utilizing the single *EcoRI* site in the T-DNA. The sequence of the genomic DNA flanking the T-DNA was then compared with genomic sequences of Arabidopsis, revealing a single predicted open reading frame of 936 bp closest to the right border. The predicted open reading frame (*At1g20900*) encodes a protein of 312 amino acids with a similarity to AT-hook DNA-binding proteins (Figure 2a) and was designated as the *ORE7* gene. The *ORE7* gene is identical to *ESCAROLA* (*ESC*) (Weigel et al., 2000), which was previously identified from an activation-tagged line which exhibited late flowering and

altered leaf morphology. However, the *in planta* functions of this gene have not been previously analyzed.

Ribonucleic acid gel blot analysis revealed that expression of this gene was indeed activated in the mutant (Figure 2b). In addition, as expected from the difference in the phenotypic severity of the homozygous and heterozygous lines, the expression level of the activated gene was higher in the homozygous lines than in the heterozygous lines. Expression of the *ORE7/ESC* gene was low in wild-type plants, where it was not detectable by conventional RNA hybridization analysis. However, RT-PCR analysis indicated that the gene is down-regulated as leaf age increases (Figure 2c). This result is consistent with publicly available microarray data (Nottingham Arabidopsis Stock Centre).

To prove that the mutant phenotype observed in *ORE7/ore7-1D* was caused by overexpression of the predicted

Figure 2. Structure and expression of the *ORE7* gene. (a) Alignment of the amino acid sequences of *ORE7* and other AT-hook proteins from *Arabidopsis* and *Oryza sativa* (XP 467450). The sequence of *AHL1* is also given for comparison. The AT-hook motif is denoted by a solid line, and the stretches of glutamic acid, histidine, glutamine, and glycine are indicated by a dotted line. (b) Expression of the *ORE7* gene in wild type (1) and the heterozygous *ORE7/ore7-1D* (2) and the homozygous *ore7-1D* (3) mutant leaves. (c) Expression of the *ORE7* gene during age-dependent leaf senescence. Expression of the gene was assayed by RT-PCR using total cellular RNA isolated from leaves at the indicated ages.



gene, two independent experiments were undertaken. Firstly, the delayed leaf senescence phenotype was re-created (*ORE7/ore7-2D*) by introducing the genomic DNA fragment from the activation line, containing the enhancer elements, a part of the 5' upstream sequence, the whole open reading frame of the predicted gene, and a part of the 3' flanking sequences, into wild-type plants (Figure1c,d). Secondly, a delayed leaf senescence phenotype was observed in independent transgenic lines where the full-length *ORE7/ESC* gene was expressed under the control of the 35S CaMV promoter (*ORE7-OX1* and *ORE7-OX2*), although in this case the phenotype was less pronounced (Figure1c,d).

ORE7/ESC is a nuclear localized AT-hook protein

The predicted *ORE7/ESC* protein contains a nine amino acid domain, RPRGRPPGSS, which satisfies the consensus requirement of an AT-hook motif (Figure 2a). Many of the AT-hook proteins characterized to date have been shown to either repress or activate transcription of a large number of genes by binding to AT-rich DNA sequences and modifying the architecture of DNA (Aravind and Landsman,1998; Sgarra *et al.*, 2006; Strick and Laemmli,1995; Thanos and Maniatis, 1992). They are, therefore, referred to as architectural transcription regulators. In addition to the AT-hook motif, *ORE7/ESC* possesses stretches of glutamic acid,

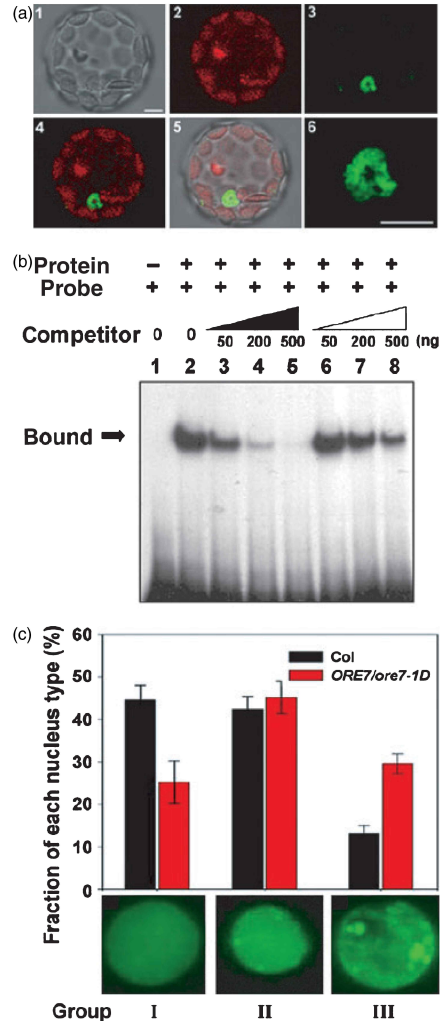
Figure 3. ORE7 as a nuclear-localized AT-hook-binding protein.
 (a) Nuclear localization of GFP-ORE7. The full length *ORE7* gene fused to the coding sequence of the *GFP* gene was introduced into Arabidopsis protoplasts. After 18 h of incubation, localization of GFP-ORE7 was examined by confocal microscopy. 1, bright field image; 2, autofluorescence image derived from chloroplasts; 3, fluorescence image of GFP-ORE7; 4, merged fluorescence image of GFP-ORE7 and chloroplast autofluorescence; 5, merged image of fluorescence image (4) and bright field image (1); 6, enlarged fluorescence image of GFP-ORE7. Scale bars, 10 μ m.
 (b) Binding of ORE7 to an AT-rich oligonucleotide. The oligonucleotide sequence corresponds to a part of the AT-rich sequence present in the promoter of the pea *PRA* gene. The 39-bp oligonucleotide with wild-type sequence was labeled with 32 P for autoradiographic detection. Competition experiments were carried out using the unlabeled wild-type oligonucleotide and a mutant oligonucleotide. The arrow indicates the location of the protein-bound, 32 P-labeled oligonucleotide.
 (c) Alteration of chromatin architecture by ORE7. 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 first and second rosette leaves of young seedlings of wild type and the *ORE7/ore7-1D* plants that express H2B-GFP. The patterns were classified into three typical groups, and the number of nuclei in each group was counted over 200 nuclei using five seedlings (see Experimental procedures).

glycine, histidine, and glutamine, which are often found in transcriptional regulators (Manavathi *et al.*, 2005; Zheng and Yang, 2004). If ORE7/ESC is an AT-hook DNA-binding protein, then it would be predicted to be localized in the nucleus. To examine the subcellular localization of ORE7, a green fluorescent protein (GFP)-ORE7 fusion protein was expressed in Arabidopsis protoplasts. As expected, ORE7-GFP was selectively localized to the nucleus (Figure 3a). Interestingly, the fusion protein appeared as distinctive nuclear speckles.

We then conducted an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) to test whether the ORE7/ESC protein possessed the ability to bind to an A/T-rich DNA sequence, as would be expected from the proposed structure. The DNA sequence we used for this test was the A/T-rich region in the promoter of the pea (*Pisum sativum*) *PRA2* gene (Nagano *et al.*, 2001). As shown in Figure 3b (lane 2), ORE7 was able to bind to the 32 P-labeled, 39-bp A/T-rich DNA fragment. Competitor DNA fragment (unlabeled) with the same wild-type sequence diminished the binding of ORE7 to the labeled fragment (lanes 3–5) more effectively than did the competitor DNA fragment with mutated sequences (lanes 6–8). Thus, binding of ORE7/ESC to this DNA fragment appeared specific. These results suggest that the *ORE7/ESC* gene encodes a protein that binds to AT-rich DNA sequences in the nucleus.

Chromatin architecture is modified in the *ORE7/ore7-1D* mutant

Use of a histone2B (H2B)-GFP fusion protein has been shown previously to be a sensitive method for the analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells (Kanda *et al.*, 1998). Histone2B-yellow fluorescent protein (YFP) was incorporated into the plant chromosome (Boisnard-Lorig



et al., 2001) and shown to be useful for examining the status of plant chromatin. To monitor whether chromatin architecture is modified in the *ore7-1D* heterozygous mutants, we generated transgenic lines that express the H2B-GFP fusion protein and crossed them with the *ORE7/ore7-1D* mutants. The spatial distribution patterns of H2B-GFP-tagged chromatin of leaf cells are classified into three groups according

to the number of subnuclear domains (nuclear bodies) and the interchromatin-like compartment that contains little or no GFP signal (Haithcock *et al.*, 2005). While the leaf cells of *ORE7/ore7-1D* mutants exhibited more reticular chromatin distribution and intensely labeled nuclear bodies (Figure 3c, Group III), the majority of wild-type leaf cells displayed an evenly distributed fluorescence pattern over the whole nucleus with few or no nuclear bodies (Figure 3c, Group I). Therefore, increased levels of ORE7/ESC affect the distribution of H2B-GFP in the Arabidopsis nucleus, indicating that ORE7/ESC controls chromatin architecture.

Microarray analysis of gene expression in the ORE7/ore7-1D mutant

To gain an insight into the function of *ORE7/ESC*, a genome-wide gene expression analysis was performed by a microarray experiment. The Arabidopsis CATMA (Complete Arabidopsis Transcriptome Microarray) Consortium microarray (<http://www.catma.org>) (Allemeersch *et al.*, 2005) containing a collection of gene specific tags (GSTs) of over 24000 Arabidopsis genes was probed with RNAs isolated from mature green leaves of the wild type or the *ORE7/ore7-1D* mutant. At this stage, neither the mutant nor the wild-type leaves show visible senescence symptoms. Sampling the leaves at this stage was to reduce inclusion of expression changes due to the secondary effect of the mutation in leaf senescence; later stage leaves have a larger difference in senescence state between the mutant and the wild type. The analysis revealed 1096 genes that showed at least a twofold change in expression in the mutant compared with the wild type. Among the 1096 genes, 615 genes (Table S1) and 481 genes (Table S2) were down- and up-regulated, respectively. A large number of genes that are up- or down-regulated during leaf senescence have been previously identified by using Affymetrix GeneChips (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). The information from these previous experiments was used to characterize the genes with altered expression in the *ORE7/ore7-1D* mutant. Since increased expression of *ORE7* can delay leaf senescence, it was expected that senescence up-regulated genes (SEN^+) would show lower expression in the *ORE7/ore7-1D* mutant. Conversely, senescence down-regulated genes (MG^+) would show a higher expression in the mutant (the abbreviation MG^+ is used here to denote genes that show higher expression at the mature green stage of a leaf). Among the 481 genes with a higher expression level in the *ORE7/ore7-1D* mutant, 92 (19%) and 39 (8%) were MG^+ and SEN^+ , respectively. Among the 615 genes with a lower expression level in the *ORE7/ore7-1D* mutant, 195 (32%) and 42 (7%) were SEN^+ and MG^+ , respectively (Tables S1 and S2). Thus, the gene expression pattern in the *ORE7/ore7-1D* mutant largely reflected a delayed leaf senescence phenotype. However, it

is notable that, contrary to expectation, some SEN^+ and MG^+ genes show higher and lower expression, respectively, in the *ORE7/ore7-1D* mutant leaves.

Functional categories of genes with altered expression in the ORE7/ore7-1D mutant

Entering the array data into the MAPMAN program (Thimm *et al.*, 2004) displayed the relative changes in expression of the various genes with an altered expression in the *ORE7/ore7-1D* mutant onto diagrams of the functional compartments (Figure 4a). Of particular interest was a large group of genes involved in protein synthesis that showed increased expression in *ORE7/ore7-1D*. For example, 16% (75 genes) of

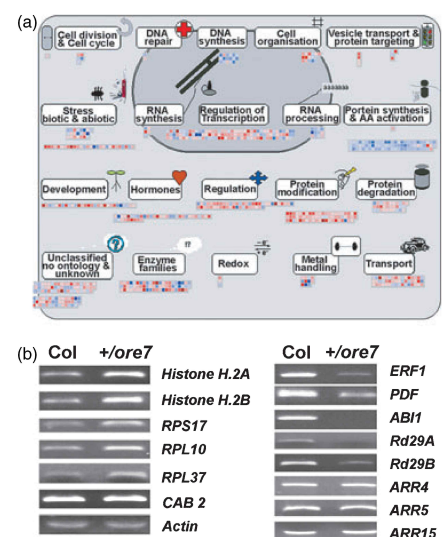


Figure 4. Genes with altered expression in the *ORE7/ore7-1D* mutant. (a) MAPMAN assignment of genes with altered expression in the mutant into the functional categories. Genes that are up-regulated (blue squares) or down-regulated (red squares) in the *ORE7/ore7-1D* mutant plant were assigned into the functional categories in MAPMAN. Of particular note among the up-regulated genes is the large group encoding proteins involved in protein synthesis. The groups involved in RNA processing and DNA synthesis also show increased expression. Groups rich in down-regulated genes are those encoding protein-modification enzymes in particular and those involved in protein degradation, regulation and transport. (b) Reverse transcriptase-PCR analysis of various genes. The first-strand cDNAs were prepared using RNAs isolated from the fourth leaves at mature green stages (the age of 12 days) of wild type and the *ORE7/ore7 1-D* plants. The sequences examined are *Histone H.2A* (At3g54560), *Histone H.2B* (At5g22880), *RPS17* (At3g10610), *RPL10* (At1g26910), *RPL37* (At3g16080), *CAB2* (At1g29920), *Actin2* (At3g18780), *ERF1* (At4g17500), *PDF* (At1g75830), *ABI1* (At4g26080), *Rd29A* (At5g52310), *Rd29B* (At5g52300), *ARR4* (At1g10470), *ARR5* (At3g48100), and *ARR15* (At1g74890).

the up-regulated genes encoded ribosomal proteins (Figure 4, Table S1). In addition, various genes in the DNA synthesis group, including histone genes, were up-regulated. The increased expression of two histone genes and three ribosomal proteins was confirmed by RT-PCR analysis (Figure 4b).

In contrast, gene expression patterns indicate a reduction in activity of signaling pathways involving jasmonic acid (JA), abscisic acid (ABA), ethylene, and salicylic acid (SA) in the mutant (Figure 4, Table S2). Reduced expression of genes which depend on the SA signaling pathway for their expression, including those encoding a leucine-rich repeat family protein (At4g28490) and a protein kinase (At4g23150) (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005), was observed. Also, the array results indicated that four JA pathway-related genes were down-regulated in the mutant (Table S2) and this was supported by RT-PCR analysis showing down-regulation of a plant defensin gene (*PDF1.1*, At1g75830), which is known to be dependent on JA signaling for its expression (Figure 4b). In addition, seven ethylene pathway genes were down-regulated in the mutant (Table S2) and this was confirmed by RT-PCR assay of an ethylene response factor (*ERF1*, At4g17500) (Figure 4b). Furthermore, RT-PCR showed that several ABA-inducible genes, including *ABI1*, *rd29A*, and *rd29B* were down-regulated in the mutant.

The differential expression of these pathways is not likely to be due to a large difference in the developmental stages between the mutant and wild-type plants, since we used mature green leaves from both plants and these showed no apparent senescence symptoms at that time. Also, there was no noticeable difference in the expression of photosynthesis-related genes, which would be expected if senescence had started in the wild-type leaves (Figure 4b, Tables S1 and S2).

Interestingly, while cytokinin is an effective senescence-retarding growth regulator (Gan and Amasino, 1995; Kim *et al.*, 2006), expression of genes involved in cytokinin synthesis or signaling was not altered in the mutant (Figure 4b, Tables S1 and S2), indicating that the delayed senescence in the activation mutant line is not due to modification of cytokinin synthesis or signaling.

Ectopic ORE7/ESC delays leaf senescence induced by senescence-accelerating hormones

The gene expression data shown above revealed that the signaling pathways of ethylene, JA, and ABA that have a role in accelerating senescence were at least partially suppressed by ORE7/ESC expression in mature leaves. We thus examined the response of the mutant to these senescence-accelerating hormones (Figure 5). When detached leaves were treated with methyl jasmonate (MJ) or ABA a rapid decrease in chlorophyll and PSII activity was observed in wild-type leaves, and 3 days after incubation the chlorophyll content of wild-type leaves was less than 40%. In contrast, the *ORE7*

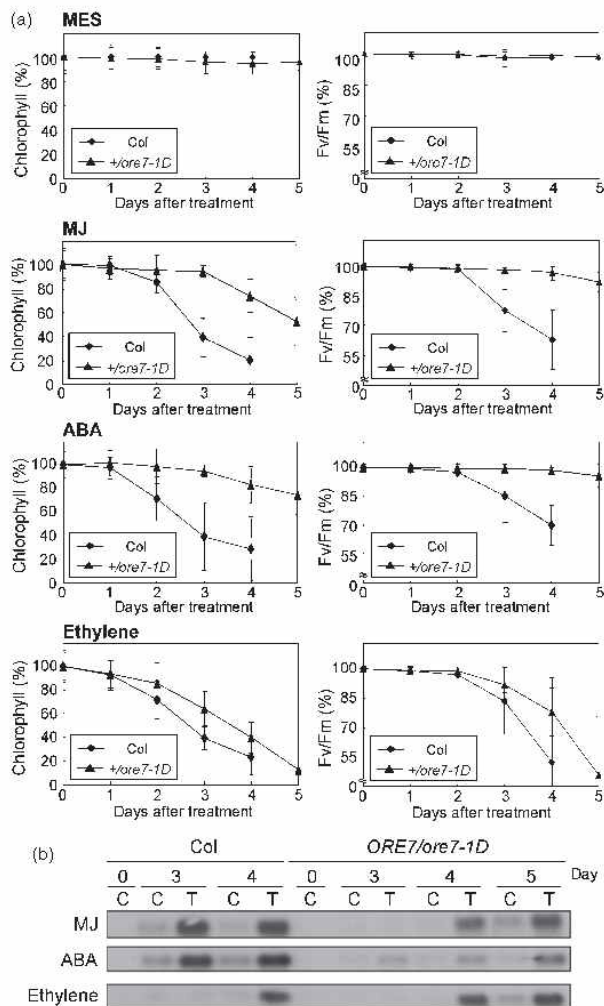
ore7-1D leaves retained more than 90% of chlorophyll following treatment with MJ or ABA. Following ethylene treatment, the difference in senescence response between the wild type and the mutant was not as striking as in the case of MJ or ABA but the mutant did retain more chlorophyll and photosynthetic activity than the wild type after 4 days of the treatment (Figure 5a). The altered senescence responses of the mutant to the hormones were further analyzed by measuring the expression of a senescence-induced gene, *SEN4*. This gene showed delayed expression in the mutant compared with the wild type following MJ and ABA treatment (Figure 5b), but little difference in response to ethylene was seen. These data showed that the senescence response pathways induced by MJ, ABA, and ethylene can be suppressed by ectopic ORE7/ESC, although the ethylene response was much less affected in our experimental conditions.

Increased post-harvest storage life of the ORE7/ore7-1D mutant

We then investigated the post-harvest storage life in leaves from the *ORE7/ore7-1D* mutant to see whether this mirrors the delay in the natural senescence of the leaf. Detached leaves were examined under conditions that accelerate senescence. Many stresses lead to premature senescence and are associated with generation of reactive oxygen species (Reilly *et al.*, 2004). Therefore we assessed tolerance of the detached leaves to oxidative stress. The detached leaves were treated with hydrogen peroxide and a rapid decline of chlorophyll content and PSII activity was seen in the wild type. In contrast, the *ORE7/ore7-1D* leaves retained over 80% of chlorophyll (Figure 6a) and 95% of PSII activity (data not shown), even at 5 days after treatment. Darkness is a potent environmental stimulus that accelerates post-harvest senescence and, as shown in Figure 6(b), the post-harvest life of the detached leaves of the *ORE7/ore7-1D* mutant was significantly longer in this condition compared with wild type. Even after 8 days of dark incubation, over 50% of the chlorophyll content was retained in the *ORE7/ore7-1D* mutant, while wild-type leaves lost all chlorophyll by that time. In addition, the photochemical activity of PSII was maintained at a much higher level and induction of *SEN4* expression, a marker gene for senescence, was lower in the mutant (data not shown). The data together showed that overexpression of ORE7, as in the *ORE7/ore7-1D* mutant, can be highly effective in delaying post-harvest senescence of detached leaves.

Constitutive expression of a gene in transgenic plants could cause several pleiotropic effects, as we observed in the *ORE7/ore7-1D* mutant. Therefore, the delayed senescence phenotype may be the result of an indirect downstream effect following the constitutive expression of the gene. To test this, we investigated whether controlled

Figure 6. Senescence response of *ORE7ore7-1D* mutant leaves to hormone treatment. (a) The changes of chlorophyll content and photochemical efficiency (F_v/F_m) in detached leaves during incubation with control buffer (2-(*N*-morpholine)-ethanesulfonic acid; MES), 100 μ M methyl jasmonate (MJ), 50 μ M ABA, and 5 μ M ethylene. Error bars indicate SD; $n = 24$. (b) Ribonucleic acid gel blot analysis of expression of the *SEN4* gene. The RNA levels were examined in the leaves incubated with control buffer (C) or with hormones (T) for the indicated days.



expression of the *ORE7/ESC* gene still leads to delayed senescence. For this experiment, we generated inducible transgenic lines that express the *ORE7/ESC* gene under the control of a glucocorticoid-inducible promoter. In the absence of dexamethasone (DEX, a synthetic glucocorticoid) treatment, no noticeable phenotypic alteration was observed in the transgenic plants, while expression of the *ORE7/ESC* gene was readily induced by treatment with DEX

(Figure 6c). The effect of inducible overexpression of the *ORE7/ESC* gene on storage life of leaves was then assessed by the dark-induced post-harvest senescence assay using detached leaves. After 7 days of dark incubation, DEX-treated leaves of the transgenic *ORE7/ESC* inducible lines remained green, while control leaves turned yellow (Figure 6c). Measurement of the photochemical efficiency revealed that the DEX-treated leaves retained a higher

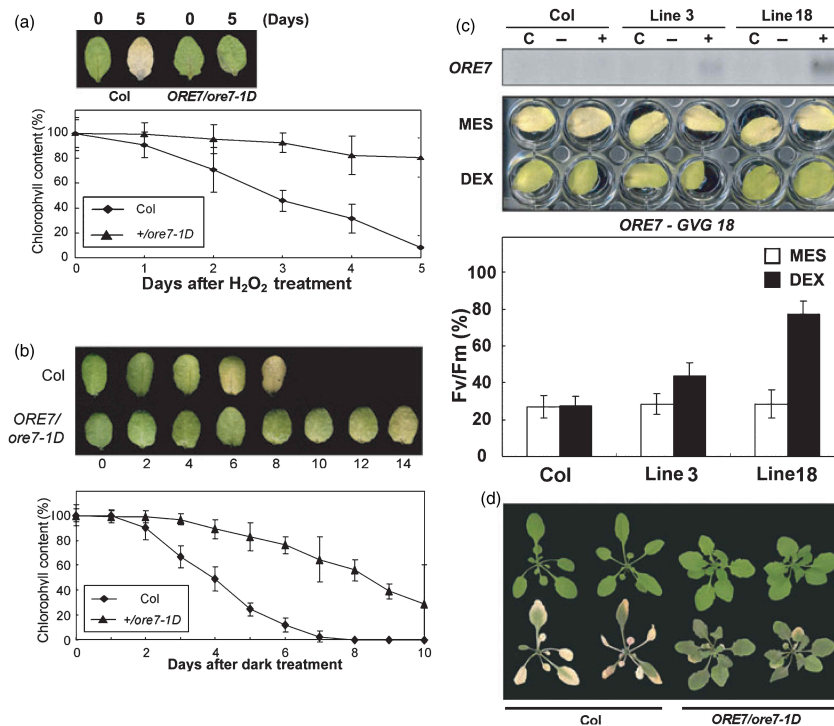


Figure 6. The *ORE7/ore7-1D* mutant shows increased post-harvest storage life.

(a) Post-harvest senescence phenotype of detached leaves of wild type and *ORE7/ore7-1D* mutant during hydrogen peroxide-induced senescence. The photos were taken 5 days after treatment.

(b) Dark-induced post-harvest senescence phenotype of detached leaves of wild type and *ORE7/ore7-1D* mutant. The chlorophyll contents (a, b) were measured using the fourth leaf at the indicated days.

(c) Effect of glucocorticoid-inducible expression of *ORE7* on dark-induced senescence after detachment. The level of *ORE7* transcript was examined in the detached leaves of wild type (Col) and two different transgenic Arabidopsis lines (3, 18) carrying the glucocorticoid-inducible *ORE7* construct before incubation (C) and after incubation with the control buffer (-) or with 15 μM dexamethasone (DEX), a glucocorticoid (+), in darkness for 7 days (top). Senescence phenotype of detached leaves of the glucocorticoid-inducible line (18) treated with the control buffer (2-(N-morpholine)-ethanesulfonic acid; MES) or with 15 μM DEX in darkness for 7 days (middle). Change of the photochemical efficiency (F_v/F_m) of leaves of wild type and the two glucocorticoid-inducible lines (3 and 18) treated with the control buffer (white) or with 15 μM DEX (black) in darkness for 7 days. The photochemical efficiency is presented as average percentage values \pm standard deviation (SD), relative to that of leaves of day 0 (bottom).

(d) Post-harvest senescence phenotype of detached whole aerial parts of wild type and *ORE7/ore7-1D* mutant. The photos were taken 6 days after cutting.

photochemical efficiency than control leaves (Figure 6c). This result indicated that the delayed senescence in the detached leaves is a direct effect of *ORE7/ESC* on the senescence-controlling pathway. Importantly, exploiting a strategy of regulated expression of *ORE7/ESC* should be applicable to the manipulation of post-harvest senescence, thereby negating unfavorable pleiotropic effects.

The harvesting of vegetable crops often involves the whole of the aerial part of the plant. Therefore, we examined the post-harvest senescence response of the whole aerial

part of the *ORE7/ore7-1D* activation mutant where the roots were removed from the mutant line during harvest as a simulation of vegetable harvest. Aerial parts of the plants harvested at 20 days after planting (DAP) by cutting the junction between the aerial part and the roots were kept on a wet filter for 6 days under long-day conditions. While the leaves of wild type became almost completely yellow by this time, the leaves of mutants remained green and fresh (Figure 6d). This result demonstrates that regulated *ORE7/ESC* overexpression could be a useful method for delaying

post-harvest senescence at the whole plant level as well as the detached leaf level.

Discussion

The timing of the onset and the rate of progression of leaf senescence must be finely controlled with concomitant regulation of gene expression during the senescence process. Studies utilizing molecular, genetic, and genomics strategies have enabled limited predictions of the molecular mechanisms that are involved in controlling leaf senescence (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; van der Graaff *et al.*, 2006; Guo and Gan, 2006; Kim *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2001, 2002; Xiong *et al.*, 2005). In this paper we present data showing that ectopic overexpression of *ORE7/ESC*, a member of the AT-hook protein gene family, greatly extends leaf longevity as well as post-harvest storage life in transgenic plants and suggest a possibility that this may occur by alteration of chromatin architecture.

This exciting discovery was enabled by the isolation of a new mutant from an activation-tagged mutant pool, which showed significantly delayed leaf senescence in the heterozygote state, *ORE7/ore7-1D*. Furthermore, leaf longevity was extended over twofold, which represents one of the most significant extensions of leaf life span so far reported in Arabidopsis. The altered senescence process of the *ORE7/ore7-1D* mutant is distinctly different from other previously identified leaf senescence mutants such as those caused by the *ore1*, *ore3*, *ore4*, *ore9*, or *ore12* mutations (Oh *et al.*, 1997; Woo *et al.*, 2001, 2002). While these mutations bring about a delay mostly in the onset of timing of leaf senescence with relatively little effect on the progression of the senescence process, the *ORE7/ore7-1D* mutant showed a considerably slower progression of leaf senescence. This is similar to another mutation, *dls1*, which is also altered in the progression of leaf senescence (Yoshida *et al.*, 2002). Interestingly, the ectopic expression of *ORE7/ESC* has a broad effect on senescence, causing a delayed senescence phenotype in organs other than the leaf, including the stem and silique (Figure S1). Furthermore, senescence induced by MJ, ABA, or ethylene is delayed as well as age-dependent leaf senescence.

Our initial screen for delayed leaf senescence mutants from activation tagging lines was attempted to identify a negative regulator of senescence. In order to confirm that *ORE7* is a negative regulator of leaf senescence, we utilized the loss-of-function mutant. Since a T-DNA knockout line of *ORE7/ESC* was not available in the SALK collection, a TILLING strategy (for Targeting-Induced Local-scale Lesions In Genomes) was used to isolate mutants of the *ORE7/ESC* gene. We then examined the phenotype of the loss-of-function *ore7/esc* mutant, in which an early termination (converts Gln43 to stop codon; CS90175) occurs. The mutant did not exhibit any senescence phenotype, and no visible

morphological phenotype was observed in the mutant either. This observation might reflect that the senescence phenotype we observed in the activation line could be a pleiotropic phenotype due to ectopic expression of the gene, not representing its primary *in planta* function. Analysis of the expression patterns of the *ORE7/ESC* gene indicates that it is expressed at a low level in leaves. Therefore, it may be that the role of this gene in normal plant development is not necessarily related to leaf senescence but the ectopic expression of the gene in leaves has a serendipitous effect resulting in delayed senescence. Alternatively, lack of phenotype in the *ore7/esc* mutant may be due to the presence of functionally redundant genes, since approximately 30 paralogs were identified in Arabidopsis.

The AT-hook motif is known to interact with the narrow minor groove of AT-rich DNA sequences. AT-hook proteins can affect the architecture of chromatin and play a role in the regulation of transcription by acting as factors that influence the association of transcription factors with chromatin (Aravind and Landsman, 1998; Sgarra *et al.*, 2006; Strick and Laemmli, 1995; Thanos and Maniatis, 1992), although knowledge about the functional role of AT-hook motif proteins is still very limited in plants. From the data we presented here, we argue that *ORE7* indeed functions as a plant AT-hook protein. It is localized in the nucleus and can bind to AT-rich sequences *in vitro*. *ORE7/ESC* can affect chromatin architecture, as we showed by modification of the distribution of H2B-GFP fusion (Figure 3). Furthermore, it can affect transcription of a large number of genes, as we demonstrated by microarray analysis. Studies on AT-hook proteins in wheat (*Triticum aestivum*) (*AHM1*, Morisawa *et al.*, 2000) and Arabidopsis (*AHL1*, Fujimoto *et al.*, 2004) have revealed that they can bind to the matrix attachment region (MAR) and are localized to the nuclear matrix, suggesting that they can function as a nuclear matrix component. *ORE7/ESC* appears to be paralogous to *AHL1* with a similarity in sequence and protein size. However, *ORE7/ESC* has a feature different from *AHL1*. The Arabidopsis AT-hook motif proteins can be broadly classified into two phylogenetic groups (Fujimoto *et al.*, 2004). *ORE7* and *AHL1* belong to different groups. In addition, *ORE7/ESC* contains stretches of histidine, glutamic acids, and glutamine, which is a feature different from *AHL1*. Thus, *ORE7/ESC* and *AHL1* may have distinctive *in planta* functions.

How then is leaf senescence delayed in the *ORE7/ore7-1D* mutant? With the notion that *ORE7/ESC* is an AT-hook protein, it is conceivable that *ORE7/ESC* can up-regulate genes that suppress senescence and down-regulate genes that enable the progression of the senescence process through modification of chromatin architecture. Indeed, the microarray data revealed enhanced expression of genes for self-maintenance as well as reduced expression of genes for senescence-promoting pathways in the activation line, although the genes with altered expression may not be the

direct targets of ORE7/ESC. The possibility that altered chromatin architecture may control leaf longevity in Arabidopsis is analogous to the case of the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) SIR (Silent Information Regulator) gene. When this gene is overexpressed, the chromatin architecture of the yeast genome is altered, resulting in extended longevity (Campisi, 2000; Lin et al., 2000). However, the mechanisms suggested for the extended longevity are different. In yeast, chromatin compactness caused by overexpression of SIR was suggested to suppress age-dependent detrimental events, such as DNA rearrangement and rDNA circle formation. In the case of ORE7/ESC, we suggest that the extended longevity is caused by altered expression of a large number of genes that are up- or down-regulated during development.

Mutations that affect chromatin architecture often display complex and pleiotropic phenotypes, since in many cases they affect expression of a relatively large number of genes (Berger and Gaudin, 2003; Li et al., 2002). A similar situation was observed in the ORE7/ESC overexpressor lines (Figure 1). The pleiotropic phenotypes caused by overexpression of ORE7/ESC were consistent with the microarray analysis of the mutant. Ectopic ORE7/ESC affected not only expression of the senescence-related genes but also that of genes in many other functional categories. Unexpected up-regulation of some of the senescence-related genes also appears to be one of the pleiotropic effects of the ORE7/ESC overexpressor. It should be also noted that the delayed leaf senescence phenotype is not due to the indirect effect of delayed reproduction, i.e. late flowering, since, in Arabidopsis, senescence of individual leaves is not closely linked with the development of the reproductive structures (Hensel et al., 1993). This is also shown clearly by inducible expression experiments on the detached leaves.

Identification of genes that alter senescence has considerable practical value. In this paper, we showed that ORE7/ESC, when overexpressed in transgenic plants, has a profound effect in delaying post-harvest as well as natural senescence. The regulated expression of the ORE7/ESC gene could potentially be used for improving the storage life of harvested vegetables.

There is increasing evidence that chromatin structure plays a critical role in many facets of plant development (Berger and Gaudin, 2003; Li et al., 2002). Our results provide an important molecular insight that leaf longevity may be affected by the control of chromatin structure. The activation line will provide a valuable tool for defining the components and regulation of the pathways involved in this mechanism.

Experimental procedures

Plant materials, mutant screening, and growth conditions

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia (Col-0) plants were grown in a temperature-controlled greenhouse at 24°C in 16-h days.

Arabidopsis plants were transformed using *Agrobacterium tumefaciens* ABI that carries the activation-tagging plasmid pSKI015 by the floral dipping method (Clough and Bent, 1998). Mutants with a delayed leaf senescence phenotype were initially screened by visual evaluations of leaf yellowing of T₁ plants. Potential mutants were self-fertilized and the progenies were further analyzed for co-segregation of the delayed senescence phenotype with the T-DNA insertion.

Assay of senescence

Age-dependent leaf senescence was assayed as described by Woo et al. (2001). For dark-induced post-harvest leaf senescence assay, the third and fourth leaves at 12 days after leaf emergence were detached and floated on 3 mM 2-(*N*-morpholine)-ethanesulfonic acid (MES) buffer (pH 5.7) in the dark. For oxidant treatment, detached leaves were floated in the MES buffer in the presence or absence of 15 mM hydrogen peroxide. For hormone treatments, detached leaves were floated in the MES buffer in the presence or absence of 50 µM ABA (Sigma, <http://www.sigmaaldrich.com/>) or 100 µM MJ (Sigma). In the case of ethylene treatment, detached leaves were incubated in a glass box containing 5 µM ethylene gas. All hormonal treatments were performed at 22°C under continuous light. The chlorophyll content of individual leaves was measured as described in Lichtenthaler (1987). The photochemical efficiency of PSII was measured by the Plant Efficiency Analyzer (Hansatech Instruments, <http://www.hansatech-instruments.com/>) (Oh et al., 1997). For assaying post-harvest senescence at the whole plant level, aerial parts of plants harvested at 20 DAP were cut out and placed on wet filter papers for 6 days.

Subcellular localization of the ORE7-GFP fusion protein

The full-length ORE7 open reading frame was amplified by PCR with primers containing appropriate restriction sites and cloned into the C-terminus of the GFP coding region in the p326GFP-3G vector. The plasmid DNA was introduced into protoplasts of wild-type leaf cells as described previously (Kim et al., 2006). Expression of fusion protein was observed 18 h after transfection using the Zeiss LSM 510 Meta confocal microscopy (Carl Zeiss, <http://www.zeiss.com/>).

Assay of chromatin architecture

The H2B-GFP fusion construct was generated to examine the effect of ORE7/ESC in the regulation of chromatin architecture. Transgenic plants expressing H2B-GFP under the control of cassava vein mosaic virus (CsVMV) promoter were generated by the floral dip method. These plants were crossed with the ORE7/ore7-1D heterozygote mutant. In the F₂ generation, the plants that expressed H2B-GFP and showed the delayed senescence phenotype were selected by phenotype and fluorescence microscopy followed by PCR-based genotyping.

Changes in chromatin architectures were assessed by monitoring H2B-GFP fluorescence patterns (Boisnard-Lorig et al., 2001) in the first and second leaves of wild-type and the ORE7/ore7-1D mutant, respectively, using the LSM 5 live imaging confocal microscope (Carl Zeiss). The distinct H2B-GFP fluorescence patterns were scored and further classified into three groups to represent the changes in chromatin architectures. The data presented are the mean ± SE of each nucleus fraction from four independent experiments.

Electrophoretic mobility shift assay

The protein-coding sequence of the *ORE7/ESC* gene was amplified by PCR to introduce the restriction enzyme sites. The fragment was ligated into the corresponding restriction enzymes sites in the TriEx-1 vector (Novagen, <http://splash.emdbiosciences.com/>). *In vitro* protein synthesis was performed with ³⁵S-labeled methionine (Perkin Elmer Life Science, <http://las.perkinelmer.com/>) in the TnT reticulocyte lysate system (Quick Coupled Transcription/Translation Systems; Promega, <http://www.promega.com/>) according to the manufacturer's instructions.

An electrophoretic mobility shift assay was performed using a method described previously (Nagano *et al.*, 2001). The 39-bp synthetic oligonucleotide (5'-TAA CAC ATA TTTTGATAA ATTTA-TTACTAA AACTATTTT-3') that is derived from the pea *PRA2* gene, a dark-induced small G protein gene (Yoshida *et al.*, 1993), was used as a probe. The probe was labeled by incubation with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase. Five microliters of TNT (*in vitro* transcription/translation)-produced ORE7 protein was added into a binding buffer (20 μ l) containing 2 μ g of poly(dI-dC)-poly(dI-dC), bovine serum albumin (500 μ g μ l⁻¹). The protein-DNA complex was formed by incubating this mixture at 25°C for 1 h with the ³²P-labeled probe. Competition experiments using the wild-type competitor and mutated competitors (5'-TAACACTGCAGGATAA ATTTATTAC TAA AACTATTTT-3') were also performed. Binding reactions were carried out with 5 μ l of TNT-produced ORE7 protein and the ³²P-labeled probe (2.5 fmol) in the presence of unlabeled wild-type competitor or mutant competitor.

Analysis of glucocorticoid-inducible lines

Transgenic lines expressing *ORE7/ESC* under the control of glucocorticoid-inducible promoter were generated by the floral dipping method. The glucocorticoid treatments were performed as described by Aoyama and Chua (1997). Detached mature green rosette leaves (12 days old) were floated in a buffer containing 15 μ M DEX (Sigma) in the dark at 22°C for 7 days.

Microarray experiments

Microarrays used carried genome sequence tags (GST) fragments generated using gene-specific primers identified by the CATMA Consortium (<http://www.catma.org>) (Allemeersch *et al.*, 2005). The CATMA PCR products were generated by secondary amplification as described on the CATMA web site. The PCR fragments were purified and mixed with DMSO to give a final DNA concentration of approximately 0.2 μ g μ l⁻¹ in 50% DMSO. Microarrays were printed on CMT-GAPS coated slides (Corning, <http://www.corning.com/>) using a BioRobotics Microgrid II robot. Slides were baked for 4 h at 80°C and then stored with desiccant at room temperature.

For microarray hybridization, total RNAs were isolated from leaves of wild-type1 and *ORE7/ore7-1D* mutant at the age of 12 days (at mature green stage) and 1 μ g of each RNA was amplified using the MessageAmp II aRNA Amplification kit (Ambion, <http://www.ambion.com/>) in accordance with the kit protocol with a single round of amplification. The Cy3- and Cy5-labelled cDNA probes were prepared from 2 μ g of aRNA using the CyScribe Post-Labeling kit (Amersham Biosciences, <http://www5.amershambiosciences.com/>) whereby amino allyl-dUTP was incorporated during cDNA synthesis followed by chemical labeling of the amino allyl-modified cDNA using CyDye NHS-esters. Labeled cDNA was mixed in 25% formamide, 5 \times SSC, 0.1% SDS and 0.5 mg ml⁻¹ yeast tRNA (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/>) and hybridized to slides

overnight at 42°C. Slides were washed and then scanned using an Affymetrix 428 array scanner at 532nm (Cy3) and 635nm (Cy5). Scanned data were quantified using Imagen version 4.2 software (BioDiscovery, <http://www.biodiscovery.com/>). GeneSpring version 5.1 (Silicon Genetics, <http://www.silicongenetics.com/>) was used to normalize the data and identify genes showing significant differential expression in the mutant using the Benjamini and Hochberg multiple correction false discovery test. Ratio data were converted to a log base 2 scale and imported into MAPMAN (Thimm *et al.*, 2004).

RT-PCR assays for expression of various genes

The expression profiles obtained from chip hybridizations were further validated by RT-PCR using first-strand cDNA synthesized from independently isolated RNA samples. First-strand cDNA was synthesized with 2 μ g of total RNA by the ImProm-II Reverse Transcription system (Promega). All RT-PCR experiments were repeated at least twice.

Acknowledgements

We thank K. H. Suh, Y. S. Park, and B. H. Kim for excellent technical assistance. We thank Dr Detlef Weigel for providing the pSKI015 vector and Dr Roger Beachy for the pLAU6 plasmid. This work was supported by grants from the Crop Functional Genomics Research Program (to HGN; CG1312) and the MOST/KOSEF to the National Core Research Center for Systems Bio-Dynamics (R15-2004-033). The work by POL was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by Korea Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund, KRF-2005-261-C00075) and Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

Supplementary Material

The following supplementary material is available for this article online:

Figure S1. Phenotypes of siliques and stems in the *ORE7/ore7-1D* mutant and wild-type plants at various developmental stages. (a) Photos of siliques were taken at the indicated days after pollination. (b) Photos of stems were taken at the indicated days after bolting (DAB). Scale bars 1 cm.

Table S1. Genes showing increased expression levels in the *ORE7/ore7-1D* mutant plants.

Table S2. Genes showing reduced expression levels in the *ORE7/ore7-1D* mutant plants.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- Allemeersch, J., Durinck, S., Vanderhaeghen, R. *et al.* (2005) Benchmarking the CATMA microarray. A novel tool for Arabidopsis transcriptome analysis. *Plant Physiol.* **137**, 588–601.
- Aoyama, T. and Chua, N.H. (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* **11**, 605–612.

- Aravind, L. and Landsman, D. (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4413–4421.
- Berger, F. and Gaudin, V. (2003) Chromatin dynamics and *Arabidopsis* development. *Chromosome Res.* **11**, 277–304.
- Bleecker, A.B. and Patterson, S.E. (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **9**, 1169–1179.
- Boisnard-Lorig, C., Colon-Camona, A., Bauch, M., Hodge, S., Doerner, P., Bancharel, E., Dumas, C., Haseloff, J. and Berger, F. (2001) Dynamic analyses of the expression of the Histone::YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell*, **13**, 495–509.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. and Pink, D. (2003) The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnol. J.* **1**, 3–22.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E. et al. (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* **42**, 567–585.
- Campisi, J. (2000) Aging, chromatin, and food restriction – connecting the dots. *Science*, **289**, 2062–2063.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743.
- Fujimoto, S., Matsunaga, S., Yonemura, M., Uchiyama, S., Azuma, T. and Fukui, K. (2004) Identification of a novel plant MAR DNA binding protein localized on chromosomal surfaces. *Plant Mol. Biol.* **56**, 225–239.
- Gan, S. and Amasino, R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986–1988.
- van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.I. and Kunze, R. (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol.* **141**, 776–792.
- Guo, Y. and Gan, S. (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J.* **46**, 601–612.
- Haithecock, E., Dayani, Y., Neufeld, E., Zahand, A.J., Feinstein, N., Mattout, A., Gruenbaum, Y. and Liu, J. (2005) Age-related changes of nuclear architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 16690–16695.
- He, Y. and Gan, S. (2002) A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 805–815.
- He, Y., Tang, W., Swain, J.D., Green, A.L., Jack, T.P. and Gan, S. (2001) Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiol.* **126**, 707–716.
- Hensel, L., Grbic, V., Baumgarten, D.A. and Bleecker, A.B. (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **5**, 553–564.
- Jing, H.-C., Sturre, M.J.G., Hille, J. and Dijkwel, P.P. (2002) *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *Plant J.* **32**, 51–63.
- Kanda, T., Sullivan, K.F. and Wahl, G.M. (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr. Biol.* **8**, 377–385.
- Kim, H.J., Ryu, H., Hong, S.H., Woo, H.R., Lim, P.O., Lee, I.C., Sheen, J., Nam, H.G. and Hwang, I. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 814–819.
- Li, G., Hall, T.C. and Holmes-Davis, R. (2002) Plant chromatin: development and gene control. *Bioessays*, **24**, 234–243.
- Lichtenhaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **18**, 350–382.
- Lim, P.O. and Nam, H.G. (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Curr. Top. Dev. Biol.* **67**, 49–83.
- Lim, P.O., Woo, H.R. and Nam, H.G. (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **8**, 272–278.
- Lin, S.-J., Defossez, P.-A. and Guarente, L. (2000) Requirement of NAD and *SIR2* for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **289**, 2126–2128.
- Manavathi, B., Nair, S.S., Wang, R.A., Kumar, R. and Vadlamudi, R.K. (2005) Proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein-1 is essential in growth factor regulation of signal transducers and activators of transcription 3 activation. *Cancer Res.* **65**, 5571–5577.
- Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P. and Zentgraf, U. (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **55**, 853–867.
- Morisawa, G., Han-Yama, A., Moda, I., Tamai, A., Iwabuchi, M. and Meshi, T. (2000) AHM1, a novel type of nuclear matrix-localized, MAR binding protein with a single AT hook and a J domain-homologous region. *Plant Cell*, **12**, 1903–1916.
- Morris, K.A.H., Mackerness, S., Page, T., John, C.F., Murphy, A.M., Carr, J.P. and Buchanan-Wollaston, V. (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* **23**, 677–685.
- Nagano, Y., Hirofumi, F., Takehito, I. and Yukiko, S. (2001) A novel class of plant-specific zinc-dependent DNA-binding protein that binds to AT-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4097–4105.
- Nam, H.G. (1997) Molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 200–207.
- Noodén, L.D. (1998) The phenomenon of senescence and aging. In *Senescence and Aging in Plants* (Noodén, L.D. and Leopold, A.C., eds). San Diego, CA: Academic Press, pp. 2–50.
- Oh, S.A., Park, J.H., Lee, G.I., Paek, K.H., Park, S.K. and Nam, H.G. (1997) Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**, 527–535.
- Quirino, B.F., Normanly, J. and Amasino, R.M. (1999) Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol. Biol.* **40**, 267–278.
- Quirino, B.F., Noh, Y.S., Himelblau, E. and Amasino, R.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* **5**, 278–282.
- Reilly, K., Gomez-Vasquez, R., Buschmann, H., Tohme, J. and Beeching, J.R. (2004) Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Mol. Biol.* **56**, 625–641.
- Sgarra, R., Lee, J., Tessari, M.A., Altamura, S., Spolaore, B., Giancotti, V., Bedford, M.T. 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.
- Smart, C.M. (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* **126**, 419–448.
- Strick, R. and Laemmli, U.K. (1995) SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell*, **83**, 1137–1148.
- Thanos, D. and Maniatis, T. (1992) The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell*, **71**, 777–789.

- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y. and Stütt, M.** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets on diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* **37**, 914–939.
- Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B. and Amasino, R.M.** (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* **37**, 455–469.
- Weigel, D., Ahn, J.H., Blazquez, M.A. et al.** (2000) Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**, 1003–1013.
- Woo, H.R., Chung, K.M., Park, J.H., Oh, S.A., Ahn, T., Hong, S.H., Jang, S.K. and Nam, H.G.** (2001) ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**, 1779–1790.
- Woo, H.R., Goh, C.H., Park, J.H., Teysseidier, B., Kim, J.H., Park, Y.I. and Nam, H.G.** (2002) Extended leaf longevity in the *ore4-1* mutant of *Arabidopsis* with a reduced expression of a plastid ribosomal protein gene. *Plant J.* **31**, 331–340.
- Xiong, Y., Contento, A.L. and Bassham, D.C.** (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **42**, 535–546.
- Yoshida, K., Nagano, Y., Murai, N. and Sasaki, Y.** (1993) Pytochrome-regulated expression of the genes encoding the small GTP-binding proteins in peas. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 6636–6640.
- Yoshida, S., Ito, M., Callis, J., Nishida, I. and Watanabe, A.** (2002) A delayed leaf senescence mutant is defective in arginyl-tRNA:protein arginyltransferase, a component of the N-end rule pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**, 129–137.
- Zheng, G. and Yang, Y.C.** (2004) ZNF76, a novel transcriptional repressor targeting TATA-binding protein, is modulated by sumoylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 42410–42421.

[부록 2] 특허출원(10-2007-0115458/KR2008/006679)

【요약서】

【요약】

본 발명은 식물체 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도를 개시한다.

【대표도】

도 1a

【색인어】

식물, 왜화, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드

【명세서】

【발명의 명칭】

식물 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도{Polypeptide Inducing Dwarfism of Plants, Polynucleotide Coding the Polypeptide, and Those Use}

【발명의 상세한 설명】

【기술분야】

본 발명은 식물 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도에 관한 것으로서, 구체적으로는 지베렐린 이화 작용에 관여하는 GA 2-oxidase 기능을 갖는 폴리펩티드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도에 관한 것이다.

【배경기술】

지베렐린은 tetracyclic diterpenoid계 식물 호르몬으로서 식물체 내에 수백 가지 형태로 존재하고 있으며, 이들 중 GA₁, GA₃, GA₄, 그리고 GA₇ 등과 같은 극히 몇몇 형태만이 활성(bioactive) 지베렐린으로 기능을 가진다. 이러한 활성 지베렐린은 종자 발아, 줄기 신장, 잎 팽창, 그리고 화기 및 종자 발달 등과 같은 다양한 식물 성장·발달 과정에 관여한다.

지베렐린은 diterpenoid에 대한 일반적인 C₂₀ 전구체인 GGDP(geranylgeranyl diphosphate)로부터 합성되는데, GGDP로부터 활성 지베렐린으로의 전환은 크게 3 단계로 나눌 수 있다.

첫 번째 단계는 GGDP로부터 *ent*-kaurene을 생산하는 cyclization 반응으로 *ent*-copalyl diphosphate synthase(CPS)와 *ent*-kaurene synthase(KS)에 의해 촉매된다. 이러한 반응은 CPS와 KS의 세포내 분포에 의거하여 아마 색소체에서 일어나는 것으로 알려져 있다(Sun and Kamiya, 1994; Helliwell et al., 2001). 두 번째 단계는 GA₁₂를 생성하기 위하여 cytochrome P450 monooxygenase(P450s)에 의한 *ent*-kaurene의 산화 과정으로, 이러한 반응은 색소체 막과 소포체에서 일어난다(Helliwell et al., 2001). 활성 지베렐린 합성의 마지막

단계는 GA₁₂의 활성 GA₄로의 전환으로 2가지 2-oxoglutarate dependent dioxygenases (2ODDs)에 의한 경로로 세분할 수 있다. 첫 번째는 GA 20-oxidase에 의한 GA₁₂에서 GA₉로의 전환이며, 두 번째는 GA 3-oxidase에 의한 GA₉에서 GA₄로의 전환이다. 흥미로운 점은 이러한 활성 지베렐린 생합성의 마지막 단계는 GA 20-oxidase와 GA 3-oxidase에 의한 활성 지베렐린의 합성뿐만 아니라 2ODDs의 다른 형태인 GA 2-oxidase에 의한 활성 지베렐린의 불활성화 과정인 지베렐린 이화 작용도 포함하고 있는 것이다. 최근의 연구 결과에 따르면 애기장대에서 이러한 GA 2-oxidase는 기질로서 C₁₉-GAs(지베렐린)를 사용하는 그룹과, C₂₀-GAs, 활성 지베렐린이 아닌 중간합성물을 기질로 사용하는 그룹으로 세분될 수 있다(Thomas et al., 1999; Schomburg et al., 2003).

한편 식물체의 왜화 현상은 일부 지베렐린 함량 혹은 시그널링(signaling)에 대한 결핍과 연관되어 있다고 보고되고 있다(Peng et al., 1999; Spielmeier et al., 2002). 그러므로 활성 지베렐린 생합성 혹은 이화 과정에 관여하는 효소의 활성을 억제하거나 촉진시킴으로써 식물의 왜화 현상을 유도할 수 있다.

식물의 왜화 현상 유도는 작물 육종 등에 있어서 매우 중요한데, 왜냐하면 작물의 왜화 현상 유도는 바람, 강우 등의 외부 스트레스에 저항성을 증가시켜 안정적인 수확량 증가를 가져올 수 있기 때문이다.

이러한 이유에서 식물 분야 생명공학 종사자들은 식물 왜화 유도 기능을 가지는 폴리펩티드나 폴리뉴클레오티드를 찾아내고자 노력하고 있다.

본 발명은 이러한 배경 하에서 완성된 것이다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명의 기술적 과제는 식물체 왜화 유도 기능을 가지는 폴리펩티드를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 기술적 과제는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 기술적 과제는 왜화 식물체의 제조방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 기술적 과제는 형질전환된 식물체의 선별방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 기술적 과제는 상기 방법에 의하여 얻어진 왜화 식물체를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 기술적 과제는 식물체 왜화 유도 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

【과제 해결 수단】

본 발명자(들)는 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, 지베렐린 이화 작용에 관여하는 GA 2-oxidase 기능을 가지는 단백질(GeneBank accession number NP

175233)의 염기서열을 기초로 하여 제작된 프라이머를 사용하여 애기장대로부터 전장 cDNA를 얻고, 나아가 위 cDNA의 염기서열 즉 서열번호 1에 기초하여 제작된 센스 뉴클레오티드를 애기장대에 형질전환시켜 본 결과, 뿌리의 발달과 개화 시기에 있어서는 야생형 애기장대와 차이가 없었지만 식물 줄기와 잎에 있어서는 왜화 현상이 유도된 애기장대가 얻어짐을 확인할 수 있었다.

또한 본 발명자(들)는 상기 왜화 현상이 유도된 변이체가 활성 지베렐린의 일종인 GA₃의 처리에 의해서 야생형 표현형을 회복함도 확인할 수 있었다.

본 발명은 위와 같은 실험 결과에 기초하여 제공되는 것이다.

일 측면에 있어서 본 발명은 식물체 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드에 관한 것이다.

본 발명은 식물체 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드는 하기 (a), (b) 및 (c)의 폴리펩티드들 중 하나이다.

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

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

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

본 명세서에서, "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교하였을 때 여전히 식물체 왜화 유도 기능을 보유하는 폴리펩티드로서 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로 정의된다. 여전히 식물체 왜화 유도 기능을 보유하면 되므로, 상기 폴리펩티드의 길이 그리고 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도는 문제되지 않는다. 즉 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 활성이 낮더라도, 여전히 식물체 왜화 유도 기능을 보유하는 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 식물체 왜화 유도 기능을 가질 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 해당 단백질의 활성에 있어 필수적인 모티프에 관여함으로써 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실된 폴리펩티드가 기대하는 활성을 나타내지 않는 경우가 있을 수 있겠지만, 그럼에

도 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 식물체 왜화 유도 기능을 가지는가를 분명히 확인할 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 명세서에 있어서 "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 식물체 왜화 유도 기능을 가지는 결실된 형태의 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미로서 이해되어야 한다.

또한 본 명세서에서, "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"란 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하지만, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 기능, 즉 식물체 왜화 유도 기능을 여전히 보유하는 폴리펩티드를 말한다. 여기서도 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 식물체 왜화 유도 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 식물체 왜화 유도 기능을 보유하지만 한다면 본 발명에 포함된다는 것이다. 하나 이상의 아미노산이 치환되더라도 치환되기 전의 아미노산이 치환된 아미노산과 화학적으로 등가라면, 그러한 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 여전히 본래의 폴리펩티드의 기능을 보유할 것이다. 예컨대, 소수성 아미노산인 알라닌이 다른 소수성의 아미노산, 예를 들면 글리신, 또는 보다 더 소수성인 아미노산, 예를 들면 발린, 류신 또는 이소류신으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드는 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 마찬가지로, 음으로 하전된 아미노산 예컨대, 글루탐산이 다른 음으로 하전된 아미노산, 예컨대 아스파르산으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드도 활성은 낮더라도 본래의

폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이며, 또한 양으로 하전된 아미노산, 예컨대 아르기닌이 다른 양으로 하전된 아미노산, 예컨대, 리신으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드 또한 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 또한 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 부분에서 치환된 아미노산(들)을 포함하는 폴리펩티드도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 당업자라면, 그 전술한 바의 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 식물체 왜화 유도 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 식물체 왜화 유도 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 식물체 왜화 유도 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 식물체 왜화 유도 기능을 가지는 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미이지만, 그럼에도 활성의 정도라는 관점에서 봤을 때는, 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 구체적으로는 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 대해서뿐만 아니라 '서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드'에 대해서도 적용된다.

본 발명은 다른 측면에 있어서, 전술한 바의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 대한 것이다.

여기서 "전술한 바의 폴리펩티드"란 식물의 왜화 유도 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. 아미노산 서열이 밝혀졌을 때, 그러한 아미노산 서열에 기초하여 그러한 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 당업자라면 용이하게 제조할 수 있다.

한편, 본 명세서에서 상기 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 화학적으로 합성된 폴리뉴클레오티드, 생물체 특히 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 분리된 폴리뉴클레오티드 및 변형된 뉴클레오티드를 함유한 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하며, 단일 가닥 또는 이중 가닥의 RNA 또는 DNA의 중합체를 모두 포함하는 것으로서 정의된다. 그러므로 상기 "단리된 폴리뉴클레오티드"란 cDNA를 포함하여 뉴클레오티드들을 화학적으로 중합시킨 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라, 나아가 생물체 특히 애기장대에서 분리되는 gDNA를 포함한다. 여기서, 본 명세서가 개시하고 있는 서열번호 2의 아미노산 서열, 이를 암호화하는 서열번호 1의 염기서열, 및 당업계에 공지된 기술 등에 기초하는 한, cDNA를 포함하여 상기 화학적 합성되는 폴리뉴클레오티드의 제조 및 상기 gDNA의 분리 등은 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속할 것이다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 왜화 식물체의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 왜화 식물체의 제조방법은 두 가지의 양태로 파악될 수 있다.

첫 번째 양태에 있어, 본 발명의 왜화 식물체의 제조방법은 (I) 식물체 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드를 암호화하는 전술한 바의 폴리뉴클레오티드를 식물체로 형질전환시키는 단계, 및 (II) 그 형질전환된 식물체 중에서 왜화 현상이 유도된 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 이루어진다.

하기 실시예에서 확인할 수 있듯이, 서열번호 1의 염기서열의 유전자가 애기장대에 도입되었을 애기장대의 줄기 및 잎에서 왜화 현상이 유도됨을 알 수 있다.

본 명세서에서, "왜화"란 식물의 생체량이 그 야생형 식물의 생체량에 비해 적은 것을 의미하며, 바람직하게는 식물 줄기의 생체량 및/또는 식물 잎의 생체량이 야생형의 식물의 그것(들)에 비하여 적은 것을 의미한다. 여기서 생체량이란 잎, 줄기 등 식물 기관의 무게, 길이 및/또는 크기를 의미하는 것으로 이해될 수 있다. 하지만, 본 명세서에서 명시한 "왜화" 현상은 식물의 뿌리 발달 및 종자 생산성을 포함하지 않는 것을 의미한다.

또한 본 명세서에서, "폴리뉴클레오티드"는 전술한 바의 본 발명의 폴리뉴클레오티드로서 식물체의 왜화

유도 기능을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 의미이다. 그러하기 때문에 상기 폴리뉴클레오티드는 상기에서 바람직한 양태로서 언급된 모든 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것으로서 이해되어야 한다. 그럼에도 바람직하게는 상기 폴리뉴클레오티드가 서열번호 2에 개시된 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드인 경우이고, 더 바람직하게는 서열번호 1에 개시된 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드인 경우이다.

또한 본 명세서에서, "식물체"이란 그 생체량이 적어짐으로써 인간에게 유용한 결과를 줄 수 있는 모든 식물을 포함하는 의미이다. 가장 직접적인 예로 농작물의 생장을 저해하는 각종 잡초 식물이나, 관상 목적의 분재 식물, 화훼 식물 등이 여기에 포함될 것이며, 인간이 식용으로 하고 있는 식물 등도 외부 스트레스(바람, 강우 등)에 대한 저항성, 식용의 간편성, 운반의 편리성 등의 이유로 상기 식물의 범위에 포함될 것이다. 구체적으로 상기 식물에는 경작지 등의 잡초 식물, 장미, 소나무, 잣나무, 대나무 등의 분재 식물, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼 식물, 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 사과, 당근, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나 등의 식용 식물, 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료용 식물 등이 포함될 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

또한 본 명세서에서 "식물체"는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직, 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.

또한 본 명세서에서, 상기 "형질전환"이란 왜래성 폴리뉴클레오티드(본 발명에서는 왜화 유도 기능을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 의미함; 이하 같음)가 도입됨에 의한 숙주 식물의 유전자형의 변형을 의미하며, 그 형질전환에 사용된 방법과 상관없이 외래성 폴리뉴클레오티드가 숙주 식물, 더 정확하게는 숙주 식물의 세포 내로 도입된 것을 의미한다. 숙주 식물 내로 도입된 외래성 폴리뉴클레오티드는 숙주 식물의 게놈 내로 통합되어 유지되거나 통합되지 않고 유지될 수 있는데, 본 발명은 양자 모두를 포함한다.

한편, 외래성 폴리뉴클레오티드로 식물을 형질전환시키는 방법은 당업계에 일반적으로 공지된 방법(Methods of Enzymology, Vol. 153, 1987, Wu and Grossman 편집, Academic Press)을 사용할 수 있다.

왜래성 폴리뉴클레오티드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물을 형질전환시킬 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며(Chilton 등, 1977, Cell 11:263:271), 직접 왜래성 폴리뉴클레오티드를 식물 세

포 내로 도입시켜 식물을 형질전환시킬 수 있다(Lorz 등, 1985, Mol. Genet. 199:178-182).

일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이 왜래성 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 아그로박테리움 투메페이스언스 (*Agrobacterium tumefaciens*)로 유식물체, 식물 세포, 종자 등을 감염시키는 방법이다. 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 유식물체, 식물 세포, 종자 등을 배양 또는 재배하여 성숙한 식물로 성장·발육시킬 수 있다.

한편, 상기 (I)의 형질전환시키는 단계는, (a) 식물체의 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 조절 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계, 및 (b) 이러한 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 형질전환 식물체를 만드는 단계를 포함하여 이루어지는 것이 바람직하다.

더 바람직하게는 상기 (I)의 형질전환시키는 단계는, 식물체 왜화 유도 기능을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 조절 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계, 이러한 재조합 발현벡터를 아그로박테리움 박테리아에 형질전환시키는 단계, 및 이러한 형질전환된 아그로박테리움 박테리아로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하여 이루어지는 것이 바람직하다. 특히, 상기 형질전환된 아그로박테리움 박테리아는 형질전환된 아그로박테리움 투메페이스언스인 것이 바람직하다.

상기 "조절 뉴클레오티드 서열"이란 그 존재가 그에 연결된 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있는 모든 서열을 포함하는 의미로서 이해된다. 이러한 조절 뉴클레오티드 서열은 리더 서열, 인핸서 서열, 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 전사종결 서열 등을 포함한다.

프로모터 서열은 유도성 프로모터 서열(inducible promoter sequence)와 구조성 프로모터(constitutive promoter sequence) 모두 사용가능하다. 구조성 프로모터로는 예컨대 CaMV 프로모터, Nos 프로모터 등을 들 수 있고, 유도성 프로모터(유도 인자의 존재로 인하여 그에 연결된 유전자의 발현이 활발해지는 것을 가능하게 하는 프로모터)로서는, 예컨대, 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 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) 및 옥토펜 신타제(OCS) 프로모터, 열 충격 프로모터(Gurley 등, Mol. Cell. Biol., 6:559, 1986; Severin 등,

Plant Mol. Biol., 15:827, 1990) 등을 들 수 있다.

한편, 상기 재조합 벡터는 선별 마커 유전자를 포함할 수 있다. 여기서 "마커 유전자"란 그러한 마커 유전자를 포함하는 식물 또는 식물 세포의 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.

한편, 본 발명의 실시예에서는 서열번호 1에 개시된 염기서열로 이루어진 유전자를 발현벡터 pSEN 벡터에 삽입시켜 재조합 벡터 pSEN-AtGA2ox4를 제작한 다음 상기 재조합 벡터를 아그로박테리움 투메페이시엔스에 형질전환시키고 그 형질 전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스를 애기장대에 형질전환시켰다.

이러한 본 발명의 실시 양태를 고려할 때, 상기 (I) 단계는, 서열번호 1에 개시된 염기서열로 이루어진 유전자를 식물에 형질전환시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 특히 pSEN-AtGA2ox4를 식물에 형질전환시키는 단계를 포함할 때이다. 가장 바람직하게는 상기 재조합 벡터 특히 pSEN-AtGA2ox4로 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스를 식물에 형질전환시키는 단계를 포함할 때이다.

한편, 상기 (II) 선별 단계는 (I) 단계의 형질전환된 식물체를 성장·발육시켜 육안으로 선별하거나 (I) 단계의 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있다.

두 번째 양태에 있어, 본 발명의 왜화 식물체의 제조방법은, (I) 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자를 과발현시키는 단계, 및 (II) 왜화 현상이 유발된 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 이루어진다.

본 명세서에서 "서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자"란 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자의 동족체(homologue)로서 식물의 왜화 현상을 유발하는 기능을 지니면서, 식물의 종류에 따른 진화적 경로의 상이로 인하여 서열번호 1의 염기서열과 다른 염기서열로 이루어진 모든 유전자를 포함하는 의미이다. 여기서 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 서열 상동성이 높을수록 바람직하고, 가장 바람직하게는 당연히 100%의 서열상동성을 지닐 때이다. 한편, 서열 상동성의 하한에 있어서는 상기 유전자가 서열번호 1의 염기서열과 60% 이상의 서열 상동성을 지니는 경우가 바람직할 것이다. 보다 더 구체적으로는 위 서열 상동성이 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%,

78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 99.6 %의 순서대로 높아질수록 바람직하다.

또한 본 명세서에서, "과발현"이란 야생형 식물체에서 발현되는 수준 이상의 발현을 의미한다.

상기 (I) 단계의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자를 과발현시키는 단계는 화학적으로 또는 상기 첫 번째 양태에서 설명한 바와 같이 유전공학적으로 이루어질 수 있다. 그러므로 본 발명의 왜화 식물체의 제조방법에 있어서, 상기 (I) 단계는 화학물질을 사용하여 서열번호 1에 개시된 염기서열 또는 그와 유사한 서열로 이루어진 유전자를 과발현시키는 방법과 유전공학적으로 서열번호 1에 개시된 염기서열 또는 그와 유사한 서열로 이루어진 유전자를 과발현시키는 방법 모두를 포함한다.

상기 (II) 선별 단계는 육안으로 또는 (I) 단계에서 선별 마커 유전자가 형질전환된 경우에는 그 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 전술한 바의 왜화 식물체의 제조방법에 의하여 얻어진 왜화 식물체에 관한 것이다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 전술한 바의 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 마커 유전자로 사용하여 형질전환된 식물체를 선별하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 형질전환된 식물체의 선별 방법은 (I) 목적유전자, 식물체 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드를 암호화하는 전술한 바의 폴리뉴클레오티드 및 조절 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계, (II) 왜화 현상이 유발된 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.

본 명세서에서 "목적유전자"란 발현시키고자 하는 유전자로서 목적하는 생성물(즉 RNA나 폴리펩티드)을 암호화하는 일정 길이의 폴리뉴클레오티드 서열로서 정의될 수 있는데, 이러한 폴리뉴클레오티드 서열은 절단된 형태, 융합된 형태, 태그된 형태일 수 있으며, cDNA 또는 gDNA일 수 있고, 천연 형태의 생성물을 암호화하는 서열이거나 원하는 돌연변이 형태의 생성물을 암호화하는 서열일 수 있다.

상기 (I) 발현벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계는 그 발현벡터를 아그로박테리움 박테리아에 형질전환시키는 단계, 및 이러한 형질전환된 아그로박테리움 박테리아로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하여 이루어질 수 있다. 여기서 아그로박테리움 박테리아는 아그로박테리움 튜머파시엔스인 것이 바람직하다.

한편 필요하다면 하기 실시예에서 확인되듯이 왜화 현상이 유발된 식물체의 표현형을 GA₃를 처리하여 회복시킬 수 있다.

기타 본 발명의 형질전환된 식물체의 선별 방법에 대해서는 본 발명의 왜화 식물체의 제조방법과 관련하여 설명한 바가 그대로 유효하다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체 왜화

유도 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

상기 방법은 (I) 식물체에 임의의 화학 물질 또는 생물학적 물질을 처리하는 단계 및 (II) 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자를 과발현시키는 물질을 검출하는 단계를 포함하여 이루어진다.

상기 "서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자"는 상기 본 발명의 왜화 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.

상기 (I) 식물체에 임의의 화학 물질 또는 생물학적 물질을 처리하는 단계에서, 화학 물질의 처리는 식물체에 화학 물질이 접촉되도록 처리하면 되고, 생물학적 물질의 처리는 상기 본 발명의 왜화 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 것처럼, 유전공학적 방법으로 처리하면 된다.

한편, 상기 검출된 물질로서는 서열번호 1의 염기서열의 센스 뉴클레오티드, 상기 센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 그 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스 등을 들 수 있다.

【효과】

전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물체 왜화 유도 기능을 가지는 폴리펩티드 및 그러한 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공할 수 있다.

또한 본 발명에 따르면, 왜화 식물체의 제조 방법과 그 방법에 의하여 얻어진 왜화 식물체와 식물체 왜화 유도 물질의 스크리닝 방법 등을 제공할 수 있다.

【발명의 실시를 위한 구체적인 내용】

이하, 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 이러한 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

<실시예 1> 애기장대로부터 식물체 왜화 유도 기능을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 분리

식물체 왜화 유도 기능을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다.

<실시예 1-1> 애기장대의 재배 및 배양

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°C의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 성장 조절기(growth chambers)내에서 재배하였다.

<실시예 1-2> RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

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

합성하였다.

<실시예 1-3> 식물체 왜화 유도 기능을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자 분리

애기장대의 GA 2-oxidase family에서 기질로 C₁₉-GAs(지베렐린)을 사용하는 효소 중 AtGA2ox4로 알려진 단백질(GeneBank accession number NP 175233)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 BamHI의 서열이 포함된 정방향 프라이머와, 서열번호 4로 표시되고 제한효소 BstEII의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 상기 <실시예 1-2>에서 제조된 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 35.9 kDa의 분자량을 갖는 서열번호 2의 321개의 아미노산을 암호화하는 966bp 크기의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 3 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, 이는 AtGA2ox4(*Arabidopsis thaliana* GA 2-oxidase 4)로 명명되었다. 상기 유전자가 암호화하는 AtGA2ox4 단백질의 등전점(isoelectric point)은 6.72로 나타났다(이하 유전자는 이텔릭체를 사용하여 "AtGA2ox4" 혹은 "AtGA2ox4 유전자"라 하고, 단백질은 "AtGA2ox4" 혹은 "AtGA2ox4 단백질"이라고 한다).

한편, 상기 단백질은 지베렐린 이화 작용에 있어서 GA 2-oxidase 효소 기능을 가진다고 제안되고 있기 때문에 본 발명에서는 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 직접적으로 지베렐린 이화 작용에 있어서 GA 2-oxidase 관련 기능을 가지는 지를 애기장대 변이체 제작 등을 통하여 조사하였다.

<실시예 2> AtGA2ox4 유전자에 대한 센스 그리고 안티센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 특성 분석

<실시예 2-1> AtGA2ox4 유전자에 대한 센스 그리고 안티센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

상기 유전자가 식물체 왜화 현상을 유발하는 지를 확인하기 위하여 AtGA2ox4 유전자가 센스 그리고 안티센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 AtGA2ox4 전사체의 발현을 변화시켰다.

서열번호 3로 표시되고 제한효소 BamHI의 서열이 포함된 정방향 프라이머, 및 서열번호 4으로 표시되고 제한효소 BstEII의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 AtGA2ox4 cDNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 BamHI과 BstEII로 절단하고, inducible promoter인 senI 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 AtGA2ox4 유전자에 대한 센스 구성체인 pSEN-AtGA2ox4 재조합 벡터를 제작하였다.

또한 서열 번호 5로 표시되고 제한효소 BstEII의 서열이 포함된 정방향 프라이머, 및 서열번호 6으로 표

시되고 제한효소 *Bam*HI의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 *AtGA2ox4* cDNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *Bam*HI과 *Bst*EII로 절단하고, inducible promoter인 *sen1* 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pSEN 벡터에 안티센스 방향으로 클로닝하여 *AtGA2ox4* 유전자에 대한 안티센스 구성체인 pSEN-anti*AtGA2ox4* 재조합 벡터를 제작하였다. 상기에서 *sen1* 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다. 한편, 도 1a, 1b, 그리고 1c는 각각 pSEN 벡터와 pSEN-*AtGA2ox4*, 그리고 pSEN-anti*AtGA2ox4* 재조합 벡터의 구성을 도시한 그림이다. 도 1a에 도시된 것은 pSEN 벡터의 구성이고, 도 1b는 pSEN 벡터에 *AtGA2ox4* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pSEN-*AtGA2ox4* 재조합 벡터, 그리고 1c에 도시된 것은 pSEN 벡터에 *AtGA2ox4* 유전자가 안티센스 방향으로 도입된 pSEN-anti*AtGA2ox4* 재조합 벡터의 구성이다. 도 1a, 1b, 그리고 1c에서 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 RNA의 프로모터, 35S poly A는 CaMV 35S RNA poly A, PSEN은 *sen1* 프로모터, Nos polyA는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를 가리킨다.

상기 pSEN-*AtGA2ox4*와 pSEN-anti*AtGA2ox4* 재조합 벡터를 각각 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션(electroporation)방법을 이용하여 도입시켰다. 각각 형질 전환된 아그로박테리움 배양액을 28°C에서 O.D.₆₀₀ 값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25°C에서 5,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 최종 O.D.₆₀₀ 값이 2.0이 될 때까지 Infiltration Medium(IM; 1X MS SALTS, 1X B5 vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77, Lehle Seed, USA) 배지에 현탁하였다. 4주 된 애기장대를 진공 챔버(vacuum chamber)에 있는 각각의 아그로박테리움 현탁액에 침지시키고, 10분 동안 10⁴ Pa의 진공 하에 두었다. 침지 후, 애기장대를 24시간 동안 폴리에틸렌 백(polyethylene bag)에 두었다. 이후, 각각 형질 전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T₁)를 수확하였다. 대조군으로는 형질 전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *AtGA2ox4* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pSEN 벡터)만으로 형질 전환된 애기장대를 사용하였다.

<실시에 2-2> T₁과 T₂ 형질 전환 애기장대의 특성 분석

상기 <실시에 2-1>에서와 같이 형질 전환한 애기장대에서 수확한 종자는 0.1% 바스타(Basta) 제초제(경농, 한국) 용액에서 30분 동안 침지시키고 배양함으로써 선별하였다. 이후 형질 전환한 애기장대의 생육 동안 상기 화분에 바스타 제초제를 5회 처리한 후, 각 화분에서의 애기장대 성장 양상을 조사하였다. pSEN-*AtGA2ox4* 벡터로 형질 전환된 T₁ 애기장대는 대조군(*AtGA2ox4* 유전자

가 포함되지 않은 벡터(pSEN 벡터)만으로 형질 전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)과 비교하여 볼 때, 놀랍게도 식물의 전 기관에 걸쳐 왜화 현상이 유도되었으며, 형질 전환 개체에서 이러한 왜화 현상의 정도의 차이는 유전자의 과발현이 개체마다 다르게 나타남에 기인하는 것으로 판단된다. 한편 pSEN-anti*AtGA2ox4* 벡터로 형질 전환된 T₁ 애기장대는 대조군과 비교하여 볼 때, 크게 표현형 변화가 유발되지 않았다. 이러한 형질 전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질 전환 애기장대로부터 T₂ 형질 전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 우선, T₂ 형질 전환 애기장대를 3일 동안 저온 처리(4°C)한 T₂ 형질 전환 종자를 화분에서 재배한 후 바스타 제초제 처리를 통하여 형질 전환 애기장대를 선별하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질 전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 30일째(도 2a), 그리고 48일째(도 2b) 수행하였다. pSEN-*AtGA2ox4* 구성체를 가지고 있는 *SEN::AtGA2ox4-10* 변이체 라인은 Col-O(애기장대 야생형)과 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 잎과 줄기 등 대부분의 기관에서 왜화 현상이 유도되었으며, 이러한 왜화 현상은 개체마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 유전자의 과발현이 개체마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 그러나 뿌리 발달에 있어선 야생형과 비교해 보았을 때, 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 또한 식물의 개화 시기에 있어서도 야생형과 큰 차이가 없음을 관찰할 수 있었다(도 2c 참조). 이와 같은 변이체의 왜화 현상은 C₁₉-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 *AtGA2ox4*의 과발현으로 인해 활성 지베렐린의 불활성 지베렐린으로의 전환으로 인하여 활성 지베렐린의 함량 부족에 기인하는 것으로 추측된다. 한편 pSEN-anti*AtGA2ox4* 구성체를 가지고 있는 *atga2ox4-4* 변이체 라인은 애기장대 야생형과 비교하여 볼 때, 전체적으로 약간 길고 가느다란 표현형을 가지고 있으며, 줄기가 조금 더 신장된 것으로 나타났다. 그러나 전체적으로 볼 때 *atga2ox4-4* 변이체 라인의 표현형은 애기장대 야생형 표현형과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(도 2 참조). 이와 같은 현상은 *AtGA2ox4* 유전자의 발현 억제가 야기한 활성 지베렐린의 함량 증가가 GA 20-oxidase와 GA 3-oxidase의 feedback 메카니즘에 의하여 조절됨으로써 변이체의 표현형 변이가 크게 유발되지 않는 것으로 추측된다. 본 명세서에서 보다 흥미로운 점은 왜화 현상이 유발되는 *atga2ox4* 변이체 라인의 종자 생산성은 야생형에 비하여 오히려 증가하고 있다는 사실이다. 도 2d에서 보는 바와 같이, pSEN-*AtGA2ox4* 구성체를 가지고 있는 *SEN::AtGA2ox4-10* 변이체 라인은 Col-O(애기장대 야생형)과 비교하여 볼 때 종자 생산성에 있어서 오히려 증가하는 현상을 보였으며 이러한 증가 현상은 *AtGA2ox4* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 왜화 현상은 타 작물의 생산성 증대에 적용할 수 있는 중요한 요인으로 작용할 수 있을 것을 확실할 수 있을 것이다.

<실시에 2-3> *SEN::AtGA2ox4* 변이체에서 애기장대 GA

2-oxidase 관련 및 개화 관련 유전자의 발현 조사

왜화 표현형을 가지는 *SEN::AtGA2ox4* 변이체의 GA 2-oxidase 관련 유전자와 개화 관련 유전자 및 **지베렐린 대사작용의 feedback mechanism에 작용하는 관련 유전자의 발현 양상**을 분석하기 위하여 발아 후 30일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *SEN::AtGA2ox4* 변이체의 꽃, 뿌리, 줄기, 잎, 그리고 silique으로 부터 RNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하여 전체 RNA를 각각 추출하였다. 각각 1 μ 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 표 1에 기재된 다양한 GA 2-oxidase 유전자 및 개화 관련 유전자들에 대해 특이적인 프라이머를 이용하여 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 1분 을 한 싸이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 최종 반응시켜 수행하였다. 이후, 1% 아가로스 겔 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였으며, 그 결과는 도 3a에 도시되었다.

먼저 *AtGA2ox4* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 발아 후 30일 동안 생육한 애기장대 야생형에서는 꽃, 뿌리, 줄기, 그리고 silique에서 유전자 발현이 나타난 반면, 잎에서는 유전자의 발현의 거의 나타나지 않았다. 그리고 유전자의 발현 정도를 관찰해 보면 줄기에서의 발현이 꽃, 뿌리, 그리고 silique에서의 그것 보다 약하다는 것을 알 수 있다. 이러한 사실을 통하여 본 유전자의 작용이 정상적인 식물에서는 source 기관인 잎에서는 거의 이루어지지 않고 이동 기관인 줄기를 포함하여 꽃, 뿌리, 그리고 silique 등과 같은 sink 기관에서 주로 이루어지고 있을 것으로 추측된다. 한편 *SEN::AtGA2ox4* 변이체의 경우, 야생형에 비하여 모든 기관에서 유전자의 발현이 증가하였으며, 특히 잎에서는 야생형에서는 거의 발현이 되지 않는데 비하여 변이체에서는 엄청난 유전자 발현 정도를 나타내었다. 이러한 사실로 미루어 보아 식물체에서 pSEN-AtGA2ox4 구성체를 통한 *AtGA2ox4*의 과발현 기작은 source 기관인 잎에서 일어나며, 이러한 잎에서의 유전자 과발현 기작을 통하여 주로 잎에서 다양한 대사 작용이 유도 되어 식물의 왜화 현상을 유발하는 것으로 추측된다.

*AtGA2ox4*의 과발현에 의한 애기장대 GA 2-oxidase 관련 유전자의 발현 양상을 비교해 보면 다음과 같다. C₁₉-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 유전자 집단에서 전 기관에서 발현되는 *AtGA2ox2*와 *AtGA2ox6*의 발현은 야생형과 변이체 사이에서 큰 차이를 나타내지 않았으나, *AtGA2ox2*의 경우 잎에서의 발현은 변이체에서 조금 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 뿌리에서 발현이 거의 없는 *AtGA2ox1*의 경우 야생형과 변이체를 비교하였을 때, 변이체에서 잎과 줄기에서 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 잎에서 발현이 거의 없는 *AtGA2ox3*의 경우 줄기에서 발현이 감소하는 것을 알 수 있었다. 한편 C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는

유전자 집단에서 *AtGA2ox7*의 경우 꽃과 뿌리에서 특이적으로 발현되며, *AtGA2ox8*의 경우 꽃과 뿌리에서 발현의 정도가 높은 반면 줄기와 silique에서는 상대적으로 발현의 정도가 낮았다. 이러한 유전자의 발현은 *AtGA2ox4*와 마찬가지로 잎에서는 거의 나타나지 않았다. 이러한 유전자에 대한 발현 정도를 야생형과 변이체를 비교하였을 때, *AtGA2ox7*의 경우 변이체에서 뿌리에서의 발현 증가를 유발되었으며, *AtGA2ox8*의 경우 *AtGA2ox7*와 마찬가지로 변이체에서 뿌리에서의 발현 증가 현상이 나타났으며, 특이한 점은 줄기에서의 발현은 변이체에선 감소 현상이 유발된다는 것이다. C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 과발현은 애기장대에서 본 유전자인 *AtGA2ox8*와 마찬가지로 왜화 현상을 유발한다고 알려져 있다(Schomburg et al., 2003). 상기 연구 결과를 분석해 보면 C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 과발현은 주로 sink 기관인 뿌리에서 다양한 대사 작용을 유발하여 왜화 현상을 유발하는 반면, C₁₉-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 본 유전자인 *AtGA2ox4*의 과발현은 주로 source 기관인 잎에서 다양한 대사 작용을 유도하여 왜화 현상을 유발하는 것으로 제안할 수 있을 것이다. 그리고 C₂₀-GAs(지베렐린)을 기질로 사용하는 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 발현은 직접적이든, 간접적이든 *AtGA2ox4*의 발현에 의해 조절을 받을 것으로 추측되며, 이러한 제안은 식물체의 왜화 현상 유도가 본 유전자에 의해 단독적으로 일어나는지 아니면 본 유전자와 *AtGA2ox7*과 *AtGA2ox8*의 상호 작용의 의해 일어나는지에 대해 보다 많은 연구를 필요로 할 것이다.

한편 본 유전자가 지베렐린 대사 작용에 있어서 feedback mechanism에 관여하고 최종적으로 지베렐린 이화 작용에 관여하는지를 확인하기 위하여 *SEN::AtGA2ox4* 변이체에서 GA20-oxidase를 coding하는 *AtGA20ox1*과 *AtGA20ox2*, 그리고 GA3-oxidase를 coding하는 *AtGA3ox1*에 대한 유전자 발현을 조사하였다. 도 3b에서 보는 바와 같이 *SEN::AtGA2ox4* 변이체는 야생형에 비하여 이들 유전자에 대한 발현이 모두 증가하였으며, 세부적으로 조사해 보았을 때, 특히 잎에서의 상기 유전자의 발현이 모두 증가되었으며, 이러한 유전자 발현은 모두 GA3가 처리되었을 때 야생형의 유전자 발현 수준으로 회복됨을 알 수 있었다. 이러한 현상을 분석해 보면, *AtGA2ox4*의 과발현은 식물체내 지베렐린 함량 부족 현상을 유발하고, 이와 같은 활성 지베렐린 함량 부족은 지베렐린 합성 유전자의 발현을 유도하는 것으로 확인할 수 있었다. 따라서 본 유전자가 지베렐린 이화 작용에 관여함을 알 수 있었으며, 본 유전자에 의한 활성 지베렐린 함량 부족은 지베렐린 합성 유전자의 발현을 유도하는 것으로 사료된다. 또한 이와 같은 유전자 발현 조절의 대부분이 잎에서 이루어 지는 것으로 추측된다.

[표 1]

GA 2-oxidase 및 개화 조절 관련 유전자들의 프라이머

서열번호

No.	유전자명	정방향/역방향 프라이머의 서열번호
1	<i>AtGA2ox1</i>	서열번호 7/서열번호 8
2	<i>AtGA2ox2</i>	서열번호 9/서열번호 10
3	<i>AtGA2ox3</i>	서열번호 11/서열번호 12
4	<i>AtGA2ox4</i>	서열번호 13/서열번호 14
5	<i>AtGA2ox6</i>	서열번호 15/서열번호 16
6	<i>AtGA2ox7</i>	서열번호 17/서열번호 18
7	<i>AtGA2ox8</i>	서열번호 19/서열번호 20
8	<i>FT</i>	서열번호 21/서열번호 22
9	<i>CO</i>	서열번호 23/서열번호 24
10	Tubulin(양성대조구)	서열번호 25/서열번호 26

<실시예 3> GA₃ 처리에 의한 SEN::*AtGA2ox4* 변이체의 표현형 회복

앞서 언급한 바와 같이 *AtGA2ox4* 유전자가 지베렐린 이화 작용에 관여하는 GA 2-oxidase 효소 기능을 가진다고 제안됨에 따라, 실질적으로 *AtGA2ox4* 유전자가 지베렐린 이화 작용에 관여하는 지를 확인하기 위하여 왜화 현상 표현형을 가지는 SEN::*AtGA2ox4-9*와 SEN::*AtGA2ox4-10* 라인을 재료로 하여 10⁻⁴ M GA₃(Sigma, USA)의 농도로 발아 후 12일부터 1주일 간격으로 총 2회 시비하여 총 30일 동안 생육하였다. 이와 같은 활성 지베렐린인 GA₃의 처리는 *AtGA2ox4* 유전자의 과발현으로 인하여 활성 지베렐린의 함량 감소를 유발하여 생성된 왜화 표현형 변이체의 활성 지베렐린의 함량 회복을 통하여 애기장대 야생형과 같은 표현형의 회복을 유발할 것이다. GA₃를 처리한 왜화 변이체와 처리하지 않은 변이체를 비교해 보았을 때(도 4 a, b, c참조), GA₃를 처리하지 않은 변이체 라인들의 표현형은 앞서 언급한 바와 같이 왜화 현상 표현형을 나타내었으며 유전자 발현 정도의 차이에 따라 왜화 현상의 차이를 가지고 있었다. 그런 반면 GA₃를 처리한 SEN::*AtGA2ox4-9*와 SEN::*AtGA2ox4-10* 라인의 표현은 놀랍게도 거의 야생형 수준으로 표현형이 완벽하게 회복됨을 볼 수 있었다. 심지어 왜화 현상이 심하게 나타나는 SEN::*AtGA2ox4-10* 라인도 GA₃의 처리로 인하여 거의 야생형과 같은 표현형 회복을 나타내었다. 한편 본 유전자의 과발현으로 인한 왜화 표현형을 가진 변이체들은 개화 시기에 있어서 야생형과 큰 차이가 없었으며, 이러한 현상은 GA₃를 처리한 변이체에서도 야생형과 큰 차이를 가지지 않았다. 이러한 사실로 미루어 보아 본 유전자는 식물의 왜화 현상 조절에 중요한 역할을 담당하는 반면 개화 시기 조절에 있어서 그 역할이 크지 않은 것으로 추측된다. 따라서 상기 *AtGA2ox4* 유전자에 대한 센스 구성체로 형질전환된 식물체가 GA₃ 요구 돌연변이체임을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 유전자의 폴리뉴클레오티드가 개화시기 조절이 필요치 않고 왜화 현상만을 요구하는 신기능성 작물 개발을 위한 좋은 표적이 될 수 있음을 시사한다.

<실시예 4> SEN::*AtGA2ox4* 변이체의 단백질체 분석

상기에서 언급한 바와 같이 *AtGA2ox4*의 과발현은 잎에서의 특이적 발현 증가로 인하여 식물체의 왜화 형질을 유발한다고 제안되었다. 이러한 사실을 단백질 수준에서 확인하기 위하여 발아 후 30일 동안 생육한 애기장대 야생형(도 5a)과 SEN::*AtGA2ox4* 변이체(도

5b), 그리고 GA₃ 처리에 표현형 회복이 일어난 SEN::*AtGA2ox4* 변이체(도 5c)로부터 각각 단백질을 분리하여 이차원 전기영동을 통하여 단백질 발현 양상을 조사하였다. 각 식물체로부터 단백질 추출은 다음과 같이 진행되었다. 식물은 10배 부피의 7M urea, 2M Thiourea, 4%(w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1%(w/v) dithiothreitol(DTT), 2%(v/v) pharmalyte, 1mM benzamidine로 구성된 시료용액과 혼합되어 분쇄기에 의해 분쇄되었다. 그리고 단백질을 추출을 위해서 10분 동안 100℃에서 가열하였으며, 이후 15,000rpm으로 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 이차원전기영동의 시료로 사용하였다. 단백질의 농도 측정은 Bradford 법으로 수행하였다(Bradford et al., 1976). 일차 Isoelectric focusing(IEF)를 위하여 IPG strips은 7M urea, 2M thiourea, 2% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1% dithiothreitol (DTT), 1% pharmalyte로 구성된 reswelling 용액으로 상온에서 12-16시간 정도 reswelling 되었다. Strip 당 시료는 각각 200ug씩을 사용하였으며, Amersham Biosciences 사의 Multiphore II system을 이용하여 제조회사의 사용 매뉴얼을 준수하여 20℃에서 IEF를 수행하였다. IEF 조건은 150V에서 3,500V까지의 도달시간을 3시간 되게 하였으며, 3,500V에서 26시간 지속되도록 하여 최종적으로 96kVh가 되도록 설정하였다. 이차적으로 SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG Strips을 1% DTT를 함유한 equilibration buffer(50mM Tris-Cl, pH6.8, 6M urea, 2% SDS, 30% glycerol)로 10분간 incubation 하였으며, 곧바로 2.5% iodoacetamide를 함유한 equilibration buffer로 10분간 더 incubation 하였다. Equilibration이 완료된 strips을 SDS-PAGE gels(20x24cm, 10-16%) 위에 배열시키고, Hoefer DALT 2D system(Amersham Biosciences)을 이용하여 20℃에서 최종적으로 1.7kVh가 되게 전개하였다. 이차원전기영동이 완료된 이차원 젤의 단백질은 Oakley(Anal. Biochem. 1980, 105:361-363) 등의 방법에 따라 은염색으로 시각화되었으며, 질량분석기에 의한 단백질 동정을 위하여 glutaraldehyde 처리 단계는 생략되었다. 은염색된 이차원 젤은 AGFA 사의 Duoscan T1200 스캐너로 스캐닝되었다. 스캐닝된 이미지로부터 단백질 spots의 발현변화 확인을 위한 정량적인 분석은 PDQuest software(version 7.0, BioRad)를 이용하여 수행하였다. 각 spot의 quantity는 total valid spots의 intensity로 평준화(normalization)되었다. 선별된 단백질 spots은 Shevchenko 등의 방법(1996)에 따라 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 효소적으로 분해되었다. 젤 조각으로부터 SDS, 유기용매, 염색시약 등의 불순물을 제거하기 위하여 50% acetonitrile로 세척하였다. 그 다음, trypsin(8-10ng/μl)으로 reswelling 하고 8-10시간 동안 37℃에서 incubation 하였다. 단백질 분해반응은 5μl 0.5% trifluoroacetic acid의 첨가에 의해 종결되었다. Trypsin에 의해 잘려진 단백질 단편들은 수용액 상태로 회수되었고, C18ZipTips(Millipore)을 이용하여 1-5μl 부

피로 탈염 및 농축되었다. 이 농축액은 동량의 50% aqueous acetonitrile에 포화된 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid와 혼합되었고, 질량분석을 위하여 target plate 위에 적하되었다. 질량분석기는 ETTAN MALDI-TOF (Amersham Biosciences)를 사용하였다. Target plate 상에 적하되어 있는 단백질 단편들은 337nm의 N2 laser 조사에 의해 기화된 다음, 20Kv injection pulse에 의해 가속되었다. 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. Mass spectrum의 분석을 위해서 trypsin의 자가분해에 의해 생성된 펩타이드의 ion peak m/z(842.510, 2211.1046)를 표준 peaks로 이용하였다. 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 ProFound 검색 엔진 (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)을 이용하였다.

표 2는 애기장대에서 *AtGA2ox4* 유전자의 과발현에 의해 up-regulation되고 GA₃ 처리에 의해 단백질의 발현이 야생형의 수준으로 회복된 단백질에 대한 분석 결과이다. 흥미롭게도 본 연구에서 *AtGA2ox4* 유전자의 과발현에 의해 down-regulation된 단백질들은 거의 찾아볼 수 없었다. 표 2의 결과에서 보듯이, 무엇보다 흥미로운 점은 *AtGA2ox4* 유전자의 과발현이 상당히 많은 엽록체 타겟 단백질의 발현 증가를 유발한다는 점이다. 본 연구에서 분석된 단백질 그룹 중 50% 이상의 단백질이 엽록체 타겟 단백질인 것으로 나타났으며, 나머지 단백질은 세포질과 다른 세포 소기관 타겟 단백질인 것으로 밝혀졌다. 이러한 사실은 앞서 언급한 *SEN::AtGA2ox4* 변이체에서 *AtGA2ox4* 유전자의 잎 기관에서의 특이적 발현 증가와 밀접한 연관이 있는 것으로 나타났다. 따라서 *AtGA2ox4* 유전자의 잎 기관에서의 특이적 발현 증가는 왜화 현상 유도와 관련된 여러 엽록체 타겟 단백질들의 발현 증가를 유도하는 것으로 추측할 수 있다. 그리고 지베렐린 신호 전달과 관련된 단백질의 발현 증가 및 내외재적 환경 변화에 따른 단백질의 발현 증가 등이 세포질 혹은 다른 세포 소기관에서 주로 이루어졌다. 이러한 사실은 *AtGA2ox4* 유전자는 source 기관인 잎의 엽록체 타겟 단백질의 발현 조절을 유도하고, 이를 통하여 최종적으로 simk 기관에서 형질이 나타나게 되어 식물의 왜화 현상이 조절되는 것으로 추측된다.

[표 2]

*AtGA2ox4*의 과발현에 의해 up-regulation되고 GA₃ 처리에 의해 발현 양상이 회복되는 단백질 분석

Spot No.	MW	Arabidopsis protein Name	Locus Tag
Chloroplast target proteins			
14	25.92	LHCb6 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII); chlorophyll binding	
15	22.30	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	
303	43.09	SBPase (sedoheptulose-bisphosphatase); phosphoric ester hydrolase	AT3G5800
401	48.75	RPS1 (ribosomal protein S1); RNA binding	AT5G30510
408	46.25	CHL1 (CHLORINA 42); magnesium chelatase	AT4G18480
524	54.07	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit N-methyltransferase, putative	
1004	23.48	LHC44 (Photosystem I light harvesting complex gene 4); chlorophyll binding	
1115	31.24	chlorophyll a/b binding protein (LHCP AB 180)	
1715	72.57	ABC1 (family) protein	AT4G31390
2101	32.37	CA1 (CARBONIC ANHYDRASE 1); carbonate dehydratase/zinc ion binding	
2103*	26.59	ATFER1 (ferritin 1); ferric iron binding	AT5G01600
2409	45.98	3-isopropylmalate dehydrogenase, chloroplast, putative	AT3G14200
2507	50.73	ADP1 (ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHATYLASE SMALL SUBUNIT 1); glucose-1-phosphate adenyltransferase	AT5G48300
2604	59.62	ATP synthase CF1 alpha subunit	
2701	64.11	ALDH10A8 (Aldehyde dehydrogenase 10A8); 3-chloroalyl aldehyde dehydrogenase	AT1G74920
Cytosol and other organelle target proteins			
503**	51.78	26s proteasome AAA-ATPase subunit RPT5a	AT3G05530
1805**	96.01	UBQ14 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 14); ubiquitin-specific protease	AT3G32630
717**	66.33	RCA1 (ROOTS CURL IN NPA); protein phosphatase type 2A regulator	AT1G25490
1903*	123.37	Transcription factor / transcriptional activator; response to stress	AT3G19290
2715*	69.35	putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	AT1G69780
5006	48.04	Serpin; putative serine protease inhibitor; putative	AT1G47110
0718	64.88	Protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit	
2501	52.84	Gamma-glutamylcystein synthetase	
2606	54.92	Strong similarity to alanine aminotransferase	AT1G17290
2703	61.15	Dihydrolipoamide acetyltransferase	AT3G13930
7904	99.47	aconitase	AT3G16420

* indicates Stress-related proteins; ** indicates GA signalling-related proteins; *** indicates regulating proteins of hypocotyl elongation.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 (a), (b) 및 (c) 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는, 식물체 왜화 유도 기능을 가지는 폴리펩티드.

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

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

(c) 상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드

【청구항 2】

제1항 기재의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

【청구항 3】

하기 (I) 단계 및 (II) 단계를 포함하는 왜화 식물체의 제조방법.

(I) 제2항의 폴리뉴클레오티드를 식물체로 형질전환시키는 단계, 및

(II) 그 형질전환된 식물체 중에서 왜화 현상이 유도된 식물체를 선별하는 단계

【청구항 4】

제3항에 있어서,

상기 제2항의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2에 개시된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 왜화 식물체의 제조방법.

【청구항 5】

제3항에 있어서,

상기 제2항의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1에 개시된 염기서열로 이루어진 유전자인 것을 특징으로 하는 왜화 식물체의 제조방법.

【청구항 6】

제3항에 있어서,

상기 (I) 단계는 서열번호 2에 개시된 아미노산

서열로 이루어진 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물에 형질전환시킴으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 왜화 식물체의 제조방법.

【청구항 7】

제3항에 있어서,

상기 (I) 단계는 서열번호 2에 개시된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스를 식물에 형질전환시킴으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 왜화 식물체의 제조방법.

【청구항 8】

하기 (I) 단계 및 (II) 단계를 포함하는 왜화 식물체의 제조방법.

(I) 식물에서 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자를 과발현시키는 단계, 및

(II) 왜화 현상이 유발된 식물체를 선별하는 단계

【청구항 9】

제8항에 있어서,

상기 유전자를 과발현시키는 단계는

서열번호 2에 개시된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 암호화하는 유전자, 그 유전자를 포함하는 벡터 및 그 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스 식물체로 구성된 군에서 선택된 생물학적 것으로 식물체를 형질전환시킴으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 왜화 식물체의 제조방법.

【청구항 10】

제8항에 있어서,

상기 유전자를 과발현시키는 단계는 화학 물질을 식물체에 처리함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 왜화 식물체의 제조방법.

【청구항 11】

제3항 내지 제10항 중 어느 한 항 기재의 방법에 의하여 얻어진 왜화 식물체.

【청구항 12】

하기 (I) 단계 및 (II) 단계를 포함하는 식물체 왜화 유도 물질의 스크리닝 방법.

(I) 식물체에 임의의 화학 물질 또는 생물학적 물질을 처리하는 단계, 및

(II) 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자를 과발현시키는 물질을 검출하는 단계

【청구항 13】

하기 (I) 단계 및 (II) 단계를 포함하는 형질전환된 식물체의 선별 방법.

(I) 목적유전자, 식물체 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드를 암호화하는 전술한 바의 폴리뉴클레오티드 및 조절 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계, 및

(II) 왜화 현상이 유발된 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.

【도면의 간단한 설명】

도 1a는 본 발명의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 식물체 왜화 유도 기능을 가지는 유전자가 센스 혹은 안티센스 방향으로 도입된 pSEN 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 1b는 본 발명의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 식물체 왜화 유도 기능을 가지는 유전자가 도 1a의 pSEN 벡터에 센스 방향으로 도입된 pSEN-AtGA2ox4 재조합 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 1c는 본 발명의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 식물체 왜화 유도 기능을 가지는 유전자가 도 1a의 pSEN 벡터에 안티센스 방향으로 도입된 pSEN-antiAtGA2ox4 재조합 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 2a와 2b는 상기도 1b와 1c의 pSEN-AtGA2ox4와 pSEN-antiAtGA2ox4 재조합 벡터로 각각 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 발아 후 30일, 그리고 48일 동안 생육한 애기장대의 사진이다. 그리고 도 2c는 pSEN-AtGA2ox4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인 9번과 10번의 개화 시기에 대한 잎의 숫자를 나타낸 그림이다. 도 2d는 pSEN-AtGA2ox4와 pSEN-antiAtGA2ox4 재조합 벡터로 각각 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인들의 종자 생산성을 나타낸 그림이다.

Col-O: 애기장대 야생형

SEN::AtGA2ox4: pSEN-AtGA2ox4을 가지는 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

atga2ox4: pSEN-antiAtGA2ox4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인

도 3a는 발아 후 30일 동안 생육한 애기장대 야생종(Col-O)과 왜화 현상이 유도된 변이체 SEN::AtGA2ox4에서 AtGA2ox4를 포함한 GA2 oxidase 관련 유전자와 개화 조절 관련 유전자의 발현 양상을 여러 기관별로 RT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, 도 3b는 지베렐린 생합성 관련 유전자의 발현 양상을 여러 기관별로 RT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며 tubulin은 대조구이다.

F, flowers; R, roots; S, stems; L, leaves; Si, siliques

AtGA2ox1, AtGA2ox2, AtGA2ox3, AtGA2ox4, AtGA2ox6, AtGA2ox7, AtGA2ox8: 애기장대 GA 2-oxidase 관련 유전자

FT, CO: 개화 조절 관련 유전자

AtGA20ox1, AtGA20ox2, AtGA3ox1: 애기장대 지베렐린 생합성 관련 유전자

도 4a는 pSEN-AtGA2ox4 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인 중 SEN::GA2ox4-9와

SEN::GA2ox4-10 라인의 종자에서 발아 후 12일부터 일주일 간격으로 GA₃를 2회 처리하여 총 30일 동안 자란 애기장대의 사진이고, 4b는 애기장대 변이체의 키에 대한 결과를 나타낸 그림이며 Col-O는 애기장대 야생형이다. 그리고 4c는 pSEN-AtGA2ox4 재조합 벡터로 형질 전환된 애기장대의 T2 라인 중 *SEN::GA2ox4-9*와 *SEN::GA2ox4-10* 라인의 종자에서 발아 후 12일부터 일주일 간격으로 GA₃를 2회 처리하여 총 40일 동안 자란 애기장대의 사진이다.

도 5a는 발아 후 30일 동안 생육한 애기장대 야생형의 단백질 발현 양상을 2차 전기영동을 통하여 분석한 결과이다.

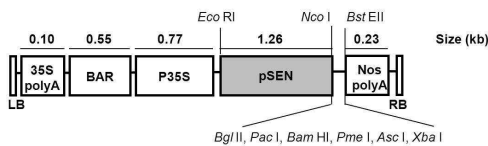
붉은 색 숫자들은 *AtGA2ox4*의 과발현에 의해 up-regulation되고 GA₃의 처리에 의해 단백질의 발현이 야생형 수준으로 회복되는 단백질들을 나타낸다.

도 5b는 발아 후 30일 동안 생육한 왜화 현상이 유도된 애기장대 변이체인 *SEN::GA2ox4*의 단백질 발현 양상을 2차 전기영동을 통하여 분석한 결과이다.

도 5c는 발아 후 12일부터 일주일 간격으로 GA₃를 2회 처리하여 총 30일 동안 생육하여 *SEN::GA2ox4*의 표현형이 애기장대 야생형의 표현형으로 회복된 변이체의 단백질 발현 양상을 2차 전기영동을 통하여 분석한 결과이다.

【도면】

【도 1a】



【도 1b】



【도 1c】



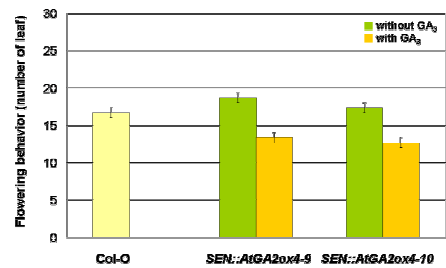
【도 2a】



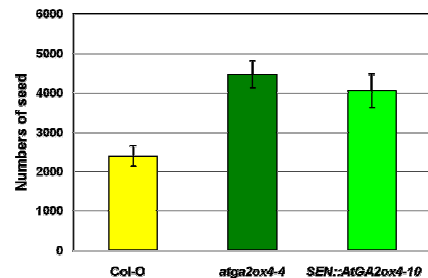
【도 2b】



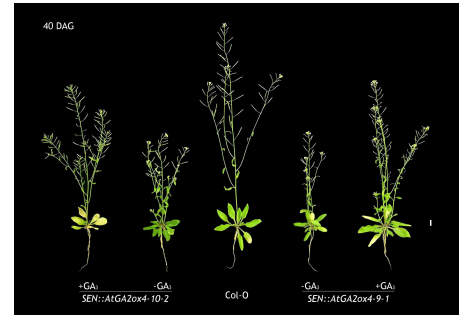
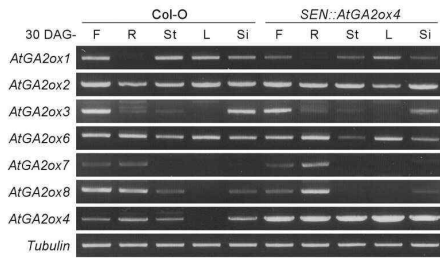
【도 2c】



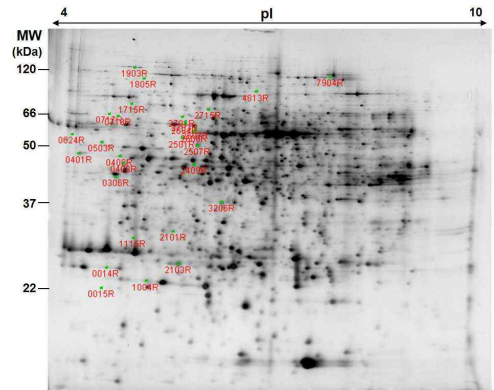
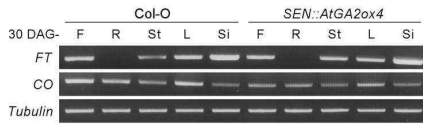
【도 2d】



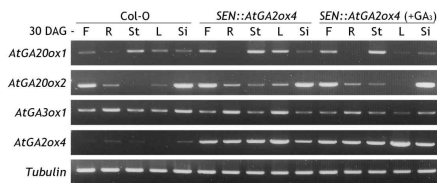
【도 3a】



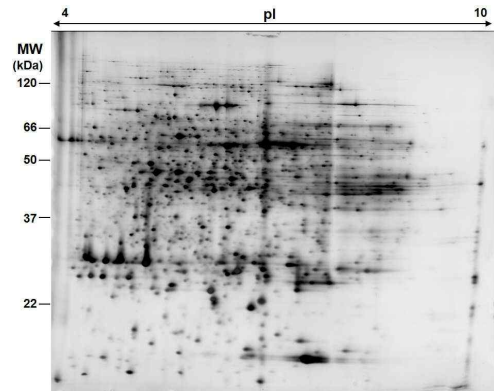
【도 5a】



【도 3b】



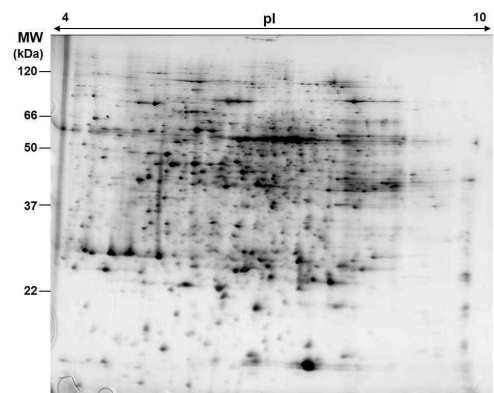
【도 5b】



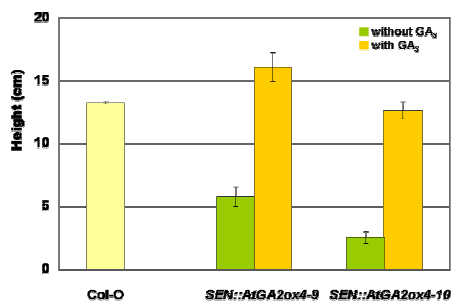
【도 4a】



【도 5c】



【도 4b】



【도 4c】

[부록 3] 특허출원(10-2010-0011652/KR2010/000767)

【명세서】

【발명의 명칭】

식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 {ATHG1 Protein Having Senescence Delay and Stress Tolerance of Plants, the Gene Encoding the Protein and Those Use}

【기술분야】

식물의 노화 조절 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도에 관한 것이다.

【배경기술】

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 되고, 결국 죽음에 이르게 된다(Thomas et al., 1993). 이러한 식물의 노화는 일련의 연속된 생화학적 및 생리학적 현상으로 유전적으로 계획되어 있어 세포, 조직 및 기관의 수준에서 매우 정교하고, 능동적으로 진행된다.

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

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

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

최근 노화 조절 현상을 구명하기 위하여 노화 시기에 발현이 유도되는 유전자의 분리 및 이들의 발현 양상 분석에 관한 많은 연구가 수행되었다. 노화 시 발현이 증가되는 유전자들의 분석은 애기장대, 무, 토마토 등에서 연구가 수행되었으며, 이러한 발현 양상 분석을 통해 노화의 pathway들은 매우 복잡한 network을 이루고 있음이 제시되었고, 최근에는 subtractive hybridization과 microarray 등의 방법을 이용하여 노화 시기에 유도되는 유전자들을 다량으로 분리하고 있고, 이들 중 노화 조절 유전자로 추정되는 transcription factor, 혹은 receptor-like kinase 등과 같은 유전자들을 주 target으로 하여 발현 분석을 실시하고 있다. 노화 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 kinase 중 하나인 콩의 GmSARK의 발현은 자연 발생적 노화 뿐만 아니라 암 처리에 의한 인위적 노화 과정에서도 up-regulation되며, 본 유전자의 억제는 잎 노화의 지연을 유발한다고 알려지고 있다(Li et al., 2006).

최근 활성산소종(ROS; reactive oxygen species)이 식물체 노화에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려지고 있다. 특히 peroxysome에서 유래된 catalase isoform들

은 APXI과 함께 식물체의 노화를 조절한다고 애기장대를 재료로 하여 Zentgraf 그룹에서 제안하고 있다 (Zimmermann et al., 2006).

한편, 농업적인 측면에서 보면 식물의 노화는 식물의 성장 단계에 대한 제한으로 인하여 작물의 생산성을 제한할 수 있으며 또한 채소 작물 등에서 잎의 황화 현상과 영양소 소실 등과 같은 품질 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 증가 시킬 수 있었으며, 또한 콩 (Guamett et al., 1990)과 같은 곡물류에서도 노화 조절을 통해 생산성이 30% 이상의 증대 효과를 얻을 수 있었다. 그러나 여전히 식물 노화를 조절을 통한 생산성 증대에 대한 연구는 극히 제한적이다.

이러한 이유에서 식물 분야 생명공학 종사자들은 식물에서 노화 조절에 관여하는 유전자나 단백질 등을 찾아내고자 노력하고 있다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명의 목적은 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질을 제공하는 데 있다.

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

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

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

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

본 발명의 기타의 목적은 이하에서 제시될 것이다.

【과제의 해결 수단】

본 발명은 일 측면에 있어, 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질에 관한 것이다.

본 발명자(들)는 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질 (DNA-binding protein-related, GeneBank accession number NP 193515)의 염기서열을 기초로 상기 단백질의 유전자를 분리하고 상기 유전자를 애기장대에 형질전환시켜 과발현시켰을 때, 식물의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타나고 이와 더불어 개체 크기 증가와 종자 생산량 증가라는 특성도 뚜렷하게 나타남을 확인하였으며,

나아가 형질전환된 애기장대는 다양한 환경 스트레스 중 산화적 스트레스(oxidative stress)와 가뭄 스트레스(drought stress)에 대한 저항성을 나타냄을 확인하였다.

이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이 식물체의 노화를 지연시키고 개체 크기 증가와 종자 수확량 증가를 통해 식물의 생산성을 증대시키며, 산화적 스트레스나 가뭄 스트레스 등과 같은 스트레스 방어 기작에 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

본 발명자들은 상기 유전자를 *ATHG1(AT-hook protein of Genome 1)* 유전자 및 ATHG1 단백질로 명명하였으며, 이들 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 1 및 2에 개시되어 있다.

본 발명의 ATHG1 단백질은 하기 (a), (b) 및 (c)의 폴리펩티드들 중 하나이다.

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

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

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

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

본 명세서에서, “서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드”는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교하였을 때 여전히 식물 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 보유하기에 충분한 정도의 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로서 정의된다. 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 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 스트레스 내성 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 선행 기술을 숙지하고 있는 자라면, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 일부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 여전히 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 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 부분

이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 가진다고 당업계에 공지되어 있기 때문이다. 물론 경우에 따라서는, N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 단백질의 기능 유지에 필수적이어서 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실된 폴리펩티드가 상기 기능을 나타내지 않는 경우가 있을 수 있겠지만, 그럼에도 그러한 비활성의 폴리펩티드를 활성의 폴리펩티드와 구분하고 검출해내는 것은 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속한다. 나아가 N-말단 부분 또는 C-말단 부분뿐만 아니라 그 이외의 다른 부분이 결실되더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 가질 수 있다. 여기서도 당업자라면 그의 통상의 능력의 범위 내에서 이러한 결실된 폴리펩티드가 여전히 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 가지는가를 충분히 확인할 수 있을 것이다. 특히 본 명세서가 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 개시하고 있고 나아가 서열번호 1의 염기서열에 의해 암호화되고 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 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 스트레스 내성 기능을 가지는 결실된 형태의 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미로서 이해되어야 한다.

또한 본 명세서에서, "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"란 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하지만, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 기능, 즉 식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 보유하는 폴리펩티드를 말한다. 여기서도 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 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 스트레스 내성 기능을 보유하기만 한다면 본 발명에 포함된다는 것이다. 하나

이상의 아미노산이 치환되더라도 치환되기 전의 아미노산이 치환된 아미노산과 화학적으로 등가라면, 그러한 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 여전히 본래의 폴리펩티드의 기능을 보유할 것이다. 예컨대, 소수성 아미노산인 알라닌이 다른 소수성의 아미노산, 예를 들면 글리신, 또는 보다 더 소수성인 아미노산, 예를 들면 발린, 류신 또는 이소류신으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드는 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 마찬가지로, 음으로 하전된 아미노산 예컨대, 글루탐산이 다른 음으로 하전된 아미노산, 예컨대 아스파르산으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드도 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이며, 또한 양으로 하전된 아미노산, 예컨대 아르긴린이 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 스트레스 내성 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 스트레스 내성 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 스트레스 내성 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 스트레스 내성 기능을 가지는 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미이지만, 그럼에도 활성의 정도라는 관점에서 봤을 때, 상기 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 서열 상동성이 높을수록 바람직하다. 상기 폴리펩티드는 서열 상동성의 하한에 있어서 60% 이상의 서열 상동성을 지니는

것이 바람직한 반면, 서열 상동성의 상한에 있어서는 당연히 100%의 서열 상동성을 지니는 것이 바람직하다. 보다 더 구체적으로 위 서열 상동성은 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 순서대로 높아질수록 바람직하다. 그리고 본 발명의 "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 "서열번호 2의 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드" 뿐만 아니라 '서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드'를 포함하므로 전술한 바의 모든 설명은 "서열번호 2의 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드"에 대해서 뿐만 아니라 "서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드"에 대해서도 적용되어진다.

본 발명은 다른 측면에 있어서, 전술한 바의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 대한 것이다. 여기서 "전술한 바의 폴리펩티드"란 식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 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 스트레스 내성 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 조절 기능을 지니면서 전술한 바의 서열 상동성의 순서대로 그 서열 상동성을 지니는 모든 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 아미노산 서열이 밝혀졌을 때, 그러한 아미노산 서열에 기초하여 그러한 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 당업자라면 용이하게 제조할 수 있다.

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

서 정의된다.

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

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

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

또한 본 명세서에서, "식물체"란 성숙한 식물, 미성숙 식물(유식물체), 식물 종자, 식물세포, 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]에 개시된 방법을 사용하여 성숙한 식물체로 발육·생장시킬 수 있다.

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

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

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

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

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

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

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

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

또한 본 명세서에서, "프로모터"는 당업계에 알려진 통상의 의미를 따르는데, 구체적으로는 어떤 유전자의 전사 개시점을 기준으로 상류(5'쪽)에 위치하고, DNA-의존 RNA 중합효소에 대한 결합 부위, 전사 개시점, 전사 인자 결합 부위 등을 포함하는, 하나 이상의 유전자의 전사를 제어하는 기능을 갖는 핵산 서열을 의미한다. 이러한 프로모터는 그것이 진행 생물 유래일 경우 전사 개시점 상류에 있는 TATA 박스(통상 전사 개시점(+1) -20 내지 -30 위치에 존재), CAAT 박스(통상 전사 개시 부위와 비교하여 대략 -75 위치에 존재), 5' 인핸서, 전사 억제 인자 등을 포함한다.

사용 가능한 프로모터는 그것에 연결된 서열번호 1의 유전자를 과발현시킬 수 있는 프로모터라면 구성적

프로모터(모든 식물체 조직에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터), 유도성 프로모터(특정 외부 자극에 반응하여 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터 또는 특정 발달 시기나 특정 조직에서 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터) 모두 사용될 수 있다. 사용 가능한 구성적 프로모터의 대표적인 예로는 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터를 들 수 있고, 그 밖에 유비퀴틴(ubiquitin) 계열의 프로모터(Christensen et al., 1992, *Plant Mol. Biol.* 18, 675-689; EP0342926; Cornejo et al., 1993, *Plant Mol. Biol.* 23, 567-581), 벼 액틴프로모터(Zhang et al. 1991, *The Plant Cell* 3, 1155-1165) 등을 들 수 있다. 사용 가능한 유도성 프로모터의 예로는 구리 이온에 의해 활성화되는 효모 메탈로티오네인 프로모터(Mett 등, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 90:4567, 1993), 치환 벤젠설폰아미드에 의해 활성화되는 In2-1 및 In2-2 프로모터(Hershey 등, *Plant Mol. Biol.*, 17:679, 1991), 글루코코르티코이드에 의해 조절되는 GRE 조절 서열(Schena 등, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 88:10421, 1991), 에탄올 조절성 프로모터(Caddick 등, *Nature Biotech.*, 16:177, 1998), 리블로스 비스-포스페이트 카복실라제(ssRUBISCO)의 소 서브유니트에서 유래한 광조절성 프로모터(Coruzzi 등, *EMBO J.*, 3:1671, 1984; Broglie 등, *Science*, 224:838, 1984), 만노핀 신타제 프로모터(Velten 등, *EMBO J.*, 3:2723, 1984), 노팔린 신타제(NOS) 프로모터, 옥토판 신타제(OCS) 프로모터, 열 충격 프로모터(Gurley 등, *Mol. Cell. Biol.*, 6:559, 1986; Severin 등, *Plant Mol. Biol.*, 15:827, 1990) 벼 글루테린 (glutelin) 프로모터, 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 등을 들 수 있다.

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

상기 발현벡터는 선별 마커 유전자를 포함할 수 있다. 여기서 "마커 유전자"란 그러한 마커 유전자를 포함하는 식물 또는 식물 세포의 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, 디히드로플레이트 리덕타

제의 유전자, 하이그로마이신-B-포스포트랜스퍼라제의 유전자, 티미딘 키나제의 유전자, 크산틴-구아닌 포스포 리보실트랜스퍼라제의 유전자, 포스핀노트리신 아세틸 트랜스퍼라제 유전자 등을 들 수 있다.

본 명세서에서, 상기 "형질전환"이란 왜래 유전자가 도입됨에 의한 숙주 식물체의 유전자형의 변형을 의미하며, 그 형질전환에 사용된 방법과 상관없이 그 왜래 유전자가 숙주 식물체, 더 정확하게는 숙주 식물의 세포 내로 도입되어 세포의 게놈에 통합된 것을 의미한다. 여기서 왜래 유전자에는 동종성 유전자와 이종성 유전자가 포함되는데, "동종성 유전자"란 숙주 유기체 또는 그와 동일한 생물종의 내인성 유전자를 의미하며, "이종성 유전자"란 그것이 형질전환되는 유기체에서는 존재하지 않는 유전자를 말한다. 예컨대 애기장대 유래 유전자는 애기장대 식물에게는 동종성 유전자이지만 토마토 식물에서는 이종성 유전자가 된다.

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

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

이러한 아그로박테리움이 매개된 형질전환 방법은 당업계에 잘 공지되어 있으며(Chilton 등, 1977, Cell 11:263:271 유럽특허 EP 0116718; 미국특허 US 4,940,838), 특정 식물체에 적합한 방법도 당업계에 공지되어 있다. 예컨대 목화에 대해서는 미국특허 US

5,159,135, 콩에 대해서는 미국특허 US 5,824,877, 옥수수에 대해서는 미국특허 US 5,591,616 등을 참조할 수 있다. 아그로박테리움 매개 형질전환 방법은 Ti-플라스미드를 이용하는데, 이 플라스미드에는 T-DNA를 식물 세포의 게놈으로 통합시킬 수 있는 좌우 경계(border) 서열이 포함될 것이다.

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

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

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

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

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

상기 (b) 단계는 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 함량이나 H₂O₂ 등의 활성산소종의 함량을 정량하는 방법, 상기 방법들을 혼합한 방법 등을 통하여 선별할 수 있다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 생산량 증가 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

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

본 명세서에서, "생산량 증가 특성"이란 식물체의 전체, 줄기, 뿌리 및/또는 잎의 생체량(biomass; 크기 및/또는 질량)이 야생형 식물체에 비하여 증가한 특성 및/또는 식물체의 종자 생산성이 야생형 식물체에 비하여

증가한 특성을 말한다.

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

상기 (b) 단계는 식물체의 생체량 크기를 비교하여 육안으로 선별하거나, 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있으며, 또는 종자의 수를 계수하여 측정할 수 있다. 또 이들의 방법을 혼합하여 측정할 수도 있다.

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

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

또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 식물체의 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

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

또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 식물체의 생산량을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

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

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

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

바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATGH1 단백질을 암호화하는 유전자 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자로 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖

는 형질전환 식물체이다.

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

바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATGH1 단백질을 암호화하는 유전자 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체이다.

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

바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 ATGH1 단백질을 암호화하는 유전자 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 ATGH1가 도입되어 과발현됨으로써 생산량 증가 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.

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

【발명의 효과】

전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자를 제공할 수 있다. 상기 유전자는 노화 지연 기능을 갖고 스트레스 내성 기능을 가지므로, 이 유전자로 식물체를 형질전환시킬 경우, 식물의 노화를 지연시키고, 식물의 생산성을 증가시키며, 스트레스에 대해 내성을 갖도록 할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-ATHG1 재조합 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 2는 상기 도 1의 pCSEN-ATHG1 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₁ 식물을 발아 후 60일 동안 생육한 애기장대의 사진이다.

Col-0: 애기장대 야생형

ATHG1 ox-a: pCSEN-ATHG1 재조합 벡터로 형질전

환된 애기장대 T₁ 식물

ATHG1 ox-b: pCSEN-ATHG1 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₁ 식물

도 3은 상기 도 1의 pCSEN-ATHG1 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 발아 후 60일 동안 생육한 애기장대의 사진이다.

Col-0: 애기장대 야생형

ATHG1 ox-5: pCSEN-ATHG1 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATHG1 ox-6: pCSEN-ATHG1 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 4는 상기 도 3의 애기장대 라인의 식물 개체당 종자수확량(seed yield)을 나타낸 결과이다.

Col-0: 애기장대 야생형

ATHG1 ox-5: pCSEN-ATHG1 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

ATHG1 ox-6: pCSEN-ATHG1 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인

도 5는 발아 후 25일 동안 생육한 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 *ATHG1* 유전자 발현 양상을 RT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, *ACT8*은 PCR 양성 대조구이다.

도 6은 발아 후 25일부터 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 3-4번 좌엽(roseette leaf)을 매 5일마다 60일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 7은 발아 후 25일부터 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 3-4번 좌엽을 매 5일마다 60일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 8은 발아 후 25일부터 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 3-4번 좌엽을 매 5일마다 60일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

도 9는 발아 후 25일부터 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 3-4번 좌엽을 매 5일마다 60일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, *ACT8*은 PCR 양성 대조구이다. *CAB2*은 엽록소a/b 결합 단백질 유전자이고, *SEN4* 및 *SAG12*는 노화 유전자로서, 노화 마커 유전자들이다.

도 10은 발아 후 25일째 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 14일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.

도 11은 발아 후 25일째 애기장대 야생형(Col-0),

노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 14일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.

도 12는 발아 후 25일째 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 14일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.

도 13은 발아 후 25일째 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 14일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, *ACT8*은 PCR 양성 대조구이다. *CAB2*, *SEN4*, and *SAG12*: 노화 마커 유전자이다.

도 14는 발아 후 25일째 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 TB와 DAB 염색 용액으로 염색한 후 매 2일마다 현미경으로 관찰한 그림이다.

도 15는 상기 도 14의 애기장대 야생형(Col-0)와 노화지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*의 6일째 TB 염색, 그리고 4일째 DAB 염색 결과에 대한 확대 그림이다.

도 16은 발아 후 25일째 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 4일간 H₂O₂를 처리한 잎의 표현형 변화를 도시한 그림이다. Mock 처리구는 대조구이다

도 17은 발아 후 25일째 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*의 3-4번 좌엽을 detach하여 4일간 H₂O₂를 처리한 잎의 엽록소 함량 변화를 도시한 그림이다.

도 18은 발아 후 30일째와 13일 동안 가뭄 처리한 후 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*를 촬영한 사진이다.

도 19는 발아 후 30일째 애기장대 야생형(Col-0), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATHG1 ox-5*, 그리고 *ATHG1 ox-6*를 13일 동안가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어난 잎의 무게 변화를 도시한 그림이다.

도 20은 애기장대 원형질체에서 *ATHG1-GFP* 융합 단백질의 핵으로의 이동을 보여주는 그림이다.

GFP control: 양성 대조구인 35S-GFP의 형광현미경 하에서 관찰되는 사진

ATHG1-GFP: *ATHG1-GFP*의 형광현미경 하에서 관찰되는 사진

도 21은 애기장대 원형질체에서 *ATHG1::GFP* 융합

단백질의 핵으로의 이동을 확인시켜주는 그림이다.

GFP: *ATHG1::GFP*의 형광 현미경 하에서 관찰되는 사진

DAPI: 애기장대 원형질체의 핵 염색에 대한 형광 현미경 사진

Merged: GFP 이미지와 DAPI 염색 이미지의 융합 사진

White: 애기장대 원형질체의 광학 현미경 하에서 관찰되는 사진

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

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

<실시예 1> 애기장대로부터 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 스트레스 내성 기능을 갖는 *ATHG1* 유전자의 분리

식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 *ATHG1* 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다.

<실시예 1-1> 애기장대의 재배 및 배양

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°C의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 성장 조절기(growth chamber)내에서 재배하였다.

<실시예 1-2> RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

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

<실시예 1-3> 식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 *ATHG1* 유전자분리

애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related, GeneBank accession number NP 193515)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 *BglIII*의 서열이 포함된 정방향 프라이머(*BglIII/AT4G17800* SOE-F, 5'-AGA TCT ATG GCT GGT CTT GAT CTA GGC A-3')와, 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *BstEII*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*BstEII/AT4G17800* SOE-R, 5'-GGT GAC CTC AGA AAG GAC CTC TTC CAC CG-3')를 합성하였다. 상기

두 프라이머를 사용하여 상기 <실시예1-2>에서 제조된 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 29.7 kDa의 분자량을 갖는 292개의 아미노산을 암호화하는 879bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATHG1*(AT-hook protein of *Genomine 1*)로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 *ATHG1* 단백질의 등전점(isoelectric point)은 6.41로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "*ATHG1*" 혹은 "*ATHG1* 유전자"라 하고, 단백질은 "*ATHG1*" 혹은 "*ATHG1* 단백질"이라고 한다).

실시예 2> *ATHG1* 유전자에 대한 센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 노화에 대한 특성 분석

<실시예 2-1> *ATHG1* 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

상기 유전자가 식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *ATHG1* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATHG* 전사체의 발현을 변화시켰다.

서열번호 3로 표시되고 제한효소 *BglIII*의 서열이 포함된 정방향 프라이머 및 서열번호 4으로 표시되고 제한효소 *BstEII*의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터PCR을 이용하여 *ATHG1* cDNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *BglIII*와 *BstEII*로 절단하고, inducible promoter인 *SEN1* 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 *ATHG1* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATHG1* 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 *SEN1* 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

한편, 도 1은 pCSEN 벡터에 *ATHG1* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATHG1* 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-A는CaMV 35S RNA polyA, PSEN은 *SEN1* 프로모터, Nos-A는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를 가리킨다.

상기 pCSEN-*ATHG1* 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션(electroporation)방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28°C에서 O.D.₆₀₀ 값

이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25°C에서 5,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 최종 O.D.₆₀₀ 값이 2.0이 될 때까지 Infiltration Medium (IM; 1X MS SALTS, 1X B5 vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77, Lehle Seed, USA) 배지에 현탁하였다. 4주된 애기장대를 진공 챔버(vacuum chamber)에 있는 아그로박테리움 현탁액에 침지시키고, 10분 동안 10⁴ Pa의 진공 하에 두었다. 침지 후, 애기장대를 24시간 동안 폴리에틸렌 백(polyethylene bag)에 두었다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 생산시켜 종자(T₁)를 수확하였다. 대조군으로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *ATHG1* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

<실시예 2-2> T₁과 T₂ 형질전환 애기장대의 특성 분석

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

pCSEN-*ATHG1* 벡터로 형질전환된 T₁ 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(도 2).

이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 우선, T₂ 형질전환 애기장대를 3일 동안 저온 처리(4°C)한 T₂ 형질전환 종자를 화분에서 재배한 후 바스타 제초제 처리를 통하여 형질전환 애기장대를 선별하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째(data not shown), 그리고 60일째(도 3) 수행하였다. pCSEN-*ATHG1* 구성체를 가지고 있는 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체 라인은 애기장대 야생형(Col-0)과 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 이러한 노화 지연 현상은 라인 마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 유전자의 과발현이 라인 마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 아울러 이들 변이체들은 노화 지연 표현형뿐만 아니라 노화 지연 동안 아래에서 확인되는 바와 같이 개체 크기와 종자

생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다.

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(도 4). 따라서 본 유전자의 타 작물 적용은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 *ATHG1* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 발아 후 25일 동안 생육한 애기장대 야생형과 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체의 잎으로부터 RNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하여 전체 RNA를 각각 추출하였다. 각각 1μg의 RNA를 주형으로 하고, Superscript III Reverse Transcriptase(INVITROGEN, USA)을 이용하여 65°C에서 5분 50°C에서 60분 및 70°C에서 15분의 조건으로 cDNA를 합성하였다. 이후, 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 하기 *ATHG1* 유전자와 PCR 양성 대조군으로 사용된 *ACT8* 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C에서 2분간 가열하여 주형 DNA를 변성시킨 후, 94°C에서 1분 55°C에서 1분 30초 및 72°C에서 1분 을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72°C에서 15분간 최종 반응시켜 수행하였다. 이후, 1% 아가로스 겔 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였으며, 그 결과는 도 5에 도시되었다. 애기장대 야생형에 비하여 *ATHG1 ox-5*와 *ATHG1 ox-6* 변이체의 *ATHG1* 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체가 *ATHG1* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

<실시예 3> *ATHG1* 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석

ATHG1 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T₂ 세대에서 발아 후 25일 이후부터 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 매 5일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

<실시예 3-1> *ATHG1* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 잎의 표현형적 변화

발아 후 25일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 5일마다 60일까지 잎의 표현형을 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 40일 이후 잎의 황화 현상이 급격한

게 나타났으며 50일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATHG1 ox-5*와 *-6*의 경우 잎의 황화 현상이 55일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 60일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(도 6). 이러한 사실로 미루어보아, *ATHG1* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다.

<실시예 3-2> *ATHG1* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 엽록소 함량 변화

엽록소의 함량 측정을 위해 각 시료 잎을 80% (V/V) acetone을 사용하여 엽록소를 추출하였다. 엽록소 함량은 663.2 nm와 664.8 nm의 흡광 계수를 이용하여 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(*Biochemical Society Transduction* 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였다. 그 결과, 도 7에 도시된 바와 같이, 야생종의 경우 엽록소 함량이 발아 후 40일 이후부터 급격한 감소를 보이며 55일째 엽록소의 함량이 0%가 되었으나, *ATHG1 ox-5*와 *-6*의 경우 발아 후 55일이 되었을 때도 측정 초기의 40% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다.

<실시예 3-3> *ATHG1* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 광합성 효율 변화

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

그 결과, 도 8에 도시된 바와 같이, 야생종은 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. 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.

<실시예 3-4> *ATHG1* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 노화 관련 유전자의 발현 변화

야생종과 *ATHG1 ox-5*, *ATHG1 ox-6* 변이체에서 노

화 관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다.

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

노화에 대한 마커(marker) 유전자들에 대한 정량적인 분석은 Applied Bio-systems의 7300 Real Time PCR System을 이용한 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 과정을 통해 확인하였다. 노화 마커 유전자로는 *SAG12*, *SEN4* 및 *CAB2* 유전자를 사용하였으며, qRT-PCR 양성 대조구조로는 *ACT8* 유전자를 사용하였다.

야생종의 경우, *CAB2*(엽록소a/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, *SAG12* 및 *SEN4*와 같은 노화 관련 유전자들은 노화단계에서 그 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. *SEN4*의 경우 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(도 9). 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.

<실시예 3-5> *ATHG1* 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

노화를 촉진한다고 알려진 암 처리에 대한 *ATHG1* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 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, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 상기 실시예3-1에서 3-4와 동일한 방법으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 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 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(도 10). 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(도 11). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 *ATHG1* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(도 12).

또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 상기 실시예 3-4와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 도 13에 도시된 바와 같이, 야생형이 암 처리 후 6일째 *SEN4*와 *SAG12*의 발현이 현저히 증가하는데 비해, *ATHG1* 과발현 변이체는 암 처리 기간 동안 지속적으로 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*의 발현이 현저히 억제되는 것을 볼 수 있었다.

<실시예 4> *ATHG1* 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석

<실시예 4-1> *ATHG1* 과발현 변이체의 세포 사멸(cell death) 및 H₂O₂에 대한 특성 분석

ATHG1 과발현 변이체의 노화 진행에 따른 세포 사멸 및 H₂O₂의 축적을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 발아 후 25일째 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 detach하여 6일간 암 상태에서 염색하였으며, 매 2일 간격으로 현미경 하에서 관찰하였다. 세포 사멸 분석은 TB(0.05% Lactophenol-Trypan blue) 염색 방법을 사용하였다(Koch and Slusarenko; The Plant Cell 2:437-445, 1990). TB 염색 용액에 잎을 담근 후 5분간 70 mbar의 vacuum을 처리하고, 실온에서 1시간 동안 반응 시킨 후 70% 에탄올(EtOH)을 이용하여 세척 및 고정을 유도한 후 chlorosis가 완전히 진행된 뒤 염색 정도를 현미경 하에서 관찰하였다. H₂O₂ 축적에 대한 염색은 DAB(3,3'-diaminobenzidine-4HCl, 0.05%, pH 5.8) 염색 용액에 잎을 담근 후 5분간 70 mbar의 vacuum을 처리하고, 실온에서 3 시간 동안 반응 시킨 후 70% 에탄올을 이용하여 세척 및 고정을 유도한 후 chlorosis가 완전히 진행된 뒤 현미경 하에서 관찰하였다(Luis David Maldonado-Bonilla et al. Eur J Plant Pathol. 121:439-449, 2008).

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후 잎의 세포 사멸 및 H₂O₂의 축적이 급격하게 일어나 6일째 최대치를 이루었다. 이러한 사실은 잎의 노화

진행은 세포 사멸과 더불어 ROS의 축적, 특히 H₂O₂의 축적을 유발한다는 것을 알려주고 있다. 한편 *ATHG1* 과발현 변이체에서는 암처리 동안 세포 사멸 및 H₂O₂의 축적이 현저히 지연됨을 보여 주었다(도 14와 15). 따라서 *ATHG1*은 식물의 노화 지연을 통하여 세포 사멸 및 H₂O₂의 축적 지연을 유발하는 것으로 판단된다.

ATHG1 과발현 변이체에서 나타나는 식물 잎의 노화 동안 유발되는 H₂O₂의 축적 감소가 실질적으로 외부 환경 스트레스의 하나인 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공하는지를 확인하기 위하여 3mM MES 용액에 5mM H₂O₂을 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 2일 간격으로 엽록소 함량을 측정하여 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형의 경우 H₂O₂ 처리 후 4일째 잎의 황화 현상 및 엽록소 함량 감소가 현저히 유발되는 반면, *ATHG1* 과발현 변이체에서는 4일째에도 잎의 황화 현상이 거의 유발되지 않았고 또한 엽록소 함량에 있어서도 초기 상태의 70% 이상을 유지하고 있었다(도 16와 17). 이러한 사실은 *ATHG1*이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

<실시예 4-2> *ATHG1* 과발현 변이체의 가뭄 스트레스에 대한 특성 분석

*ATHG1*의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 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(도 18와 19). 이러한 사실은 *ATHG1*이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

<실시예 5> 애기장대 원형질체에서 *ATHG1*-GFP 융합 단백질의 발현에 대한 특성 분석

상기에서 밝혀진 *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 *ATHG1* 유전자를 *PsdI*과 *StuI* 제한효소 부위를 포함하는 프라이머(정방향 프라이머, 서열번호 17, *ATHG1* F: 5'-CTGCAGATGGCTGGTCTTGATCTAGGCA-3', 역방향 프라이머, 서열번호 18, *ATHG1* R: 5'-AGGCCTGAAAGGACCTCTCCACCGGAA-3')를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 cDNA를 *PsdI*과 *StuI* 제한효소로 절단하고 GFP(green fluorescence protein)를 tagging하여 플라스미드에 삽입하여 플라스미드 p*ATHG1*-GFP 벡터를 제작하였다. 이후 *ATHG1*의 세포 내 위치를 확인하기 위해서 p*ATHG1*-GFP 벡터를 애기장대 원형질체(protoplast)에 transfection한 후 형광 현미경(fluorescence microscope)을 이용하여 관찰하였고, 핵의 위치 image는 DAPI (0.5ug/ul) staining 방법(Paulus M Fong *et al.* Cell Res. 16:479-488, 2006)을 통하여 확인하였다.

그 결과 도 20에서 도시된 바와 같이, *ATHG1::GFP*의 발현이 핵 속에서 초록 형광으로 나타남을 확인할 수 있었다. 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(도 21). 이는 *ATHG1* 단백질이 핵으로 이동되어 핵 속에서 기능을 수행한다는 것을 보여주는 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

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

【청구항 2】

제1항의 단백질을 암호화하는 유전자.

【청구항 3】

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

【청구항 7】

제6항에 있어서,

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

【청구항 8】

제6항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 스트레스 내성을 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, (c) 생산량 증가 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 생산량 증가 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 10】

제9항에 있어서,

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

【청구항 11】

제6항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 스트레스 내성을 갖는 식물체의 제조 방법.

【청구항 12】

(a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유

전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키고 (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 삽입시키고 (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법.

【청구항 14】

(a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키고 (b) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 생산량을 증가시키는 방법.

【청구항 15】

상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체.

【청구항 16】

상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체.

【청구항 17】

상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 생산량 증가 특성을 갖는 형질전환 식물체.

【요약서】

【요약】

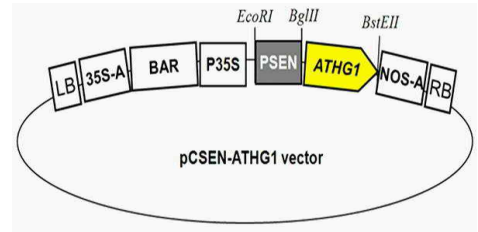
본 발명은 식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도를 개시한다. 상기 유전자로 형질전환된 식물체는 식물체의 노화를 지연시키고, 생산량 증가 특성을 보이며, 환경 스트레스 특히 산화 스트레스 및 가뭄 스트레스에 내성을 보인다.

【대표도】

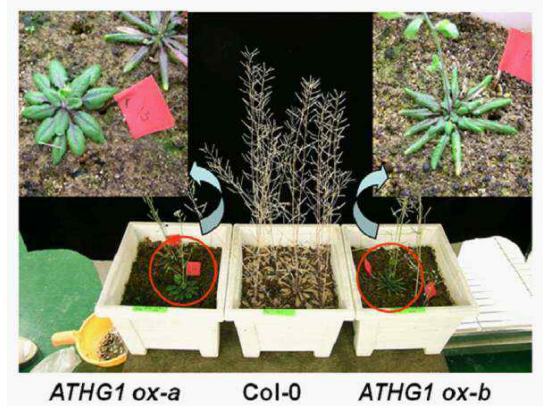
ATHG1, 단백질, 유전자, 노화, 스트레스, 생산량

【도면】

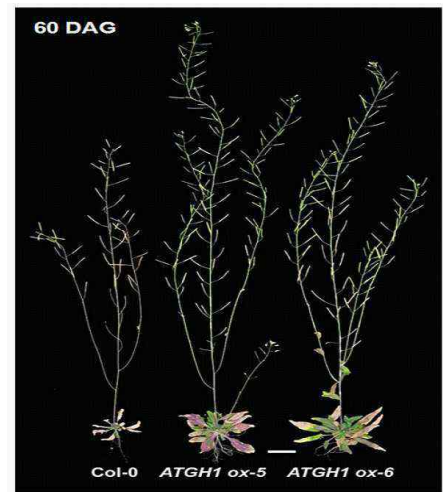
【도 1】



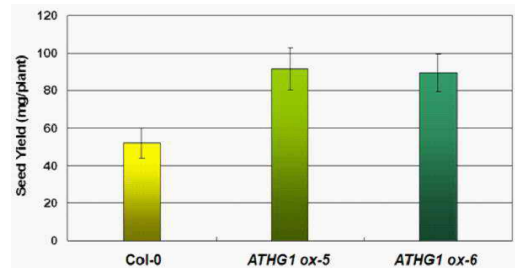
【도 2】



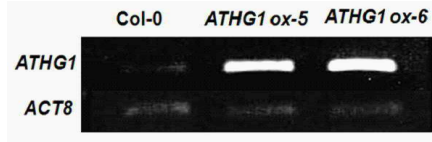
【도 3】



【도 4】



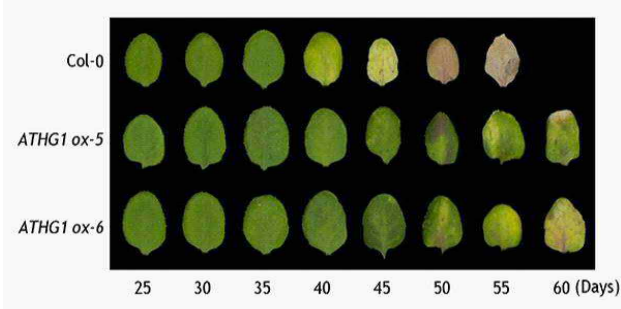
【도 5】



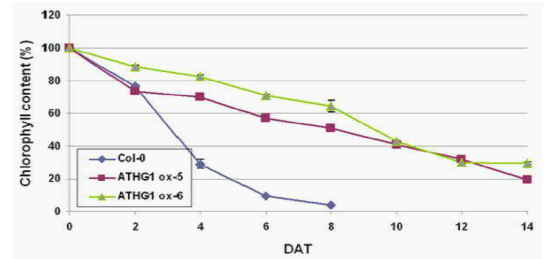
【도 10】



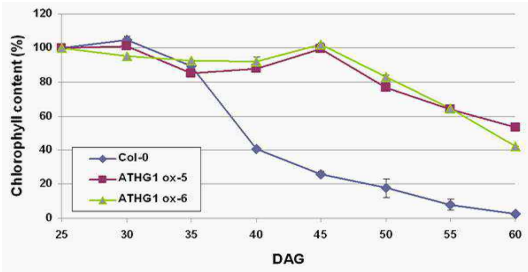
【도 6】



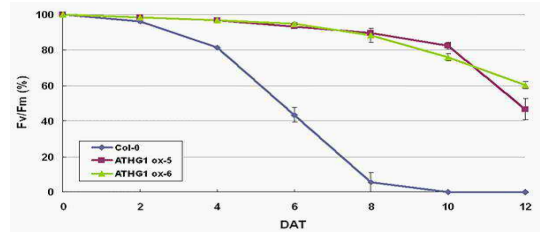
【도 11】



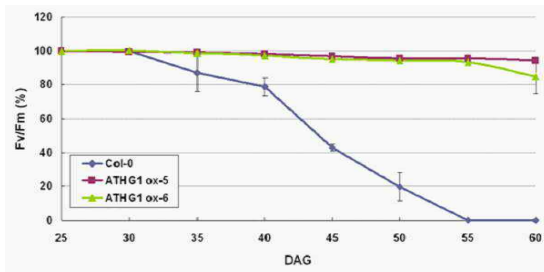
【도 7】



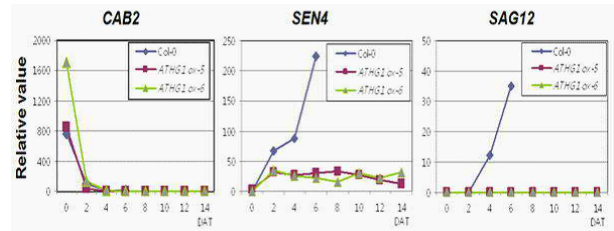
【도 12】



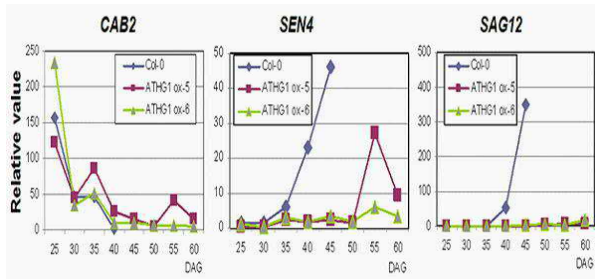
【도 8】



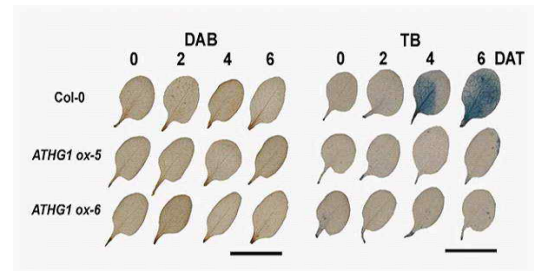
【도 13】



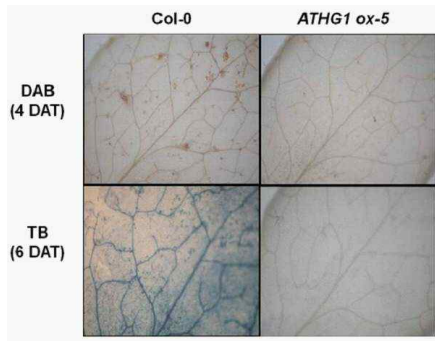
【도 9】



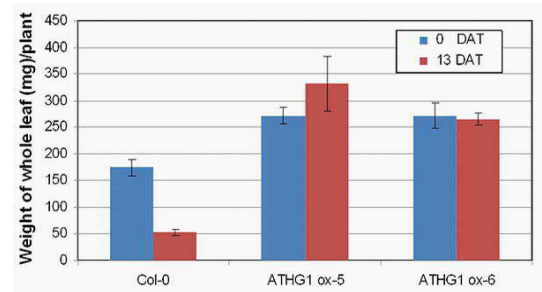
【도 14】



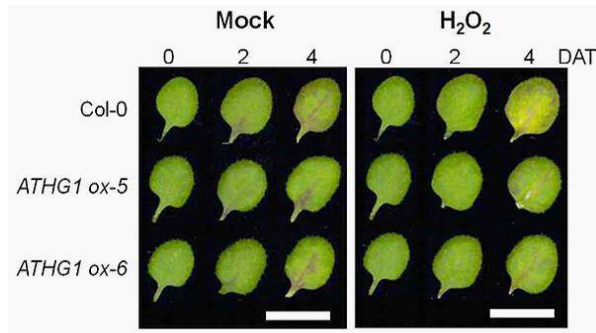
【도 15】



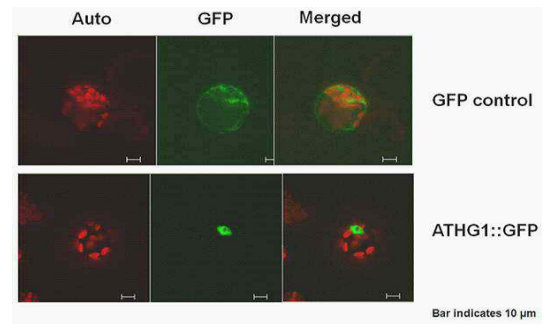
【도 19】



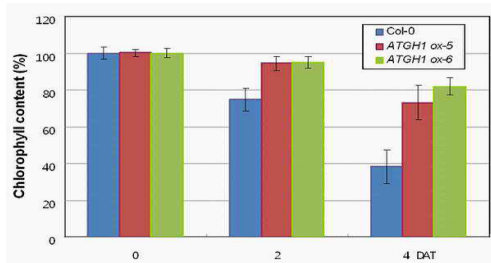
【도 16】



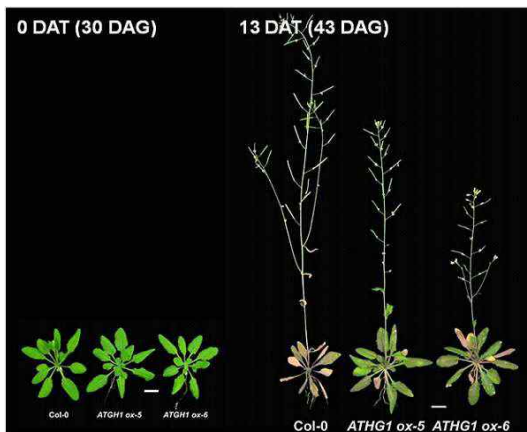
【도 20】



【도 17】



【도 18】



RESEARCH PAPER

Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity

Pyung Ok Lim¹, In Chul Lee², Junyoung Kim², Hyo Jung Kim², Jong Sang Ryu², Hye Ryun Woo^{2,3,*} and Hong Gil Nam^{2,4,*}

¹ Department of Science Education, Jeju National University, 66 Jejudaehakno, Jeju, 690-756, Korea

² Division of Molecular and Life Sciences, Pohang University of Science and Technology, Hyojadong, Pohang, Kyungbuk, 790-784, Korea

³ Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

⁴ National Core Research Center for Systems Bio-Dynamics, Pohang University of Science and Technology, Hyojadong, Pohang, Kyungbuk, 790-784, Korea

* To whom correspondence should be addressed: E-mail: nam@postech.ac.kr/hrwoo@cnu.ac.kr

Received 29 September 2009; Revised 27 December 2009; Accepted 13 January 2010

Abstract

Auxin regulates a variety of physiological and developmental processes in plants. Although auxin acts as a suppressor of leaf senescence, its exact role in this respect has not been clearly defined, aside from circumstantial evidence. It was found here that *ARF2* functions in the auxin-mediated control of *Arabidopsis* leaf longevity, as discovered by screening EMS mutant pools for a delayed leaf senescence phenotype. Two allelic mutations, *ore14-1* and *14-2*, caused a highly significant delay in all senescence parameters examined, including chlorophyll content, the photochemical efficiency of photosystem II, membrane ion leakage, and the expression of senescence-associated genes. A delay of senescence symptoms was also observed under various senescence-accelerating conditions, where detached leaves were treated with darkness, phytohormones, or oxidative stress. These results indicate that the gene defined by these mutations might be a key regulatory genetic component controlling functional leaf senescence. Map-based cloning of *ORE14* revealed that it encodes ARF2, a member of the auxin response factor (ARF) protein family, which modulates early auxin-induced gene expression in plants. The *ore14/arf2* mutation also conferred an increased sensitivity to exogenous auxin in hypocotyl growth inhibition, thereby demonstrating that ARF2 is a repressor of auxin signalling. Therefore, the *ore14/arf2* lesion appears to cause reduced repression of auxin signalling with increased auxin sensitivity, leading to delayed senescence. Altogether, our data suggest that ARF2 positively regulates leaf senescence in *Arabidopsis*.

Key words: Ageing, *Arabidopsis*, ARF2, auxin, leaf longevity, leaf senescence.

Introduction

Senescence is the process of age-dependent programmed cell death that occurs at the cellular, tissue, organ, or organismal level, leading to the end of a lifespan (Noodén, 1988). As with many other biological processes, plant senescence is developmentally programmed and involves orderly, sequential changes in cellular physiology, biochemistry, and gene expression (Bleecker and Patterson, 1997; Nam, 1997; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007a).

Senescence is the last stage in leaf development, during which cells undergo a major transition from carbon assimilation and other anabolic reactions to a catabolic pattern that results in cell dysfunction, structural disintegration and cell death (Hajouj *et al.*, 2000). The most visible characteristics are colour changes, as in autumn foliage or the yellowing of leaves in monocarpic plants. This is due to a preferential breakdown of chlorophyll during chloroplast degradation and the synthesis of other pigments. Other

© 2010 The Author(s).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

metabolic changes include the hydrolysis of macromolecules such as lipids, proteins, and nucleic acids, which accumulated during the growth phase, followed by remobilization to young leaves and reproductive organs. Thus, although it is a deteriorative cellular process, leaf senescence critically contributes to the fitness of whole plants by ensuring their better survival and the optimal production of offspring (Noodén, 1988; Nam, 1997; Lim *et al.*, 2007a).

Because of the rapid decline in photosynthetic capacity in leaves, senescence limits crop yields and plant biomass production. It can also cause post-harvest spoilage, such as leaf yellowing and nutrient loss in vegetable crops. Therefore, studying leaf senescence not only enhances our understanding of a fundamental biological process, but may also provide information on how to control senescence and improve the agricultural traits of crop plants. For example, delayed leaf senescence, with a concomitant preservation of the photosynthetic apparatus in a soybean mutant, increases its seed yield by 44% (Guiamét *et al.*, 1990). Transgenic tobacco with a delayed leaf senescence phenotype also exhibits a 50% improvement in both seed yield and biomass (Gan and Amasino, 1995).

Leaf senescence, as an integral part of plant development, occurs in the last stage of leaf development. It is thus basically governed by developmental age. However, it is also influenced by various internal and environmental signals that are integrated into age information. Environmental factors may include pathogen infection, shading by neighbours, leaf detachment, drought, limited nutrients, extreme temperatures, and oxidative stress. Internal factors may include the formation of reproductive organs and changes in the levels of plant growth regulators (Weaver *et al.*, 1998; Quirino *et al.*, 1999, 2000; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007a). Recent genomics and genetics studies in *Arabidopsis* have provided many insights into molecular events and their regulation during leaf senescence, thereby revealing the nature of regulatory factors and a highly complex molecular network (Woo *et al.*, 2001; Gepstein *et al.*, 2003; Lin and Wu, 2004; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Guo and Gan, 2006; Kim *et al.*, 2006, 2009; van der Graaff *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007b; Miao *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009). In particular, pathways involving the signalling factors sugar and phytohormones, such as cytokinin, ethylene, abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA), salicylic acid, and auxin, are of key importance in senescence (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003, 2005). However, complex interactions among these signalling pathways during senescence have made it difficult to define the actual role and importance of genes within each pathway (He *et al.*, 2001; van der Graaff *et al.*, 2006). Therefore, to date, there is no clear understanding of the key controlling points within senescence signalling networks.

To enhance our knowledge of the molecular basis for leaf senescence, mutagenized *Arabidopsis* populations were screened with ethyl methane sulphonate (EMS) for delayed senescence mutants. This approach allowed us to identify various important positive elements of leaf senescence. Two allelic mutants with markedly delayed leaf senescence were

investigated here. These were designated as *oresara14* (*ore14-1* and *14-2*; *oresara* means 'long-living' in Korean). The *ORE14* gene was identified by map-based cloning, and showed that it encodes auxin response factor 2 (ARF2), one of a family of transcription factors that bind to auxin-responsive elements (AuxREs) in the promoters of auxin-regulated genes (Ulmasov *et al.*, 1997; Liscum and Reed, 2002; Guilfoyle and Hagen, 2007). Recent studies have shown that the *arf2* mutation causes a pleiotropic phenotype, including the increased growth of aerial organs and seed size due to extra cell division, the inhibition of floral bud opening, and delays in flowering, leaf senescence, floral organ abscission, and silique ripening (Ellis *et al.*, 2005; Okushima *et al.*, 2005a; Schruff *et al.*, 2006). These results suggest the involvement of ARF2 in regulating several developmental processes including leaf senescence, although the leaf senescence phenotype of the *arf2* mutants was assessed only visually or was minimally analysed with respect to senescence symptoms or markers.

In our study, the in-depth senescence phenotype of the *ore14/arf2* mutant was further analysed under various senescence-inducing conditions using many senescence parameters in order to unravel the physiological function of ARF2 in the plant leaf senescence network. Our results showed that *ORE14/ARF2* plays an important role in the senescence process modulated by various senescence accelerating conditions, including leaf detachment in darkness, oxidative stress, and phytohormone treatment (ABA, ethylene, or MJ), as well as in age-dependent senescence. It is also demonstrated that ARF2 is a repressor of auxin signalling. Through the analysis of the *ore14/arf2* mutant, it is suggested that the repression of auxin signalling by ARF2 might positively regulate the onset and progression of leaf senescence in *Arabidopsis*. Our results also illustrate that ARF2, among ARF family genes, might be a major player in controlling auxin-mediated leaf longevity.

Materials and methods

Plant materials and isolation of the ore14 mutant

The *ore14* mutants in the *Arabidopsis thaliana* 'Col' wild-type background were identified by screening EMS-mutagenized M2 seeds for delayed leaf senescence, as determined by the delayed loss of chlorophyll during the dark-induced senescence of detached leaves (Oh *et al.*, 1997). Isolated mutants were backcrossed twice with wild-type plants and used for all analyses. Plants for physiological experiments were grown in an environmentally controlled growth room (Korea Instrument, Seoul, Korea) with a 16/8 h light/dark cycle at 23 °C.

Assay of age-dependent leaf senescence

Age-dependent leaf senescence was assayed as described by Woo *et al.* (2001). Quantitative measurements were made of physiological and molecular parameters: chlorophyll content, photochemical efficiency, membrane ion leakage, and gene expression. Chlorophyll was extracted from individual leaves by boiling them in 95% ethanol at 80 °C. The concentration per fresh weight of leaf tissue was calculated as described by Lichtenthaler (1987). The photochemical efficiency of Photosystem II (PSII) was deduced from the characteristics of chlorophyll fluorescence (Oh *et al.*, 1997)

using a portable plant efficiency analyser (Hansatech Instruments, Norfolk, England). The ratio of maximum variable fluorescence to maximum fluorescence yield, which corresponds to the potential quantum yield of the PSII photochemical reactions, represented PSII photochemical reactions (Oh *et al.*, 1997). Membrane ion leakage was determined by measuring electrolytes leaked from leaves (Woo *et al.*, 2001). Two leaves were immersed for 3 h in 3 ml of 400 mM mannitol at 23 °C, with gentle shaking, after which initial conductivity was recorded. Total conductivity was determined after boiling for 10 min. Conductivity was expressed as the percentage of initial conductivity versus total conductivity.

Assay of artificially induced leaf senescence

For dark treatments, the third and fourth leaves at 12 d after their emergence (DAE) were detached and floated on 3 mM MES buffer solution (pH 5.7) and incubated at 23 °C in darkness. For hormone treatments, detached leaves were floated in the same buffer in the presence or absence of 50 µM abscisic acid (ABA; Sigma, USA), 100 µM methyl jasmonate (MJ; Sigma, USA), or 50 µM 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC; Sigma, USA). All hormone treatments were performed at 23 °C under continuous light. For oxidant treatments, detached leaves were floated on MES buffer in the presence or absence of 15 mM hydrogen peroxide. Chlorophyll content and photochemical efficiency were measured as described above.

RNA gel blot analyses

Total RNA was isolated from leaf tissue with Tri-Reagent (Molecular Research Center, USA). Total cellular RNA (10 µg) was size-fractionated by electrophoresis through a 1.2% formaldehyde-agarose gel and transferred onto a nylon membrane. Radiolabelled probes were prepared using a random labelling kit according to the manufacturer's instructions (Amersham, USA). After hybridization, the membranes were washed as previously described (Woo *et al.*, 2001).

Mapping and sequencing

Homozygotes of *ore14-1* in the 'Col' background were crossed with wild-type 'Ler' plants to create a mapping population, and 1391 plants with a delayed leaf senescence phenotype were selected from the F₂ progeny. Genomic DNA from each plant was utilized for mapping the *ORE14* locus relative to the loci of known Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) markers. New CAPS markers for the fine mapping of that locus were generated in the sequence of the BAC clones MTG10 and K22G18. The region near the mapped *ORE14* locus was PCR-amplified and cloned into the pGEM T-easy vector (Promega, USA). Two independent PCR products were sequenced to identify the mutated sequence.

Inhibition of hypocotyl elongation in response to phytohormones

To measure hypocotyl lengths, *Arabidopsis* seedlings were grown for 4 d in continuous darkness on 0.1 × Murashige and Skoog plates that contained various concentrations of NAA (α-naphthaleneacetic acid; Sigma, USA), BA (benzyladenine; Sigma, USA), or ACC (Sigma, USA). The length of hypocotyls was measured from individual plants (*n* > 15), as previously described by Cary *et al.* (1995).

Results

Identification of *Arabidopsis* mutants with delayed leaf senescence

Arabidopsis, a representative monocarpic plant, is a favoured model for molecular and genetic studies of leaf

senescence because its leaves readily undergo easily distinguishable developmental stages and show a well-defined and reproducible senescence programme (Hensel *et al.*, 1993). *Arabidopsis* populations mutagenized with EMS for delayed leaf senescence mutants were screened, which allowed us to identify positive elements of senescence. Initial screening was carried out by visual evaluation of the degree of yellowing caused by chlorophyll loss when detached leaves were incubated in the dark. This technique is widely used for the consistent acceleration of leaf senescence (Oh *et al.*, 1997). One of the mutants, *ore14-1*, which exhibited a delayed leaf senescence phenotype, was selected for further study. This mutation has a pleiotropic effect on vegetative and reproductive development, including the increased growth of aerial organs, inhibited floral bud opening, late flowering, and a delay in stem senescence (Fig. 1). These traits co-segregated with the delayed leaf senescence phenotype (data not shown). Genetic segregation analysis of the senescence phenotype was performed in F₁ and F₂ progeny derived from crosses between wild-type plants and the *ore14-1* mutant. All F₁ plants had normal phenotypes, including senescence symptoms, demonstrating that the *ore14-1* mutation is recessive. In the F₂ generation, 99 plants exhibiting wild-type phenotypes and 29 mutant plants were scored, indicative of 3:1 segregation ($\chi^2=0.37$, $P > 0.05$). This showed that the mutation is inherited as a monogenic recessive trait.

Another mutant, *ore14-2*, with a phenotype similar to that of the *ore14-1* mutant was also isolated. Genetic complementation tests revealed that these two mutations were in fact allelic (data not shown).



Fig. 1. Whole-plant phenotypes of *Arabidopsis* wild-type ('Col', left) and *ore14-1* mutant (right) plants at 35, 46, and 65 d after germination (DAG).

ORE14 is allelic to *ARF2*, which encodes an auxin response factor

The gene responsible for the *ore14-1* mutation was identified by map-based cloning (Fig. 2A). An initial genetic mapping, with CAPS markers, located *ORE14* close to the *LFY* locus on Chromosome 5. CAPS markers were also generated using the genomic sequences of bacterial artificial chromosome clones (Fig. 2A). Among 1391 F_2 progeny, one and two recombinant chromosomes were observed for the markers MTG10-M and K22G18-A, respectively. These mapping data located *ORE14* at approximately 0.03 cM and 0.07 cM from these respective markers (Fig. 2A). The wild-type and mutant nucleotide sequences for the region around the map location of *ORE14* were then compared. A single base change in the *ore14-1* mutant—a G to A substitution—was identified at position 1673 from the translational start of the gene *At5g62000* (Fig. 2B), which encodes auxin response factor 2 (ARF2). This mutation was expected to result in a premature stop codon at position 558 (Trp→stop) in the ARF2 protein. The same region was then sequenced from the *ore14-2* mutant and it was found that a mutation here led to an early termination of translation at position 115 (Arg→stop) (Fig. 2B). Although the levels of *ARF2* transcript of both mutants were comparable to that of wild-type plants (data not shown), these mutations probably cause a complete loss of function through premature trans-

lation termination. We simultaneously investigated a T-DNA insertion line in the *At5g62000* gene, Salk_041472 line (*arf2-5*). The *arf2-5* plants also exhibited phenotypes similar to those with the *ore14* mutation, including delayed leaf senescence (data not shown). Several *arf2* alleles were previously identified and designated as *arf2-1* to *arf2-9* (Ellis et al., 2005; Schruff et al., 2006); the *ore14-1* and *ore14-2* alleles are *arf2-10* and *arf2-11*, respectively.

Auxin response factor 2 (ARF2) belongs to a family of transcription factors that bind to auxin-responsive elements (AuxREs) in the promoters of auxin-regulated genes (Ulmasov et al., 1997). In previous studies utilizing T-DNA insertion lines, the *ARF2* gene was suggested to play a role in several developmental processes, such as cell division, organ growth, flowering, senescence, and abscission (Ellis et al., 2005; Okushima et al., 2005a; Schruff et al., 2006). However, the effect of ARF2 on leaf senescence has not been extensively examined. This led us to examine further the phenotype of the *ore14/arf2* mutant with several senescence parameters under various senescence induction conditions.

The ore14/arf2 mutant exhibits extended leaf longevity during age-dependent senescence

The senescence symptoms of the *ore14-1/arf2-10* mutant were first examined in detail during age-dependent *in*

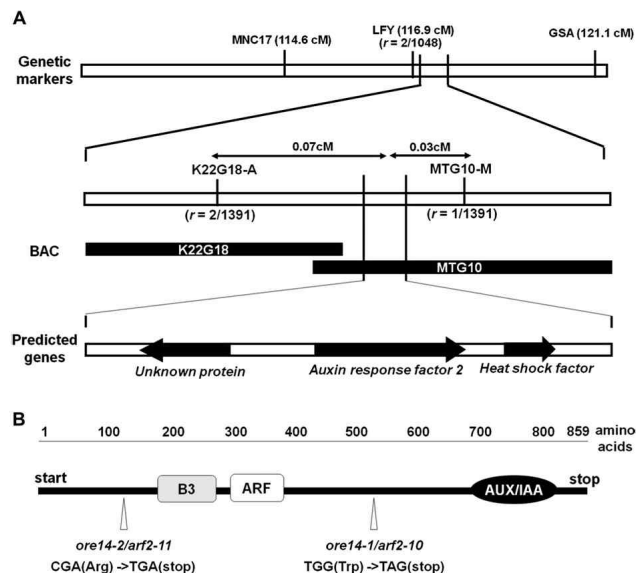


Fig. 2. *ORE14* is auxin response factor 2 (ARF2). (A) Map-based cloning of *ORE14*. The number of recombination events between CAPS markers and the *ORE14* locus (r) is shown; BAC, bacterial artificial chromosome; cM, centimorgan. (B) Schematic representation of *ORE14* with positions of the *ore14-1* and *14-2* mutations; B3, DNA binding domain; ARF, auxin response region; AUX/IAA, domain involved in dimerization with other ARFs or Aux/IAA.

planta senescence. For an accurate assay, two factors were considered. First, in our experiment, leaf senescence was measured on a single leaf base with its age information. Measuring senescence parameters with a mixture of several leaves at a given plant age is not a valid analysis for leaf senescence, since the individual leaves of a plant have different ages. Only the third and fourth rosette leaves of a given plant were used here. The emergence time and growth rate of the fourth leaf was almost identical in wild-type plants and the *ore14-1larf2-10* mutant. Second, the senescence symptom was measured with various parameters that cover various aspects of senescence physiology.

Leaf yellowing is a convenient visible indicator, mainly reflecting the chloroplast senescence of mesophyll cells. Age-dependent leaf yellowing using the fourth rosette leaf of mutant and wild-type plants were examined first. Wild-type leaves started to turn yellow at the leaf age of 20 d. Leaf age here means the age of the leaf under assay, counting from its visible emergence. After 20 d, yellowing gradually spread to the whole leaf. Wild-type leaves finally showed signs of necrosis at the age of 36 d (Fig. 3A). By contrast, *ore14-1larf2-10* mutant leaves started to turn yellow at the age of 28 d, i.e. 8 d later than wild-type leaves. They progressed more slowly, so that complete yellowing was not seen in the mutant until 44 d after emergence (DAE). Even then, however, the integrity of the mutant leaf shape was still maintained (Fig. 3A). When the point was determined at which the survival of the entire leaf population per plant was 50%, it was found that the leaf longevity of the *ore14-1larf2-10* mutant was extended by 35%, from 26 DAE to 35 DAE (Fig. 3B).

Symptoms of age-dependent senescence were then quantitatively investigated by measuring changes in several parameters, such as chlorophyll content, photochemical efficiency, membrane ion leakage, and the expression of senescence-associated genes. Chlorophyll amounts in wild-type leaves started to decrease rapidly after 20 DAE. By the age of 28 d, the chlorophyll content was reduced to 27% of that of 12 DAE leaves (mature green stage). By contrast, losses in the *ore14-1larf2-10* mutant were slower, with 52% of its chlorophyll remaining at 36 DAE (Fig. 3C). The change in the photochemical efficiency (F_v/F_m) of PSII was also monitored as an index of functional leaf senescence (Oh *et al.*, 1997). As shown in Fig. 3D, the photochemical efficiency of wild-type leaves declined to 38% by the age of 32 d, whereas that of *ore14-1larf2-10* leaves remained almost unchanged until the age of 32 d and declined only to 39%, even at the age of 44 d. This showed that the functional integrity of PSII was maintained much longer in mutant leaves. Similar observations were made for these two parameters with the *ore14-2larf2-11* mutant (Fig. 3C, D). Senescence also involves the disruption of plasma membrane integrity as the final step in cell death. This can be conveniently quantified by monitoring ion leakage. It was found that leaf senescence was delayed in the *ore14-1larf2-10* mutant, as shown by slower increases in membrane ion leakage of the leaves with aging (Fig. 3E).

Moreover, in the *ore14-1larf2-10* mutant, a photosynthesis-related chlorophyll *alb*-binding protein gene (*CAB*) and a ribulose biphosphate carboxylase small subunit gene (*RBCS*) were expressed at higher levels at the later stages, while the induction of two senescence-associated genes, *SEN4* and *SAG12*, was delayed (Fig. 3F). These results indicated that the *ore14-1larf2-10* mutation considerably extends leaf longevity and delays leaf senescence, controlling various senescence-associated physiological and molecular symptoms. Thus, these results suggest that ORE14/ARF2 plays an important role in regulating the leaf senescence process.

Delays in artificially induced senescence

Darkness is one of the most potent external stimuli that accelerate leaf senescence. The responses were compared of the *ore14-1larf2-10* mutant and wild-type plants during dark-induced senescence. To minimize developmental effects, fully grown third and fourth leaves were detached at 12 DAE (mature green stage). Those from the wild-type plants lost 90% of their chlorophyll after 6 d of dark incubation. However, for the mutant, the chlorophyll content declined much more slowly; even after 6 d, over 70% was retained (Fig. 4A, B). Measurement of the photochemical efficiency showed that, after 8 d of incubation, *ore14-1larf2-10* mutant leaves still maintained over 65% of their initial PSII activity, while wild-type leaves completely lost this activity (Fig. 4C). A relatively slower increase in membrane ion leakage in the *ore14-1larf2-10* mutant was also observed (Fig. 4D). Consistent with these physiological data, the induction level of *SEN4*, a molecular marker for dark-induced senescence, was much lower in the mutant during dark incubation (Fig. 4E).

It was then tested whether the *ore14-1larf2-10* mutation affects phytohormone-induced leaf senescence. Three hormones in particular—ABA, MJ, and ethylene—strongly hasten leaf senescence (He *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2007b). Before examining hormone-induced leaf senescence symptoms, the effect of light alone was evaluated first as a control experiment. When detached leaves were exposed to light in the presence of MES buffer alone, no significant changes in chlorophyll content and PSII activity in wild-type or mutant leaves were observed (Fig. 5A). To determine whether ORE14/ARF2 is involved in the senescence process induced by senescence-accelerating phytohormones, the senescence symptoms of the *ore14-1larf2-10* mutant were examined after treatment with these hormones. When detached leaves were treated with MJ, ABA, or ethylene, a rapid decrease in chlorophyll was observed in wild-type leaves and, 5 d after incubation, the chlorophyll of wild-type leaves was reduced to less than 20%. However, *ore14-1larf2-10* mutant leaves retained more than 80% of chlorophyll following treatment with these hormones at 5 d after incubation (Fig. 5B–D). A similar pattern was observed when PSII activity was measured. These data clearly showed a delay of leaf senescence in the *ore14-1larf2-10* mutant during plant hormone-accelerated

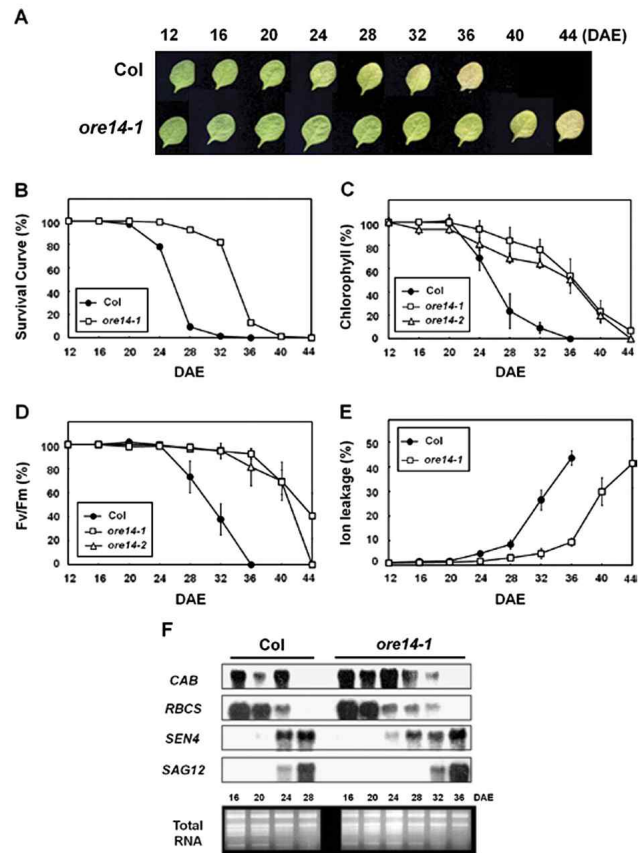


Fig. 3. Extended leaf longevity in *ore14/arf2* mutants. (A) Age-dependent senescence phenotype of the third and fourth rosette leaves of wild-type ('Col') and *ore14-1/arf2-10* mutant plants at different ages. The photographs show representative leaves at each time point. (B) Survival curve. Values indicate the percentage of leaves alive on a given day after emergence (DAE). $n=100$. (C–E) Chlorophyll content (C), photochemical efficiency (F_v/F_m) of PSII (D), and membrane ion leakage (E) were measured from the third and fourth leaves starting at 12 DAE, when leaves had just reached full growth. Error bars indicate standard deviation (SD, $n=30$). (F) Age-dependent changes in gene expression. Total cellular RNAs isolated at the indicated ages were probed with *CAB*, *RBCS*, *SEN4*, and *SAG12*.

senescence. These results imply that ORE14/ARF2 might be a regulator in controlling the senescence process modulated by these hormones, as well as in age-dependent and dark-induced senescence.

Resistance of the *ore14-1/arf2-10* mutant to oxidative stress

Reactive oxygen species play a critical role in mediating oxidative damage and accelerating senescence in a variety of organisms (Reilly et al., 2004). Potential life spans are

positively correlated with plant tolerance to oxidative stress. The oxidative stress tolerance of the *ore14-1/arf2-10* mutant was therefore assessed. For this experiment, the procedure that was used for assaying phytohormone-induced senescence symptoms was adapted and hydrogen peroxide was used as an oxidant. Under such exposure, both chlorophyll content and PSII activity declined rapidly in the wild type. By contrast, the *ore14-1/arf2-10* mutant retained over 80% of its chlorophyll and 95% of the original PSII activity, even at 5 d after treatment (Fig. 6A, B). Thus, the *ore14-1/arf2-10* mutation conferred greater resistance to oxidative stress,

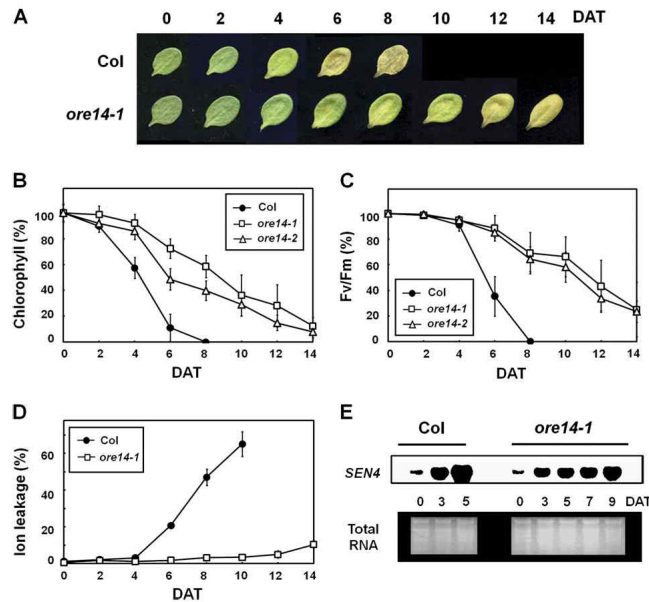


Fig. 4. Delayed leaf senescence of *ore14/arf2* mutants during dark-induced senescence. (A) Phenotypes of wild-type and *ore14* mutant leaves. The third and fourth rosette leaves were detached at the age of 12 d and incubated in darkness; DAT, days after treatment. (B–D) Chlorophyll content (B), photochemical efficiency (F_v/F_m) of PSII (C), and membrane ion leakage (D) were examined every 2 d after dark treatment. Error bars indicate SD ($n=24$). (E) Expression of *SEN4*. Total cellular RNAs were isolated from wild-type and *ore14-1/arf2-10* mutant leaves at the days indicated.

one of the major determinants of senescence. These results further indicate that ORE14/ARF2 might be a central regulator of leaf senescence. The data also support our previous finding that oxidative stress tolerance is linked to the control of leaf longevity (Woo *et al.*, 2004).

ARF2 is a repressor of auxin signalling

The ARF family of transcription factors regulates many responses to auxin. These proteins bind to auxin response elements in the promoters of auxin-regulated genes and activate or repress transcription (Ulmasov *et al.*, 1997). Most ARFs have three domains: an N-terminal DNA-binding domain, a C-terminal dimerization domain, and a middle region (MR) that activates or represses transcription (Ulmasov *et al.*, 1999). ARFs containing glutamine-rich MRs, for example, ARF5 and ARF19, function as activators of auxin-responsive gene expression *in vivo* (Nagpal *et al.*, 2005; Okushima *et al.*, 2005b; Wilmoth *et al.*, 2005) and in transiently transfected protoplasts (Ulmasov *et al.*, 1999). By contrast, ARFs containing proline- and/or serine-rich MRs, such as ARF1 and ARF2, have been suggested to

repress auxin-responsive gene expression in protoplast transient assays (Tiwari *et al.*, 2003, 2004).

To test whether ARF2 represses auxin signalling *in vivo*, the growth responses of *ore14-1/arf2-10* hypocotyls to exogenous phytohormones was examined. In wild-type seedlings, exogenous NAA (a synthetic auxin) inhibits hypocotyl growth. This response was enhanced in the *ore14-1/arf2-10* mutant (Fig. 7A). The hypocotyl growth inhibition responses of the *ore14-1/arf2-10* mutant to cytokinin and ethylene was also examined. Exogenous applications of BA (a synthetic cytokinin) or ACC (an immediate biosynthetic precursor of ethylene) inhibited wild-type hypocotyl growth. However, in contrast to the case with NAA, *ore14-1/arf2-10* hypocotyls showed a nearly normal inhibition response to BA or ACC (Fig. 7B, C), although they were slightly more sensitive at $>1 \mu\text{M}$ ACC. These results indicate that the *ore14-1/arf2-10* mutation does not cause defects in the known signal transduction pathways that underlie the perception and response to ethylene or cytokinin. They also suggest that *ore14-1/arf2-10* preferentially alters the auxin response, at least with regard to hypocotyl growth. Together, these data demonstrate that ARF2 is a true repressor of auxin signalling,

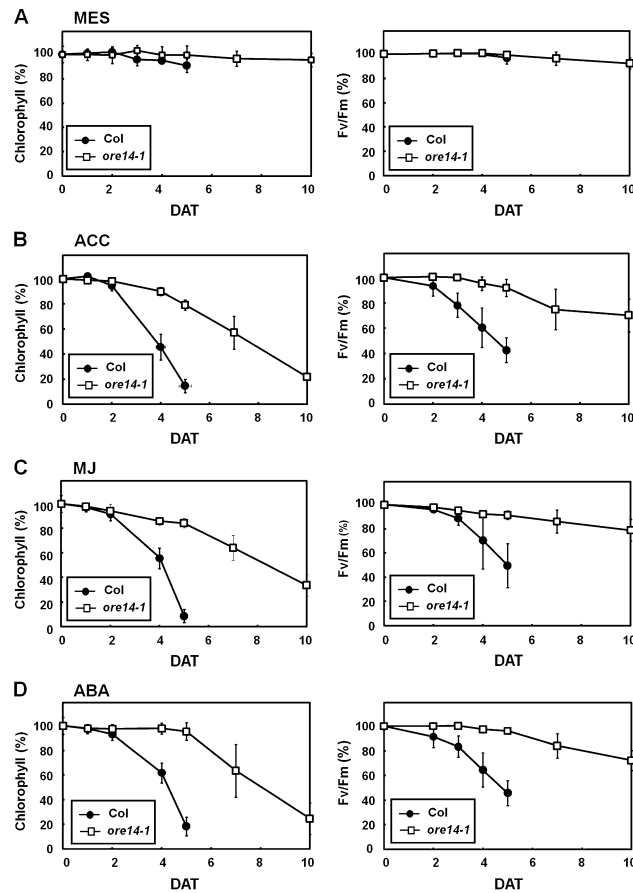


Fig. 5. Delay of leaf senescence in the *ore14-1/arf2-10* mutant during senescence accelerated by phytohormones. The third and fourth rosette leaves were detached at the age of 12 d and incubated under continuous light in MES buffer alone (A), with 50 μ M ACC (B), 100 μ M MJ (C), or 50 μ M ABA (D). Chlorophyll content and photochemical efficiency are presented as average percent values \pm SD, relative to those of leaves incubated in light; $n=24$. DAT, days after treatment.

supporting previous results from protoplast transient assays (Tiwari *et al.*, 2003).

Discussion

ORE14/ARF2 affects a broad spectrum of leaf senescence symptoms

In a screen for *Arabidopsis* mutants exhibiting delayed leaf senescence, two *ore14* mutations were identified, each of which contains a lesion in *ARF2*. These mutations also

confer pleiotropic developmental phenotypes, including delays in flowering and floral organ abscission, and inhibition of floral bud opening in early-formed flowers. These phenotypes have also been reported for other *arf2* mutant alleles (Ellis *et al.*, 2005; Okushima *et al.*, 2005a). The *arf2/mnt1* mutation can also cause the increased growth of aerial organs and more cell divisions (Schruff *et al.*, 2006). The pleiotropic effects of *arf2/mnt1/ore14* mutations may hamper assaying the effect of the gene on senescence. In particular, when minimally analysed with respect to senescence symptoms or markers, for example, the use of a single senescence symptom such as yellowing or loss of

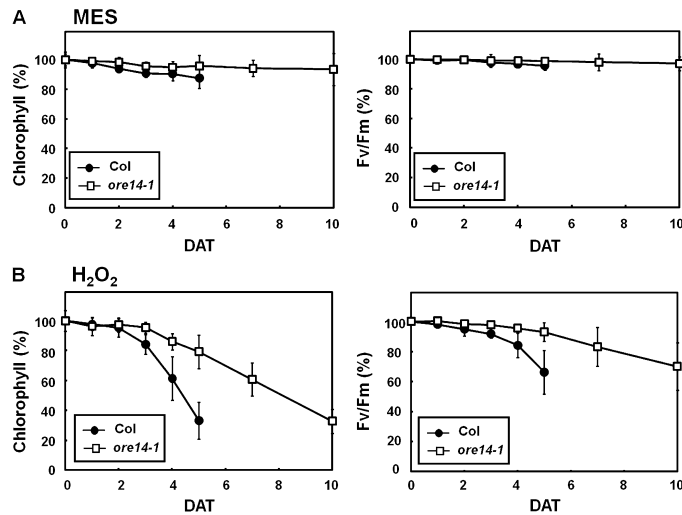


Fig. 6. Delay of leaf senescence in the *ore14-1* mutant during senescence accelerated by oxidative stress. The third and fourth rosette leaves were detached at the age of 12 d and incubated under continuous light in MES buffer alone (A) and with 15 mM hydrogen peroxide (B). Chlorophyll content and photochemical efficiency are presented as average per cent values \pm SD, relative to those of leaves incubated in light ($n=24$). DAT, days after treatment.

chlorophyll, interpretation may be misleading. In order to show that the *ARF2* mutation delays functional senescence, the *ore14* mutations were analysed in detail by examining several anabolic and catabolic parameters. The fact that these mutations influenced all the parameters indicated that the affected plants are functional 'stay-green' mutants, and that they are not just delayed in their loss of chlorophyll. This implies that ORE14/ARF2 might be a key regulatory factor involved in leaf senescence rather than just one of the components that executes the process (Smart, 1994; Oh *et al.*, 1997). It was also found that ORE14/ARF2 is required for the proper progression of leaf senescence induced by darkness, phytohormones, and oxidative stress, as well as by age. These results suggest that ORE14/ARF2 functions in a step common to all these processes. The data also support the idea that these senescence-inducing factors, developmental age, dark, hormones, and oxidative stress, all share a common senescence pathway.

The apparently pleiotropic effects of the *arf2* mutation, such as reduced sterility or late flowering, may be associated with delayed leaf senescence, but are unlikely to be its cause. This is because, unlike many other monocarpic species, senescence of individual *Arabidopsis* leaves is not closely linked with the development of reproductive structures (Hensel *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 2007a). Both ethylene and cytokinin have a major effect on leaf senescence. Ethylene-insensitive plants, such as *etr1* and *ein2* mutants, have a delayed leaf senescence phenotype (Grbic and Bleecker, 1995). Similarly, *ore12-1*, a gain-of-function mutation in

AHK3 (a cytokinin receptor), confers extended leaf longevity (Kim *et al.*, 2006). To determine whether our *ore14arf2* phenotype is independent of the ethylene and cytokinin signal transduction pathways, hypocotyl elongation was monitored in response to these hormones. No significant differences were found between mutant and wild-type hypocotyls (Fig. 7), although the mutant exhibited a slightly enhanced sensitivity at high ACC concentrations (1–10 μ M). This enhanced sensitivity might be due to an indirect effect of altered auxin signalling. Nevertheless, it is inferred that the delayed leaf senescence phenotype of *ore14arf2* plants is not due to alterations in cytokinin or ethylene sensitivity. A similar report was made by Ellis *et al.* (2005), who based their findings on the fact that the *ein2* and *arf2* mutations act additively in delaying leaf senescence symptoms, and that the relative deferment in chlorophyll loss caused by exogenous cytokinin is similar in both wild-type and *arf2* plants. It was also observed that the responses of the *ore14arf2* seedlings to ABA and MJ were similar to those of wild-type seedlings (data not shown). These results, in turn, indicate that the delayed senescence symptoms of the *ore14arf2* mutant during phytohormones-induced senescence are not due to defects in the perception of these hormones.

Since leaf senescence is intimately related to previous developmental stages, such as initiation, growth, and maturation, it is possible that genes controlling all these processes, including cell division, could affect age-dependent senescence. This has been demonstrated in leaves from the *bop1-1*

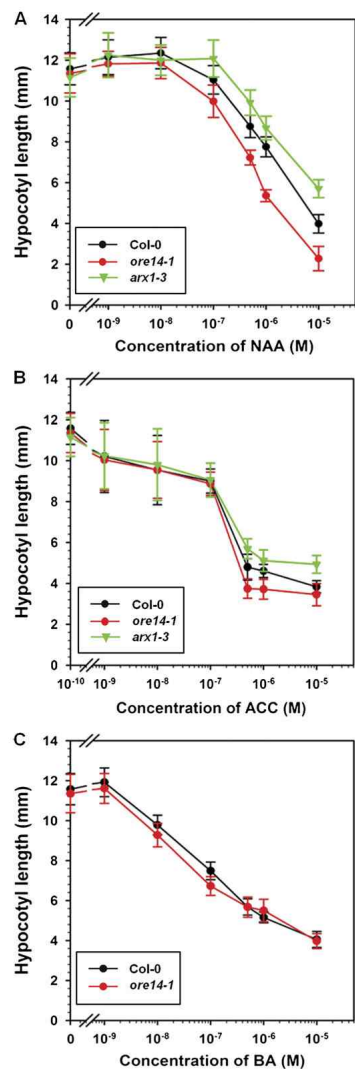


Fig. 7. Hypocotyl growth inhibition responses to exogenous phytohormones. Seedlings of wild type ('Col') and the *ore14-1* mutant were grown for 4 d in various concentrations of NAA (A), ACC (B), or BA (C). The *auxin resistant 1-3* (*axr1-3*) mutant was included as an internal control. At least 20 seedlings were sampled for each treatment. Bars indicate standard errors.

mutant, which has enhanced meristematic activity (Ha *et al.*, 2003). Likewise, organs in *arf2/mnt1/ore14* mutants, including the leaves, are larger than those of wild-type plants, due to extra cell divisions and expansion (Schruff *et al.*, 2006). Thus, it is possible that extended leaf longevity in *ore14* mutants might be related to increased cell division activity. However, because the delayed senescence phenotype of *ore14/arf2* was also observed under artificially induced senescence conditions, we believe that this possibility is very low.

Role of ARF2 in auxin signalling

ARFs with a glutamine-rich MR might function as activators of auxin-responsive gene expression in transiently transfected protoplasts, while ARFs with proline- and/or serine-rich MRs, such as ARF1 or ARF2, repress the transcription of reporter genes under the control of synthetic AuxREs (Tiwari *et al.*, 2003). However, when compared with the global gene expression profiling of liquid-cultured *arf2* seedlings or the inhibition of root growth by exogenous auxin, no significant effect of the mutation was observed (Okushima *et al.*, 2005a). The fact that the *arf2* mutation does not affect auxin-induced or -repressed genes indicates that ARF2 does not participate in auxin signalling in a particular developmental stage or organ. However, in contrast to earlier reports, it was observed that the *ore14/arf2* mutant exhibited enhanced sensitivity to auxin, as assessed by the inhibition of hypocotyl growth. This implies that ARF2 functions as a transcription repressor of auxin-responsive gene expression, as previously proposed by Tiwari *et al.* (2003). The results seen here along with other data also suggest that ARF2-mediated auxin signalling is temporally and spatially regulated.

Other studies have shown that ARF2 links brassinosteroid (BR) and auxin biosynthetic pathways (Vert *et al.*, 2008). Thus, the effect of the *ore14/arf2* mutation on auxin responses might be due to an altered BR response. However, in the study of Vert *et al.* (2008) no difference in response to exogenous BR was detected between the wild type and the mutant, indicating that the *ore14/arf2* mutation does not cause defects in BR perception and response. Conceivably, an increased sensitivity to auxin conferred by the *arf2* mutation might not be due to an altered BR response.

ARF2 is a major player in the auxin-mediated control of leaf longevity

The role of auxin in leaf senescence has been elusive, particularly due to its involvement in various aspects of plant development. However, evidence that auxin has a role in suppressing leaf senescence has accumulated. Shoji *et al.* (1951) reported that auxin levels decline with leaf age. The exogenous application of auxin to leaves represses transcription of some senescence-associated genes (Noh and Amasino, 1999). Together, these results imply that

decreased auxin levels along with leaf age might induce the initiation and/or progression of leaf senescence, indicating that auxin is a negatively acting factor of leaf senescence. Genetic mutations that alter auxin signalling also support the involvement of auxin in controlling leaf senescence (Ellis *et al.*, 2005).

What is the major player in the auxin-mediated control of leaf senescence? ARFs regulate auxin-mediated transcriptional activation and repression, and each ARF protein is thought to play a central role in various auxin-mediated developmental processes. A few lines of our data, together with previous results, indicate that ARF2 might be a major player in the auxin-mediated control of leaf senescence. First, ARF2 affects many aspects of senescence, whether induced by age, darkness, hormones, or oxidative stress. Second, phenotypic analyses of T-DNA insertion lines for *ARF* family genes have revealed that ARF2 plays a major role in controlling leaf senescence and that ARF1 acts only in a partially redundant manner (Ellis *et al.*, 2005). Third, microarray analysis has shown that *ARF2* transcripts increase in senescing leaves when induced by developmental ageing or darkness (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Ellis *et al.*, 2005). The *ARF7* and *ARF19* genes are also induced in senescing leaves (Lin and Wu, 2004). However, mutations in these genes do not alter the leaf senescence phenotype, although they enhance the delay in senescence conferred by the *arf2* mutation (Ellis *et al.*, 2005).

How then is leaf senescence delayed in the *arf2hmt11 ore14* mutant? With the theory that auxin functions as a suppressor of leaf senescence and that ARF2 is a repressor of auxin signalling, it is conceivable that the reduced functioning of ARF2 in the mutant can cause less repression of auxin signalling with increased auxin sensitivity, leading to delayed senescence. Our data, as well as previous results, suggest that auxin has a role in suppressing leaf senescence, but suppression is decreased with leaf ageing, possibly through the increased activity of ARF2. Further studies on the identification of ARF2 downstream target genes or interacting proteins will help to dissect the senescence pathways involved in the ARF2-mediated control of leaf longevity.

Acknowledgements

We thank KH Suh, YS Park, and BH Kim for excellent technical assistance. We also thank Priscilla Licht and Patrick Hughes (Bioedit® Ltd) for critical proofreading of the manuscript. This work was supported by grants from the Crop Functional Genomics Research Program (to HGN; CG1311) and the MOST/KOSEF to the National Core Research Center for Systems Bio-Dynamics (R15-2004-033). The work by POL was supported by the Priority Research Centers Program (2009-0094060) and the Basic Research Program (2009-0067967) through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science, and Technology. This work was also supported by TDDPAF (107098-3).

References

- Bleecker AB, Patterson SE. 1997. Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **9**, 1169–1179.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D. 2003. The molecular analysis of leaf senescence: a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**, 3–22.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, *et al.* 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **42**, 567–585.
- Cary AJ, Liu W, Howell SH. 1995. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology* **107**, 1075–1082.
- Ellis CM, Nagpal P, Young JC, Hagen G, Guilfoyle TJ, Reed JW. 2005. AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4563–4574.
- Gan S, Amasino RM. 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986–1988.
- Gepstein S, Sabehi G, Carp MJ, Hajouj T, Neshor MF, Yariv I, Dor C, Bassani M. 2003. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *The Plant Journal* **36**, 629–642.
- Grbic V, Bleecker AB. 1995. Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **8**, 595–602.
- Guamét JJ, Teeri JA, Noodén LD. 1990. Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean. *Plant and Cell Physiology* **31**, 1123–1130.
- Guilfoyle TJ, Hagen G. 2007. Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 453–460.
- Guo Y, Gan S. 2006. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal* **46**, 601–612.
- Ha CM, Kim GT, Kim BC, Jun JH, Soh MS, Ueno Y, Machida Y, Tsukaya H, Nam HG. 2003. The *BLADE-ON-PETIOLE 1* gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in *Arabidopsis*. *Development* **130**, 161–172.
- Hajouj T, Michelis R, Gepstein S. 2000. Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiology* **124**, 1305–1314.
- He Y, Tang W, Swain JD, Green AL, Jack TP, Gan S. 2001. Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology* **126**, 707–716.
- Hensel L, Grbic V, Baumgarten DA, Bleecker AB. 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **5**, 553–564.
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I. 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*.

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **103**, 814–819.

Kim J, Kim Y, Yeom M, Kim JH, Nam HG. 2008. FIONA1 is essential for regulating period length in the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell* **20**, 307–319.

Kim JH, Woo HR, Kim J, Lim PO, Lee IC, Choi SH, Hwang D, Nam HG. 2009. Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis*. *Science* **323**, 1053–1057.

Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **18**, 350–382.

Lim PO, Kim Y, Breeze E, et al. 2007b. 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, Kim HJ, Nam HG. 2007a. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115–136.

Lin JF, Wu SH. 2004. Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* **39**, 612–628.

Liscum E, Reed JW. 2002. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology* **49**, 387–400.

Miao Y, Smykowski A, Zentgraf U. 2008. A novel upstream regulator of WRKY53 transcription during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **10**, (Supplement 1)110–120.

Nagpal P, Ellis CM, Weber H, et al. 2005. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**, 4107–4118.

Nam HG. 1997. Molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 200–207.

Noh YS, Amasino R. 1999. Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology* **41**, 181–194.

Noodén LD. 1988. The phenomenon of senescence and aging. In: Noodén LD, Leopold AC, eds. *Senescence and aging in plants*. San Diego, CA: Academic Press, 2–50.

Oh SA, Park JH, Lee GI, Paek KH, Park SK, Nam HG. 1997. Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **12**, 527–535.

Okushima Y, Mitina I, Quach HL, Theologis A. 2005a. AUXIN RESPONSE FACTOR2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *The Plant Journal* **43**, 29–46.

Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, et al. 2005b. Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell* **17**, 444–463.

Quirino BF, Noh YS, Himelblau E, Amasino RM. 2000. Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* **5**, 278–282.

Quirino BF, Normanly J, Amasino RM. 1999. Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Molecular Biology* **40**, 267–278.

Reilly K, Gomez-Vasquez R, Buschmann H, Tohme J, Beeching JR. 2004. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Molecular Biology* **56**, 625–641.

Schruff MC, Spielman M, Tiwari S, Adams S, Fenby N, Scott RJ. 2006. The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* **133**, 251–261.

Shoji K, Addicott FT, Swets WA. 1951. Auxin in response to leaf blade abscission. *Plant Physiology* **26**, 189–191.

Smart CM. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **126**, 419–448.

Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T. 2003. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *The Plant Cell* **15**, 533–543.

Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ. 2004. Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *The Plant Cell* **16**, 533–543.

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* **9**, 1963–1971.

Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1999. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**, 5844–5849.

van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flugge UI, Kunze R. 2006. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology* **141**, 776–792.

Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL. 2008. Integration of auxin and brassinosteroid pathway by auxin response factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**, 9829–9834.

Weaver LM, Gan S, Quirino B, Amasino RM. 1998. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* **37**, 455–469.

Wilmoth JC, Wang S, Tiwari SB, Joshi AD, Hagen G, Guilfoyle TJ, Alonso JM, Ecker JR, Reed JW. 2005. NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *The Plant Journal* **43**, 118–130.

Woo HR, Chung KM, Park JH, Oh SA, Ahn T, Hong SH, Jang SK, Nam HG. 2001. ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **13**, 1779–1790.

Woo HR, Kim JH, Nam HG, Lim PO. 2004. The delayed leaf senescence mutants of *Arabidopsis*, ore1, ore3, and ore9 are tolerant to oxidative stress. *Plant and Cell Physiology* **45**, 923–932.

Zhou C, Cai Z, Guo Y, Gan S. 2009. An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiology* **150**, 167–177.

Note

Production of unbolting lines through gamma-ray irradiation mutagenesis in genetically modified herbicide-tolerant *Zoysia japonica*

Tae-Woong Bae¹⁾, Joonki Kim¹⁾, In-Ja Song¹⁾, Seo-Young Song²⁾, Pyung-Ok Lim^{1,3)}, Pill-Soon Song^{1,4)} and Hyo-Yeon Lee^{2,4,5)}

¹⁾ Subtropical Horticulture Research Institute, Cheju National University, Jeju, 690-756, Korea

²⁾ Department of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

³⁾ Department of Science Education, Cheju National University, Jeju, 690-756, Korea

⁴⁾ Department of Biotechnology, Cheju National University, Jeju, 690-756, Korea

⁵⁾ Applied Radiological Science Research Institute, Cheju National University, Jeju, 690-756, Korea

We have developed a genetically engineered herbicide-tolerant *Zoysia* grass with potential commercial value. However, the possible flow of genes to wild-type or neighboring plant species raises ecological and commercial concerns, although herbicide-tolerant GM *Zoysia* grass does not appear to pose a significant risk. One efficient way to prevent transgene escape in GM plants is to control fertility. Thus, we attempted to generate GM *Zoysia* mutants with defects in the development of reproductive organs, but that can be vegetatively propagated. To induce mutation, a range of γ -rays from 10 to 50 Gy, initially determined to be the optimal dose for inducing mutation, was used to irradiate GM *Zoysia* during the pollination stage. Notably, nine (4%) lines displayed defects in the floral transition from the vegetative to reproductive phase, while all non-irradiated GM *Zoysia* grasses developed normally. Under greenhouse conditions (natural light and temperature), these GM *Zoysia* lines have been vegetatively propagated for four years without forming reproductive structures. This technology could also be applied in other GM plants being cultivated through vegetative propagation, such as creeping bent grass.

Key Words: herbicide-tolerant, transgene escape, *Zoysia japonica*, gamma rays.

Introduction

Transgenic technology has produced many crops with highly improved genetic traits. However, the potential economic benefits of transgenic technology have not yet been fully realized because of concerns over the possibility of transgene escape through the dispersal of viable pollens and/or dissemination of seeds to wild-type or neighboring plant species that cause the unintended ecological consequences of potential transgene introgression (Reichman *et al.* 2006). This is especially important when the genetically modified (GM) plants are perennials, wind-pollinated, and highly outcrossing transgenic crops (Watrud *et al.* 2004). Thus, the development of technologies that mitigate or eliminate any potential risks of transgene escape in these GM plants might be critical for field release. Several lines of evidence have shown that genetically engineered male sterility can be used to ef-

fectively control pollen-mediated transgene flow (Khan 2005, Ruiz and Daniell 2005). However, this technology requires patrilineal plants for successful pollination, as well as the introduction of other transgenes (e.g., *barnase*) for conferring male sterility (Ho *et al.* 2001).

As a perennial monocot species, *Zoysia japonica* is one of the most popularly cultivated grasses and commercially important species. Recently, we evaluated the environmental risks of the herbicide-tolerant GM *Zoysia* grass with an introduced a *bar* gene, that codes for phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT), for the approval of its commercial release. Based on our experimental data, the GM *Zoysia* grass was found to be environmentally and ecologically safe. However, concerns of transgene escape still remain (T.-W. Bae and H.-Y. Lee, unpublished). As shown in genetically engineered male-sterile transgenic plants, preventing reproduction appears to be an effective means to control transgene escape, especially in *Zoysia* grass, since this species can also be vegetatively propagated through the spreading of grass over the soil surface without reproduction. Thus, we attempted to generate GM *Zoysia* mutants with defects in reproduction.

Communicated by T. Nishio

Received August 25, 2008. Accepted February 8, 2009.

*Corresponding author (e-mail: hyoyeon@cheju.ac.kr)

† These authors contributed equally to this work

Ionizing radiation mutagenesis has been effectively used to produce genetic variability for breeding research and genetic studies (Bae *et al.* 2000, Naito *et al.* 2005, Wu *et al.* 2005, Yang *et al.* 2004). By adopting this technology, we have successfully produced lines of GM *Zoysia* grass with defects in the transition from the vegetative phase to the reproductive phase, thus allowing only vegetative propagation. We monitored the phenotype for four years, and found that no reproductive organs were produced in the GM *Zoysia* lines.

Materials and Methods

*Gamma γ -irradiation of GM *Zoysia* grass*

Herbicide-tolerant GM *Zoysia* grass (*Zoysia japonica*), described in Toyama *et al.* (2003), was used as plant material for gamma-ray (^{60}Co) mutagenesis. γ -irradiation experiments were carried out by exposing flowers at the pollination stage to 0, 10, 25, 50, 75, and 100 Gy of γ -rays from a ^{60}Co source. To synchronize the pollination stage of the GM *Zoysia*, plants with flowers where anthers were over 70% grown were used for irradiation. Following irradiation, plants were transferred to a Cheju National University-approved confined greenhouse (natural light and temperature) along with non-irradiated GM *Zoysia* plants. The sterilization and pretreatment for germination of M_1 seeds were conducted as described previously (Bae *et al.* 2008).

*Identification of sterile GM *Zoysia* lines*

The M_1 plants were visually screened for mutants with defects in reproduction. The candidate mutants were vegetatively propagated in the confined greenhouse, and their phenotypes were monitored for 4 years. Each individual sterile line was periodically sprayed with basta solution to check the maintenance of herbicide-tolerant trait. The growth and morphological characteristics (stems, leaves, etc.) of the GM *Zoysia* lines were also compared with those of the non-irradiated GM *Zoysia* plants under greenhouse conditions according to previously described methods (Bae *et al.* 2008).

Results and Discussion

The effects of gamma ray irradiation in seed germination

The survival of M_1 seeds derived from flowers that had been irradiated with a range of doses of γ -ray (0, 10, 25, 50, 75, and 100 Gy) was investigated to establish the optimal doses for irradiation. We determined the survival rate by scoring the relative percentage of seed germination at each dose to that of non-irradiated GM *Zoysia* seeds. The survival rate of M_1 seeds was decreased with increasing doses of irradiation. For a dose of 10 to 25 Gy, the relative percentage of seed germination was 68% on average (data not shown). When irradiated with 50 to 75–100 Gy, it was decreased to averages of 40.5% and 25%, respectively (data not shown). From the survival curves, based on the relative germination rate of M_1 seeds, the lethal dose for 50% of specimens

(LD₅₀) was estimated to be slightly higher than 40 Gy of γ -ray. Thus, the second cycle of mutagenesis for generating mutants was conducted with a range of doses, from 10 to 50 Gy, including a dose at the LD₅₀. The germination of M_1 seeds obtained from the second round of mutagenesis was also investigated. While 74% of the non-irradiated GM *Zoysia* seeds germinated, 56% (84/150), 41% (61/150), 47% (94/200), 31% (93/300), and 22% (66/300) germination were observed at doses of 10, 20, 30, 40, and 50 Gy, respectively (Table 1). The overall survival rates of M_1 seeds at different doses were similar to those in the first round of mutagenesis.

Seedlings were then transferred to soil, but only 56% of them survived in the soil conditions. We compared the survival rates at different doses, and found that they also decreased with increasing doses of irradiation. The proportion of plant survival fell from 28% at doses of 10–30 Gy, to 6% at a dose of 50 Gy (Table 1), while in the non-irradiated GM *Zoysia*, 70% of plants survived. Through this analysis, 30–40 Gy of ^{60}Co was revealed to be the most effective dose of γ -ray irradiation in the pollination stage of *Zoysia* grass, since the LD₅₀ of germination and >50% survival of germinated seeds were found to be in this range.

*Identification of GM *Zoysia* lines with defects in reproduction*

We analyzed the 223 M_1 GM *Zoysia* lines for morphological variation, especially defects in reproductive organs. For the second year, a large portion of M_1 (53.8%) and control (20%) plants did not produce flowers under our greenhouse conditions. However, in the fourth year, all non-irradiated GM *Zoysia* plants produced normal flowers, whereas 4% (9/223) of M_1 plants still did not produce inflorescence stems (unbolting lines). The frequencies of the unbolting phenotype at 10, 20, 30, 40, and 50 Gy were observed to be 0.7% (1/150), 0.7% (1/150), 1% (2/200), 1% (3/300), and 0.7% (2/300), respectively (Table 1), showing higher frequency of the unbolting phenotype at 30–40 Gy. This supports the previous finding that 30–40 Gy is the most effective dose for γ -ray mutagenesis in *Zoysia* grass.

The leaf node number is an important marker of the floral transition from the vegetative phase to the reproductive phase. Generally, *Zoysia* flowers at the developmental stage have a leaf node number of 12. In nine unbolting lines, an average of 15.4 leaf nodes were observed, whereas in non-

Table 1. Effects of various doses of gamma-rays in M_1 GM *Zoysia* lines

Dose (Gy)	No. of seeds	No. of germinated seeds (%)	No. of survived plants (%)	No. of unbolting plants (%)
0	100	74 (74)	70 (70)	0 (0)
10	150	84 (56)	42 (28)	1 (0.7)
20	150	61 (41)	42 (28)	1 (0.7)
30	200	94 (47)	56 (28)	2 (1)
40	300	93 (31)	64 (21)	3 (1)
50	300	66 (22)	19 (6)	2 (0.7)

irradiated GM *Zoysia* plants, 12 leaf nodes were shown (Fig. 1). These unbolting phenotypes of the selected lines have been stably maintained for five years without forming any floral organs. We also compared the growth and morphology of the non-irradiated GM *Zoysia* plants with those of the unbolting lines. The morphological comparison included the plant height, the length of the blade, and the width and angle of plant leaves. No significant differences were observed between non-irradiated GM *Zoysia* plants and the selected lines. From these observations, it was concluded that these unbolting phenotypes might result from defects in floral transition, but are not caused by growth retardation. However, it is still unclear whether the unbolting phenotype of the nine lines is not a late flowering trait. Thus, further observation of flowering phenotype is needed to elucidate the nature of each unbolting trait.

Other morphological traits

Other morphological variations (22 lines), including dwarfism, pigmentation, and lesions in apical dominance were also observed in the M₁ mutant pool. Among these morphological variations, there was a distinct predominance of the dwarf phenotype (4.9%), with relatively low frequencies of other phenotypes, such as leaf color (1.8%), increased culm number (2.2%), or high-density tillers (0.9%).

Conclusion

In this study, we showed that gamma-ray irradiation-

induced mutagenesis is highly effective in generating mutations in *Zoysia* grass. Using this technology, we identified nine lines with unbolting traits, which can be utilized in controlling transgene escape of GM *Zoysia* grass. Some of the morphological mutant lines, along with the M₂ mutant pool, would be useful genetic resources in the breeding or molecular/genetic study of *Zoysia* grass.

Acknowledgements

This work was supported by the Korea Research Foundation Grant (KRF-2007-412-J05501), Biogreen 21 program (20080401034014) and TDPAP (107098-3).

Literature Cited

- Bae, C.H., T. Abe, N. Nagata, N. Nobuhisa, T. Matsuyama, T. Nakano and S. Yoshida (2000) Characterization of a periclinal chimera variegated tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Sci.* 151: 93–101.
- Bae, T.W., E. Vanjildorj, S.Y. Song, S. Nishiguchi, S.S. Yang, I.J. Song, T. Chandrasekhar, T.W. Kang, J.I. Kim, Y.J. Koh *et al.* (2008) Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. *J. Environ. Qual.* 37: 207–218.
- Ho, M.W., J. Cummins and J. Bartlett (2001) Killing fields near you. Terminator crops at large. *ISIS News* 7/8, February 2001. (<http://www.i-sis.org.uk/isisnews/i-sisnews7-16.php>).
- Khan, M.S. (2005) Plant biology engineered male sterility. *Nature* 436: 783–785.
- Naito, K., M. Kusaba, N. Shikazono, T. Takano, A. Tanaka, T. Tanisaka and M. Nishimura (2005) Transmissible and nontransmissible mutations induced by irradiating *Arabidopsis thaliana* pollen with γ -rays and carbon ions. *Genetics* 169: 881–889.
- Reichman, J.R., L.S. Watrud, E.H. Lee, C.A. Bollman, M.J. Storm, G.A. King and C.M. Smith (2006) Establishment of transgenic herbicide-resistant creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) in nonagricultural habitats. *Mol. Ecol.* 15: 4243–4255.
- Ruiz, O.N. and H. Daniell (2005) Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome by expression of beta-ketothiolase. *Plant Physiol.* 138: 1232–1246.
- Toyama, K., C.H. Bae, J.G. Kang, Y.P. Lim, T. Adachi, K.Z. Riu, P.S. Song and H.Y. Lee (2003) Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Cells.* 16: 19–27.
- Watrud, L.S., E.H. Lee, A. Fairbrother, C. Burdick, J.R. Reichman, M. Bollman, M. Storm, G. King and K.V. Water (2004) Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with CP4 EPSPS as a marker. *PNAS* 101: 14533–14538.
- Wu, J.L., C. Wu, C. Lei, M. Baraoidan, A. Bordeos, M.R. Madamba, M. Ramos-Pamplona, R. Mauleon, A. Portugal, V.J. Ulat *et al.* (2005) Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Mol. Bio.* 59: 85–97.
- Yang, C., B.J. Mulligan and Z.A. Wilson (2004) Molecular genetic analysis of pollen irradiation mutagenesis in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 164: 279–288.

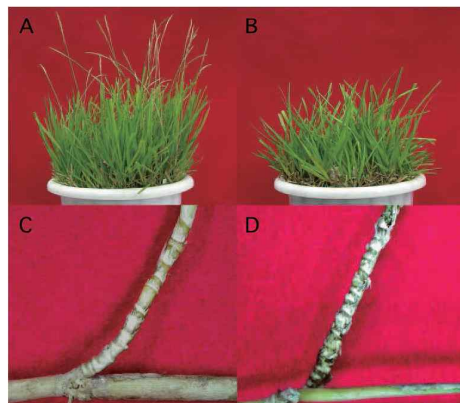


Fig. 1. Phenotypes of unbolting GM *Zoysia* line. (A, B) Visual morphology of a non-irradiated GM *Zoysia* plant (A) and an unbolting GM *Zoysia* line (B). (C, D) Leaf node of a non-irradiated GM *Zoysia* plant (C) and an unbolting GM *Zoysia* line (D).