(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12N 15/11

(45) 공고일자 2004년10월12일
(11) 등록번호 10-0452431
(24) 등록일자 2004년10월01일

(21) 출원번호 10-2001-0021962
(22) 출원일자 2001년04월24일

(65) 공개번호 10-2002-0082531
(43) 공개일자 2002년10월31일

(73) 특허권자 금호석유화학 주식회사
서울특별시 종로구 신문로1가 57번지 금호빌딩

(72) 발명자 정화지
광주광역시광산구월계동761-3라인아파트605-104

김용식
서울특별시종로구무악동46-151

조정우
광주광역시광산구월계동금호타운106-804

정창호
서울특별시은평구갈현1동우미아파트102-605

(74) 대리인 김동완

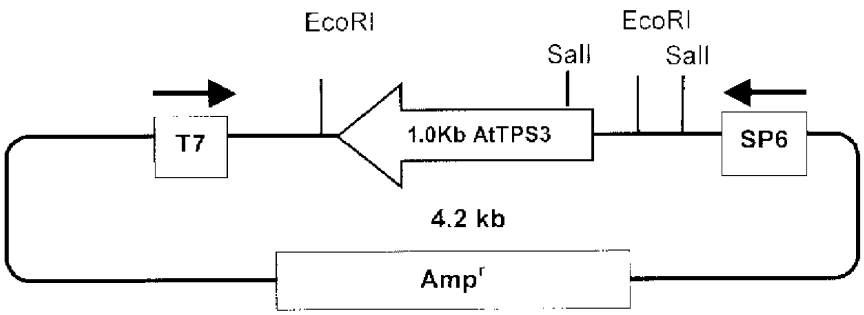
심사관 : 이충호

(54) 강한 구조 유전자 발현을 위한 발현 카세트와 플라스미드 및 그의 사용방법

요약

본 발명은 형질전환 식물 조직에서 바람직한 폴리펩타이드를 암호화하는 이형의 유전자에 결합 가능한 식물의 강력한 구조 프로모터를 포함하는 분리된 핵산 구조물을 제공한다. 상기 구조물은 키메릭 유전자에서 이형의 코딩 서열에 대한 구조물로서 사용될 때 식물 뿌리 조직과 식물 잎 조직에서 바람직한 폴리펩타이드를 높게 발현시키게 할 수 있다. 어느 키메릭 유전자를 상기 구조물에 결합한 벡터는 식물 조직에 도입될 수 있고, 그것에 의하여 계획적으로 식물을 변형하여 식물체내에서 외래의 성분을 생산하게 만들 수 있다.

대표도



색인어

아라비돕시스 트레할로스-6-포스페이트 합성효소 3 프로모터, 발현 카세트, 플라스미드

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 *E.coli* 변형을 위한 1.0 kb 아라비돕시스 TPS3 프로모터(서열번호: 1)를 포함하는 플라스미드 (a) pLES99010 및 2.0 kb 아라비돕시스 TPS3 프로모터(서열번호: 2)를 포함하는 플라스미드 (b) pLES99011의 도식 설명을 나타낸 것이다.
도 2는 식물 변형을 위한 1.0 kb 아라비돕시스 TPS3 프로모터(서열번호: 1)를 포함하는 플라스미드 (a) pLES99014 및 2.0 kb 아라비돕시스 TPS3 프로모터(서열번호: 2)를 포함하는 플라스미드 (b) pLES99015의 도식 설명을 나타낸 것이다.
도 3은 아라비돕시스 TPS3 프로모터 또는 CaMV 35S 프로모터에 의한 GUS 리포터 유전자 활성의 발현을 나타낸 것이다. 수직으로 위치한 배지에서 각각 5, 10 및 21일 동안 키운 발달 중인 유묘를 1 3 시간동안 X-Gluc 용액에서 에세이 되었다.
도 4는 아라비돕시스 TPS3 프로모터 또는 CaMV 35S 프로모터에 의한 GUS 리포터 유전자의 양적 활성을 나타낸 것이다. 수직으로 위치한 배지에서 각각 5, 7, 10 및 14일 동안 키운 발달 중인 유묘를 4-MUG 용액에서 에세이 되었다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 식물 세포에서 바람직한 폴리펩타이드의 고발현을 위한 구조적 비조직의 특정 프로모터를 포함하는 핵산 구조물과 그들의 이용에 관한 것으로, 특히 형질전환 식물 뿌리 조직과 잎 조직에서 높은 수준에서 구조적으로 발현될 수 있는 유전자를 지닌 프로모터에 관한 것이다. 상기 구조물에 의한 유전자 발현은 35S 프로모터보다 훨씬 강력하다. 본 발명은 바람직하게 전환된 식물을 생산하기 위해 유전자 발현을 구조적으로 조절하기 위한 아라비돕시스 TPS3 프로모터 사용의 예가 된다.
교배를 함에 있어서, 종래의 육종은 도입되는 유전자형이 상대 교배에 대해 한정적이고, 또한 의도하는 하이브리드를 얻기 위해 오랜 기간이 걸린다는 점에서 문제가 있다. 그러나, 유전공학기술과 같은 최근 생명과학기술의 발달로 바람직한 유전자는 직접 식물로 도입될 수 있고, 그런 시스템은 종래 육종의 문제점들을 극복할 수 있는 것으로 기대된다. 또한, 식물 유전공학의 이용으로 개선된 특성을 지닌 식물을 생산하는데 매우 이롭다. 식물의 질병, 곤충 및 환경 스트레스에 대한 저항성을 개선시키거나 형질전환 식물의 영양적 특성을 증진시키기 위해서, 바람직한 유전자는 유전자 발현을 조절하는 강한 구조 프로모터에 결합되어야만 하고, 유전자가 상기 프로모터의 조절하에 발현되도록 한다. 또한, 생물학적으로 활성인 폴리펩타이드의 경제적 생산은 식물의 생물학적 경작에서 제약학적 및 영양학적 제품과 다른 특정 화학제품의 제조에 있어서 중요하다. 강한 구조 프로모터를 포함하는 재조합 핵산 구성물로 생성된 발현 호스트로써 재조합 식물 세포를 사용한 재조합 DNA 기술은 특히 많은 양의 폴리펩타이드를 생산하기 위한 수단으로 유용하다.
식물에서 이형의 유전자를 발현하는데 사용하는 여러 가지 프로모터들은 이미 확인되었다. 가장 널리 사용되는 프로모터는 콜리플라워 모자이크 바이러스 (cauliflower mosaic virus; CaMV35S 프로모터)의 35S 프로모터이다. 35S 프로모터는 형질전환 식물의 모든 조직에서 유전자 발현을 일으키는 강한 구조 프로모터이다. 그 외 확인된 다른 구조 프로모터들은 아그로박테리움 튜매파시엔스(*agrobacterium tumefaciens*) T-DNA 의 만노파인(mannopine) 합성 유 전자와 노팔린(nopaline)으로부터 얻어진 프로모터들을 포함한다. 특히, 상업적으로 사용하려는 재조합 폴리펩타이드를 생산하기 위해서, 호스트 세포내의 바람직한 폴리펩타이드의 발현이 높은 수준이어야 한다. 그러므로 발현 특성을 유지하는 식물 조직에서 바람직한 폴리펩타이드의 강한 구조적 발현을 높은 수준으로 가능하게 하는 발현 조절 시그널이 필요하다. 그러한 구조 프로모터에 대한 이용은 상업적으로 중요한 농작물의 유전자 공학을 가능하게 한다. 본 발명은 이것을 완성하였다.
아라비돕시스 TPS3 유전자의 cDNA의 완전한 서열은 2,583 염기로 구성된 것으로 보고 되었으며, 861개의 잔기를 포함하는 그들의 아미노산 서열 또한 추론된다(유전자은행 AC004473 참조). 그러나, 상기 TPS3 유전자의 전사를 조절하는 프로모터 부위에 대해, 형질전환 식물의 뿌리 및 잎 조직에서 발현 특성을 유지하고 바람직한 유전자의 매우

강하고 구조적인 유전자 발현을 일으키는 아라비돕시스 TPS3 프로모터를 확인한 보고 및/또는 발명은 현재까지 없었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

그러므로, 본 발명에 따라 바람직한 외래 유전자 및 터미네이터는 분리한 아라비돕시스 TPS3 프로모터 부위에 연결될 수 있고, 식물에 도입되어, 바람직한 유전자는 형질전환 식물 조직에서 발현될 수 있다. 그러므로, 프로모터 부위는 생물 또는 비생물 스트레스관련 전사와 식물 개량을 위한 바람직한 유전자를 발현할 수 있고 또한 식물 조직에서 생물학적으로 활성 성분을 생산하는데 이용될 수 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 식물의 뿌리 조직과 잎 조직의 바람직한 폴리펩타이드를 가장 높은 수준에서 발현하기 위한 이형의 유전자에 결합 가능한 식물 프로모터를 포함하는 분리된 핵산 구조물을 제공한다. 식물 프로모터는 트레할로스(trehalose) 대사작용에 관여하는 트레할로스-6-포스페이트 합성효소를 암호화하는 아라비돕시스 유전자로써 CaMV 35S 프로모터보다 더 강력한 구조 프로모터를 포함한다. 또한 본 발명에 의해 바람직한 폴리펩타이드를 암호화하는 이형 유전자에 결합 가능한 아라비돕시스 TPS3 프로모터를 포함하는 발현 벡터가 제공된다.
발현 벡터는 선택 마커와 같은 다른 성분들을 더욱 포함할 수 있다. 또한 구조물은 식물 또는 다른 호스트 세포에서 기능을 하는 복제 서열의 오리진(origin)을 포함할 수 있다. 발명의 바람직한 구조물로서, 플라스미드 pLES 99010은 부다페스트 조약에 의거 대한민국 대전시 유성구 어은동 52번지(305-333)에 위치한 한국타입 컬쳐컬렉션(Korean Collection for Type Cultures; KCTC)에 기탁번호 KCTC 0811BP로 2000년 6월 28일 기탁되었다. 플라스미드 pLES 99011은 부다페스트 조약에 의거 한국타입 컬쳐컬렉션(KCTC)에 기탁번호 KCTC 0812BP로 기탁 되었다. 플라스미드 pLES 99014는 부다페스트 조약에 의거 한국타입 컬쳐컬렉션(KCTC)에 기탁번호 KCTC 0813BP로 기탁되었다. 플라스미드 pLES 99015는 부다페스트 조약에 의거 한국타입 컬쳐컬렉션(KCTC)에 기탁번호 KCTC 0814BP로 기탁되었다.
또한 본 발명은 이형 유전자에 결합 가능한 아라비돕시스 TPS3 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 식물 세포를 제공한다. 발현 카세트는 호스트 세포의 게놈에 통합될 수 있거나 독립적으로 복제 플라스미드에 존재할 수 있다. 상기 발현 카세트를 이용하여, 식물의 유전자 조작이 가능하고 상업적으로 중요한 식물에 바람직한 유전자 발현을 구조적으로 조절할 수 있다. 바람직한 식물 세포는 쌍떡잎(dicot) 및 단자엽(monocot) 종이다.
본 발명은 광범위한 연구를 하여 식물 조직에서 기능을 할 수 있는 프로모터를 발견하였으며, 바람직한 유전자가 매우 강하게 구조적으로 발현을 할 수 있는 본 발명을 완성하였다.
본 발명은 식물체내에서 바람직한 폴리펩타이드를 높은 수준으로 구조적 발현시키는데 유용한 발현 카세트 및 벡터를 제공한다. 본 발명의 프로모터 및 벡터들은 특히 재조합 단백질 발현을 높은 수준으로 얻기 위해 병원균 저항, 환경 스트레스 내성 또는 식물의 생물학적 경작(biofarming)에 대해 콩과 쌀 등을 포함한 식물 호스트에서의 단백질 발현에 적합하다. 상기 프로모터는 CaMV 35S 프로모터에 의해 제공되는 것보다 더 높은 수준의 발현을 제공한다.
이 출원에서 필요한 일반적 실험과정들은 Sambrook et al., Molecular cloning; A Laboratory Manual(2 nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989을 근거로 하였다. 여기에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 이 발명이 속하는 분야의 통상의 기술을 가진 사람들에게 일반적으로 이해되는 것과 같은 의미를 지닌다. 여기에 기술된 것과 비슷하거나 동일한 방법과 재료들이 본 발명을 수행하고 테스트하는데 사용될 지라도, 더욱 바람직한 방법과 재료들이 기술된다.
용어 '핵산(nucleic acid)'은 달리 제한되지 않는 한, 단일- 또는 이중나선 형태에서 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드를 가리키고, 자연 발생하는 뉴클레오타이드와 비슷한 방식에서 핵산과 결합하는 본래 뉴클레오타이드의 알려진 유사체들을 포함한다. 특별한 언급이 없는 한, 특정 핵산 서열은 그들의 상보적 서열을 포함한다.
용어 '결합 가능한(operably linked)'는 핵산 발현 조절 서열(프로모터, 시그널 서열 또는 전사 요소 결합 사이트와 같은)과 제 이의 핵산 서열 사이의 기능 적 결합을 가리키고, 여기서 발현 조절 서열은 제 이의 핵산 서열에 해당하는 핵산의 전사 및/또는 번역에 영향을 미친다.
세포와 관련하여 사용되는 용어 '재조합(recombinant)'은 세포가 이형의 핵산을 복제하거나 이형의 핵산에 의해 코드화되는 펩타이드 또는 단백질을 발현하는 것을 가리킨다. 또한 재조합 세포는 세포의 본래 형태에서 발견되는 유전자를 발현시킬 수 있으나, 변형된 유전자가 인공적인 방법에 의해 세포로 재도입 되어지기도 한다.
여기서 사용된 '이형 유전자(heterologous gene)'는 외래 종으로부터 유래되거나 같은 종으로부터 유래된 유전자이고, 최초의 형태로부터 변형된 유전자이다. 그러므로, 프로모터에 결합 가능한 이형 유전자는 프로모터가 유래된 형태로부터 다른 근원이고, 같은 근원으로부터 유래되었다면 최초 형태로부터 변형된 프로모터이다. 예를 들어, 트로할로스-6-포스페이트 합성효소 유전자 프로모터는 원래의 트레할로스-6-포스페이트 합성효소와는 다른 폴리펩타이드를 암호화하는 구조적 유전자와 결합할 수 있다. 이형 서열의 변형은 예를 들어, 프로모터에 결합가능할 수 있는 DNA 단편을 생성하는 제한 효소로 DNA를 처리하여 발생될 수 있다. 또한 사이트-지정 변이발생은 이형 서열을 변형시키는데 유용하다.
여기서 프로모터는 원하는 단백질의 유전자가 상기 프로모터의 다운스트림에 융합되었을 때 식물 세포에서 단백질의 발현을 조절할 수 있는 프로모터를 의미한다. 또한 본 발명의 프로모터는 다른 전사-번역 활성 서열에 결합하여 더욱 변형될 수 있다.

'발현 카세트(expression cassette)'는 그러한 서열에 적합한 호스트에서 구조 유전자의 발현에 영향을 줄 수 있는 핵산 요소를 지닌 발생되거나 합성적으로 된 핵산 구조물이다. 발현 카세트는 적어도 프로모터들을 선택적으로 전사 종결 시그널을 포함한다. 일반적으로, 발현 카세트는 전사되는 핵산과 프로모터(예를 들어, 아라비돕시스 TPS3 프로모터)를 포함한다. 또한 발현에 영향을 주는 추가 요소들로는 여기에 기술된 것과 같이 사용될 수 있다. 예를 들어, 발현 카세트는 또한 호스트 세포로부터 발현된 단백질의 분비를 지시하는 시그널 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 구조물을 구성하는 변형된 세포를 선택하기 위해, 선택 마커 유전자를 발현 카세트에 편리하게 포함될 수 있다. 기술을 지닌 사람은 이 벡터 성분이 그것의 기능에 실질적인 영향없이 변형될 수 있다는 것을 알 수 있다.

본 발명은 핵산 구조물과 변형된 식물 세포내에서 유전자의 발현을 포함한다. 이 목적을 이루기 위한 분자 클로닝 기술은 공지에 알려져 있다. 발현 벡터와 같은 재조합 핵산 구조물에 적합한 다양한 클로닝과 시험관내 증식 방법은 기술을 지닌 사람들에서 잘 알려져 있다. 많은 클로닝 실행을 통하여 기술을 지닌 사 람들에게 알려진 기술과 지도의 예들은 Jose M. Martinez-Zapater and Julio Salinas, 아라비돕시스 프로토콜, Human Press를 근거로 한다.

본 발명의 첫 번째 관점은 아라비돕시스 트레할로스-6-포스페이트 합성효소(AtTPS3) 유전자로부터 프로모터(서열번호: 1)의 뉴클레오타이드 서열을 포함한 핵산 구조물에 관한 것이다. 바람직한 특성을 지니는 프로모터의 확인은 여러 가지 방법에서 이루어졌다. 예를 들어, 게놈 또는 cDNA 라이브러리는 아라비돕시스, *Myrothamnus flabellifolius* 및 효모와 같은 알려진 TPS3 유전자의 재료로부터 준비될 수 있다. 특정 종으로부터의 라이브러리는 다른 알려진 유전자의 코딩 영역에 상보적인 서열을 포함하도록 디자인된 올리고뉴클레오타이드 프로브로 스크린된다. 다른 방법으로는 올리고뉴클레오타이드 프로브는 정제된 TPS3 단백질로부터 얻어진 아미노산 서열 정보를 기초로 하여 디자인될 수 있다. 아미노산 서열을 기초로 한 올리고뉴클레오타이드 프로브는 재료식물의 선택적 코돈을 위해 변형되거나 편향하게 될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 클로닝과 서열화를 위한 PCR 단편을 증폭하기 위해 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)에서 사용하기 위해 디자인될 수 있다. PCR 단편의 서열은 상응하는 클론을 동정하기 위해 바람직한 유전자의 알려진 코딩 영역과 비교될 수 있다. 예를 들어, 병원균 반응 유전자의 cDNA는 병원균 감염 식물 조직과 유전자 특정 프라이머를 이용하여 분리된 총 RNA를 사용한 RT-PCR에 의해 얻어진다.

그런 후, cDNA는 안쪽에 위치한 프라이머를 이용한 연속적인 PCR 반응으로 식물 조직으로부터 만든 게놈 제한 라이브러리를 사용한 프로모터 부위를 분리하기 위한 미끼로 사용된다. PCR 증폭 생성물은 클로닝되고 서열화된다. 프로모터 부위는 원래의 것이거나 호스트 또는 외래의 것에 동형이거나 사용하려고 했던 호스트에 이형일 수 있다. 용어 '외래의(foreign)'는 전사 시작 영역이 도입되는 식물 호스트에서 항상 발견되지 않는 것을 의미하는 것이다. 아라비돕시스 트레할로스-6-포스페이트 합성효소 1 유전자(Blazquez et al., 1998. The Plant Journal 13(5):685-689) 또는 *Saccharomyces cerevisiae* 트레할로스-6-포스페이트 합성효소 2 유전자(De Virgiolio et al., 1993. Eur. J. Biochem. 212:315-323)는 본 발명에서 사용한 프로모터를 얻을 수 있는 유전자의 특정 예이다. 상기 구조물은 결과적 서열이 효과적으로 상기 프로모터와 발현 조절 활성을 유지하는 한, 삭제, 삽입 또는 치환된 염기를 지닌 서열번호: 1로부터 유래된 염기 서열을 포함할 수 있다. 게다가, 삭제, 삽입 또는 치환된 염기를 지닌 이런 서열은 상기 프로모터 활성을 효과적으로 유지하는 한 상기 염기 서열과 같은 기능을 본질적으로 지닌다.

가장 바람직한 프로모터의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호: 1에 나타나 있다. 나타난 바와 같이 프로모터는 pLES99014 발현 벡터의 XbaI 사이트에 삽입된다. 프로모터의 TATA 박스 서열은 뉴클레오타이드 918-923에 있다. 프로모터의 다운스트림에 발현되기 위한 유전자의 삽입을 용이하게 하기 위해 SmaI 사이트는 XbaI 사이트의 pLES99014 서열 바로 3'에 위치한다.

바람직한 프로모터 단편의 뉴클레오타이드 서열은 기술적 문헌(Carruthers et al., 1982. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418)에 기술된 것에 따라 잘 알려진 기술에 의해 합성될 수 있다. 상보적 스트랜드를 합성하고 적합한 조건하에 함께 스트랜드들을 어닐링하여 더블 스트랜드 DNA 단편을 얻을 수 있다.

본 발명의 두 번째 관점은 발현 카세트 또는 발현 벡터로서 사용되는 발현 카세트에 결합하는 벡터에 관한 것이다. 발명의 프로모터를 포함하는 플라스미드는 본 발명의 프로모터의 다운스트림에 바람직한 유전자를 삭제하거나 삽입하기 위한 제한 효소 사이트를 지니도록 조립된다. 바람직한 유전자는 상기 프로모터에 대해 이형일 수 있다. 또한, 플라스미드는 식물 뿌리와 잎 조직에 바람직한 단백질의 발현을 위한 상기 프로모터에 바람직한 구조적 유전자를 결합하여 제조되고, 또한 자동적으로 복제, 유전 및 기타 같은 종류의 것들인 키메릭 유전자를 포함한다. 본 발명의 프로모터는 식물 뿌리 및 잎 조직에서 바람직한 단백질을 발현시킬 수 있고, 본 발명의 GUS 리포터 유전자는 생물/비생물 스트레스에 대한 저항성 또는 형질전환 식물에서 생물학적 활성 성분의 생성을 향상시킬 수 있는 바람직한 유전자에 의해 삭제 및 대체될 수 있다.

관심있는 뉴클레오타이드 서열은 본 발명의 프로모터 조절하에 프로모터로부터 다운스트림에 삽입될 수 있다. 관심있는 뉴클레오타이드 서열은 내재성 생성물의 생성을 변경하거나 기능적으로 신규유전자 생성물을 코딩하여 표현형 특성을 변형하게 한다. 뉴클레오타이드 서열은 효소를 암호화하는 어느 오픈 리딩 프레임 또는 게놈 서열에 상보적인 서열을 지닐 수 있고, 게놈 서열은 오픈 리딩 프레임 또는 상보적 서열이 전사, 메신저 RNA 프로세싱을 억제하는 어느 다른 서열일 수 있다. 관심있는 뉴클레오타이드 서열은 원래의 오리진의 합성이거나 그들의 조합일 수 있다. 관심있는 뉴클레오타이드 서열의 특성에 의존하여, 식물 선택적 코돈을 지닌 서열을 합성하는 것이 바람직할 것이다.

또한 벡터들은 바람직한 구조물을 지니는 호스트 세포를 선택하기 위한 선택 마커 유전자를 포함한다. 이런 유전자는 선택 배양 배지에서 성장한 변형된 호스트 세포의 생존 또는 성장하는데 필요한 단백질을 암호화한다. 선택 유전자를 포함하는 벡터로 변형되지 않은 호스트 세포는 배양 배지에서 생존하지 못할 것이다. 전형적인 선택 유전자는 가나마이신과 하이그로마이신과 같은 항생제 또는 다른 독소에 저항성을 지니는 단백질을 암호화한다. 선택 마커계는 이 분야의 당업자에게는 잘 알려져 있고 Sambrook et al.에 기술되어 있다. 상기 언급된 성분의 하나 또는 그 이상을 포함

하는 바람직한 벡터의 제조는 상기 언급된 참고문헌에 기술된 것에 따른 표준 방법을 사용한다.
발명의 벡터를 많은 식물 호스트 세포들에 사용될 수 있다. 식물의 예들로는 콩, 토마토, 감자, 담배, 쌀, 옥수수, 밀, 보리, 딸기 및 평지씨(rapeseed)를 포함한다. 이런 예들은 한정하기 보다는 실례가 되는 것이다. 사용된 호스트 세포에 의존하여, 변형은 그런 세포에 적합한 표준 방법을 사용하여 행해질 수 있다.
본 발명의 프로모터는 매우 높은 수준으로 식물 호스트 세포에서 어느 바람직한 단백질을 발현시키는데 사용한다. 단백질은 식물 호스트 세포에 동형일 수 있고, 또는 바람직하게 호스트 세포에 이형이다. 예를 들어, 상기 프로모터를 사용하여 매우 높은 수준으로 포유류, 진균류 및 식물 단백질을 발현시킬 수 있다. 상기 프로모터를 사용하여 발현시킬 수 있는 전형적인 단백질은 트레할로스-6-포스페이트 합성효소, ABA-반응 요소 결합 인자(ABF), 병원균-반응 유전자(R 유전자), 탄수화물 대사 효소, 카로틴 합성 효소, 플라보노이드 합성 효소, 성장 호르몬, 인슐린, 인터루킨, 콜로니 자극 인자 및 그와 유사한 것들을 포함한다. 상기 언급된 효소들은 독점적인 것은 아니지만 발명의 상기 프로모터에 결합 가능한 어느 핵산 발현의 전사를 얻는데 사용되는 실례이다. 상기 프로모터가 도입된 호스트 식물 세포에 있어서, 식물 뿌리와 잎 조직은 외래 유전자의 발현을 특히 높인다는 점에서 바람직하다. 그러므로, 재생 가능성을 지닌 식물 세포에 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터의 형질도입은 생물/비생물 저항성 및/또는 높은 식물 생산성의 상업적으로 및 농업적으로 바람직한 특성을 지니어 쌀과 같은 곡물에 종사하는 기술자에게 효과적인 방법을 제공한다.
본 발명의 구성물은 감염 및 스트레스에 구조적으로 저항적이거나 생물학적으로 활성 성분의 생성을 증진시키는 형질전환 식물을 제공한다. 특히, 본 발명의 구성물로 변형된 식물 세포는 종래의 식물 조직 배양 기술에 의해 재생될 수 있다(Jose M. Martinez-Zapater and Julio Salinas, *Arabidopsis protocol* , Human press, 1998). 관심있는 DNA 서열의 발현은 구조적으로 특히 뿌리와 잎 조직처럼 스트레스 사이트에서 발현된다는 중요한 점이다. 구성물은 식물에서 외재성 생성물의 생산뿐만 아니라 내재성 생성물의 발현 조절을 제공한다. DNA 구조물은 게놈에 결합되어 전사되기 위한 식물 세포 호스트로 도입된다. 이 방법에서, RNA와 폴리펩타이드의 적합하게 높은 발현은 오랜 세월에 걸쳐 이룩될 수 있다. 바람직한 유전자의 매우 강하고 구조적인 발현의 확인은 상기 발명을 지닌 변형된 식물 또는 식물 조직에서 얻을 수 있다.
트레할로스-6-포스페이트 합성효소 3(TPS3)는 글루코스-6-포스페이트 및 유리딘-디포스포글루코스로부터 α-D-글루코피라노실 α-D-글루코피라노사이드(비-환원 이당류 프레할로스)의 합성을 촉진한다. 환원 말단의 결핍은 트레할로스를 열, pH 및 마일라르 반응(Maillard's reaction: 감자 가공 중에 변색하는 탄수화물과 아미노산 사이의 반응)을 방해한다. 게다가, 트레할로스는 탈수 후에 유리같은 구조를 형성하여 생물학적 구조에서 강한 안정성 효과를 지닌다. 이런 특성 때문에, 농작물에서 환경 스트레스 저항성을 처리하기 위한 수단 및 건조 또는 냉동 식 품을 보존하기 위한 안정제 및 화장품과 제약에 첨가물로서 트레할로스에 대한 관심이 증가하고 있다.
아라비돕시스로부터 유래된 TPS1 유전자의 완전한 cDNA 서열이 보고되었다(Blazquez et al., The Plant Journal(1998) 13:685-689). 그러나 TPS3 유전자의 전사를 조절하는 기능을 하는 프로모터 부위에 대해서, 프로모터 유전자의 분리와 그들의 이용에 관한 보고는 아직 없었다. 상기 지식을 가지고, 본 발명은 농업적으로 중요한 식물에 외래 유전자를 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 구성물은 발현 후에 15분 내에 활성화되고 활성이 유지된다. 그러므로, 본 발명의 구성물에 의해 제공되는 빠른 유전자 발현 유도와 강도는 병원균에 대한 식물 저항 반응을 일으키거나 크게 증가시키고, 비생물 스트레스(예를 들면, 환경 스트레스 반응 효소)에 대해 방어하는 메커니즘의 효과를 증가시키거나 생물학적으로 활성 성분(예를 들면, 생물학적으로 활성 물질을 생산하는 효소)을 생성하는데 바람직하여 특히 이롭다. 이 방법에서, 관심의 DNA 서열은 구조적으로 형질전환 식물 뿌리 및 잎 조직에서 구조적으로 발현되고, 특이성은 그러한 서열의 구조적 발현이 일어나는 식물에 해로운 효과를 줄 수 있는 가능성을 피할 수 있다.
식물 저항성에 대한 바람직한 효과는 예를 들어, 진균류 또는 선충류에 대한 저항유전자를 발현하므로써 이룩될 수 있다. 본 발명의 구성물의 조절 억제하에 증진된 질병 저항성을 위해 발현될 수 있는 유전자의 예들은 Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.G.D.에 기술되어 있다('Plant disease resistance genes', Annu. Rev. Plant Physiol.(1997)48:575-607).
또한, 높은 수준의 전이유전자(transgene) 발현을 얻을 수 있는 능력은 '분자적 농업(molecular farming)'에서 상당히 중요하고, 식물은 산업 또는 제약학적 폴리펩타이드와 식물에 외래인 다른 바이오폴리머를 생산하는데 사용된다. 또한 본 발명의 프로모터는 환경 및 농업적 모니터링하는데 민감하고 빠른 세포수준 스크린을 발달시키는데 잘 알려진 유전자 구조물에서 사용하는데 이로울 것으로 기대된다.
식물 뿌리 및 잎 조직에서 활발히 발현되는 TPS 유전자의 프로모터 부위를 분리하기 위한 시도와 함께, 식물 질병 저항성, 환경적 스트레스 내성의 개선 또는 식물 뿌리 조직과 잎 조직에서 생물학적으로 활성 성분의 생산에 그것을 사용하여, 본 발명자들은 이 과제를 이룩하려고 연구하였고, 그 결과로 본 발명을 완성하였다.
다음의 실시 예들은 발현 카세트의 제조를 예시한 것으로, 특히 DNA 서열은 CaMV35S 프로모터보다 식물 뿌리 및 잎 조직에서 강력하고 구조적 유전자 발현의 조절 서열을 포함한다. 플라스미드에 서열의 도입은 또한 식물 세포의 변형이 가능하다는 점에서 설명된다. 게다가, 형질전환 식물의 재생과 형질전환 식물에서 발현 카세트의 기능 연구를 나타내었다. 이 분야에서 기술자들은 대체와 변경이 프로토콜의 범위와 의도에서 벗어남이 없이 여기에 제시된 성분, 조건 및 과정에서 가능하다는 것을 인정할 것이다.
(실시예)
본 발명의 실시 예들을 상세히 설명하면 다음과 같다. 그러나 본 발명이 실시 예에만 국한되는 것은 아니다.
실시예 1
프로모터의 분리
1) 아라비돕시스 탈리아나로부터 총 RNA의 분리

한달된 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)의 잎 10g을 액체질소로 냉각하여 분쇄기를 이용하여 분말로 만든다. 분말은 20mM Tris, 0.5mM EDTA, 0.1M LiCl 및 1% SDS를 포함하는 차가운 얼음 추출 완충액 (pH 7.0) 10ml이 첨가된 냉각 Corex 튜브에 옮겨지고, 10분동안 65℃에서 가열되었다. 현탁액은 15,000rpm, 20℃에서 20분동안 원심분리 되었다. 상층 부분은 수집되었다. 전체 RNA는 0.5 부피의 페놀과 클로로포름을 첨가하고 뒤이어 2M LiCl로 처리하여 침전되었다. 물로 용해시킨 후에, 전체 RNA는 -20℃에서 2 부피의 에탄올을 첨가하고 12,000rpm, 4℃에서 10분동안 원심분리하여 침전되었다. 모든 유리제품과 용액은 미리 0.1% 디에틸파이로카보네이트로 처리되고 멸균되었다.

2) 아라비돕시스 탈리아나로부터 mRNA의 분리

Poly-A $^{+}$ RNA는 제조업자의 지시에 따라 Oligotex ^{TM} mRNA 미디 키트(QIAGEN, 독일)로 분리되고 정제되었다. 총 RNA가 65℃에서 5분간 가열된 후에 총 RNA는 2x 결합 완충액으로 평형된 Oligotex ^{TM} 칼럼에 로딩되었다. Oligotex ^{TM} 칼럼은 세척 완충액으로 2번 세척되고 용리 완충액 20㎕로 처리되었다. 얻어진 Poly-A $^{+}$ RNA는 -20℃에서 에탄올을 2.5 부피로 첨가하여 12,000 rpm, 4℃에서 10분동안 원심분리되어 침전되었다. 침전된 Poly-A $^{+}$ RNA는 70% 에탄올로 세척후에 pH 8.0에서 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA를 포함한 TE 완충액 20㎕에 용해되었다. Poly-A $^{+}$ RNA의 농도는 260nm에서 분광학적으로 결정되었다. 모든 과정은 mRNA 제조에 뉴클레아제의 오염을 최소화하기 위해 외과용 고무 글로브를 착용한 채 실행하였다.

3) 아라비돕시스 탈리아나로부터 cDNA의 합성 및 클로닝

아라비돕시스 탈리아나로부터 cDNA 라이브러리는 제조업자의 메뉴얼에 따른 Uni-ZAP ^{TM} cDNA 라이브러리 키트(Stratagene, USA)로 제조되었다. 첫 번째-스트랜 드 cDNA는 poly-A $^{+}$ RNA 5㎍, 올리고 (dT) $_{12-18}$, 뮤린 역전사효소, dNTP, BSA 및 DTT의 반응 혼합물로부터 합성되었다. 더블-스트랜디드 cDNA를 합성하기 위해서, 합성된 첫 번째-스트랜드는 *E.coli* RNase H, *E.coli* DNA 중합효소 I 및 dNTP를 포함하여 3시간동안 16℃에서 cDNA 말단을 무디게하고, 10분 동안 65℃에서 Pfu DNA 중합효소를 지닌 dNTP 혼합물로 처리한다.

4) cDNA의 Uni-ZAP ^{TM} ZAP 벡터로 결합

합성된 cDNA의 말단은 cDNA를 벡터로 삽입하기 위해 EcoRI 어댑터로 결합된다. 합성된 cDNA는 EcoRI 어댑터, ATP, T4 DNA 리가제를 첨가하여 12℃에서 밤새 반응되고, EcoRI 어댑터의 결합을 위해 T4 DNA 키나제와 ATP를 첨가하여 30분동안 37℃에서 더욱 반응시킨다. cDNA는 세파크릴 S-500 스핀 칼럼으로 정제되고, 그것의 시그날은 1.0% 아가로스젤 전기영동으로 확인되었다. 상기 cDNA 부분 1kb는 그 이상의 실험을 위해 사용되었다. cDNA의 삽입은 cDNA 200ng, 벡터 DNA(Stratagene) 1㎍ 및 T4 DNA 리가제를 포함한 혼합물을 4℃에서 48시간동안 반응하여 얻어졌다.

5) cDNA 라이브러리의 제조 및 증폭

Uni-ZAP ^{TM} 벡터 DNA는 파지 고스트(Stratagene)를 포함하는 기가팩(Gigapack) II 팩키징 추출물을 사용하여 팩키징되었다. 팩키징 추출물은 22℃에서 2시간동안 재조합 벡터를 첨가하여 반응되었다. 반응 용액은 10㎕ 클로로포름이 보충된 완충액으로 최종 부피 500㎕까지 조절되어 즉시 사용되거나 사용될 때까지 4℃에서 저장되었다. 재조합 cDNA 라이브러리의 총 플라그-형성 유니트(pfu)는 10^{-2} 내지 10^{-6} 배-희석된 용액으로부터 얻어졌다. *E.coli* 균 XL1-Blue MRF' 200㎕는 37℃에서 15분동안 cDNA 라이브러리로 배양되었고, 직경 150㎜의 플레이트 위에 10^{6} pfu로 도포되었다. SM 완충액 5㎖로 보충된 플레이트는 37℃에서 12시간동안 플레이트를 반응시킨 후에 밤새 4℃에서 배양되었다. 상층액은 10분동안 12,000rpm으로 원심분리하여 반응된 SM 완충액으로부터 얻어지고, -4℃에서 100㎕ 클로로포름에 저장되었다. 플라그-형성 단위는 상기 기술된 것에 따라 계산되었다.

6) 프로모터 클로닝을 위한 중합효소 연쇄 반응

많은 양의 총 파지미드(phagemid) DNA 제조 또한 그 이상의 라이브러리 스크리닝을 위해 부분적 cDNA 단편을 분리하는 PCR 증폭으로 만들어졌다. cDNA 라이브러리를 포함하는 파지 스톡은 플라스미드 형태로 ExAssist 헬퍼를 통하여 *E.coli* XL1-B MRF' 셀에서 XL1B SOLR 셀로 이동되었다. 템플레이트로서 이 파지미드 프랩(prep)을 사용하여 벡터 프라이머와 두 개의 디제너레이트 프라이머의 조합을 사용하여 10X Taq 완충액 5㎕, 25mM $MgCl_2$ 2㎕, 10pmol 각 프라이머 2㎕, 2mM dNTPs 4 ㎕, cDNA 풀(pool) 0.25㎕, 물 33.75㎕를 포함하는 칵테일 혼합물로 95℃/30초, 50℃/30초, 72℃/30초 30사이클에서 PCR를 수행하였다.

7) cDNA 라이브러리의 선택

파지 부착을 위한 호스트 세포로서 *E.coli* 균 XL1-Blue MRF'은 20% 말토스, 1M $MgSO_4$ 0.5ml 및 50㎍/ml 테트라사이클린을 지닌 LB 배지 50ml에서 배양되었다. 세포 배양액은 A_{600} 에서 O.D. 0.5를 만들기 위해 10mM $MgSO_4$로 현탁되었다. cDNA 라이브러리를 포함한 *E.coli* 균 XL1-Blue MRF'를 37℃, 30분동안 배양한 후에, 0.7% LB 아가를 혼합한 배양액은 37℃, 12시간동안 1.5% LB 아가 플레이트 위에서 더욱 배양되었다. 5×10^{4} 세포가 첫 번째 선택에서 사용되었고, 1×10^{3} 세포가 두 번째 선택에서 사용되었다. 파지 플라그가 형성된 플레이트는 4℃에서 1시간동안 유지되었고, Hybond-C 멤브레인(Amersham, USA)으로 복제되었다.

8) 1.0Kb TPS3 유전자 프로모터의 PCR 클로닝

TPS3 프로모터를 클로닝하기 위해, 유전자 특정 프라이머 세트는 트레할로스-6-포스페이트 합성 상동물, T13D8.4를 포함하는 아라비돕시스 탈리아나 BAC T13D8 게놈 서열을 기초로하여 디자인되었다. TPS3 프로모터의 약 1.0Kb는 T13P3(5'-TCCAAATGATTTTGACCCCAT-3')[서열번호:3] 및 T13P5-2(5'-GTGTTCATTTGATAGA GTCTA-3')[서열번호:4] 프라이머를 사용하여 게놈 DNA로부터 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 증폭되었다. PCR 반응 혼합물은 게놈 DNA 500ng, 10x Taq 중합효소 완충액(pH 8.0) 5㎕, 1mM $MgCl_2$, 200mM dNTPs, 20pmole의 각 프라이머 및 5U Taq 중합효소를 포함하였다. 반응은 효소를 넣지 않은 채 시작되어, 다음 조건에 따라 증폭되었다: 후-변성으로 5분동안 95℃의 1사이클; 30초동안 95℃, 30초동안 50℃, 1분동안 72℃의 3사이클; Perkin-Elmer 9

800 증폭기에서 후-연장(extension)으로 10분동안 72℃의 1사이클. PCR 반응으로부터 증폭된 주요 생성물은 QIAquick 젤 추출 키트(Qiagen, USA)를 사용하여 젤-정제되었고, 순차적으로 pGEM-T 이지(easy) 벡터(Promega, USA)로 클로닝되었고, 제조업자의 지시에 따라 플라스미드 구조물 pLES99010(도 1a)를 생성하여 서열화되었다. 1kbp 업스트림 서열(서열번호:1)을 포함하는 클론은 1kb TPS3 프로모터로서 명하였다.

9) 2.0Kb 유전자 프로모터의 PCR 클로닝

TPS3 프로모터의 약 2.0Kb는 T13P3(5'-TCCAAATGATTTTGACCCCAT-3')[서열번호:3] 및 T13P5-1(5'-CGACGGCATTAACATAAACC-3')[서열번호:5] 프라이머를 사용하여 게놈 DNA로부터 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 증폭되었다. PCR 반응은 상기와 같은 완충액 및 증폭 조건을 사용하여 수행되었다. PCR 반응으로부터 증폭된 주요 생성물은 pGEM-T 이지(easy) 벡터(Promega, USA)로 클로닝되었고, 제조업자의 지시에 따라 플라스미드 구조물 pLES99011(도 1b)를 생성하여 서열화되었다. 2kbp 업스트림 서열(서열 번호:2)을 포함하는 클론은 2kb TPS3 프로모터로서 명하였다.

실시예 2

발현 벡터의 제조

A) TPS3 프로모터-GUS 리포터 유전자 구조물 및 발현 벡터의 제조

β-글루큐로니다제(GUS)를 암호화하는 리포터 유전자를 지닌 프로모터의 DNA 융합 구조물은 다음과 같이 만들어졌다. 바이너리(binary) 벡터 pBI101로 편리하게 클로닝하기 위해, 플라스미드 pLES99010과 pLES99011은 EcoRI로 분해되고, pBluescript KS의 EcoRI 사이트로 서브클론되었다. 이 클론들은 각각 pLES99012와 pLES99013으로 명명하였다. pLES99012는 1.0Kb TPS3 프로모터를 형성하기 위해, XbaI와 EcoRV로 분해되었고, 순차적으로 pBI101.2의 XbaI/SmaI 사이트로 서브클론되었고, pLES99014 발현 벡터를 생성하였다(도 2a). pLES99015 발현 벡터 구조물(도 2b)에 대해서는, pLES99013은 HindIII와 SmaI으로 분해되고, pBI101.2의 HindIII/SmaI 사이트로 서브클론 되었다. 모든 구조물의 정확성은 서열화에 의해 입증되었다. TPS3 프로모터/GUS 유전자 융합을 포함하는 벡터 pLES99014와 pLES99015는 각각 아그로박테리움 튜매파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균 GV3101으로 Jose M. Martinez-Zapater와 Julio Salinas, 아리비돕시스 프로토콜(Humana press, 1998) 방법에 의해 도입되었다.

실시예 3

형질전환 식물의 생성과 형질전환 식물에서 TPS3 프로모터 기능의 평가

A) 아라비돕시스 식물의 형질전환

벡터 pLES99014와 pLES99015는 Jose M. Martinez-Zapater와 Julio Salinas, 아리비돕시스 프로토콜(Humana press, 1998)에 따른 아그로박테리움-매개된 진공 침윤법에 따라 아라비돕시스 탈리아나(L.) Heynh., 생태형 Col-0으로 도입된다. 가나마이신 내성-양성 유전자 변형체를 선택하기 위해, T_1 종자는 70% 에탄올, 그리고 Tween 20이 포함된 50% 가정 표백제로 살균한 후, 멸균된 증류수로 4번 세척되었다. 유묘는 1% 수크로스와 50㎎/㎖ 가나마이신을 포함한 Murashige와 Skoog(MS) 배지 아가 플레이트에서, 수직 또는 수평 방향으로 놓여져 성장된다. 식물은 광주기 16시간동안 22 24℃에서 성장되었다. 단일 유전자가 삽입된 형질전환체는 T_2 유묘를 이용하여 RT-PCR 방법으로 증명되었고, 그들의 동질 접합체들은 GUS 활성도에 대해 에세이 되었다.

B) GUS 분석

TPS3 기능을 측정하기 위해 평면 플레이트에 성장된 양성 형질전환체 묘목(plantlet)을 5-브로모-4-클로로-3-인돌-β-D-글루큐로나이드(X-Gluc)로 염색하여 1시간 또는 16시간 에세이 되었다. 형질전환체 유묘 또는 묘목은 GUS 반응 완충액(2mM 5-브로모-4-클로로-3-인돌-β-D 글루큐로나이드(X-Gluc), 1% 디메틸포름아미드, 0.1mM 포타시움 페리시아나이드, 0.1mM 포타시움 페로시아나이드, 1mM EDTA, 50mM 소디움 포스페이트 완충액, pH 7.0)에 담그어 간단한 진공에 의해 침윤되었다. 조직은 1 3시간동안 37℃에서 에세이되었다. 에세이후에, 유묘 또는 묘목은 70% 에탄올을 사용하여 1시간동안 세척하고 더 잘 보이게 하기 위해 100% 에탄올을 사용하여 48시간 이상을 세척하여, 사진을 찍었다(도 3).

다섯 개 가나마이신 내성 아라비돕스 라인은 GUS 활성도의 유도에 대해 분석되었다. 세 개의 라인은 15분 후 배양에서 GUS 발현의 강한 유도를 보였고, 두개의 라인은 가벼운 유도를 보였다. 유도의 강도는 GUS 염색 후에 상대적 색깔 정도를 눈으로 관찰하여 결정되었다.

참고문헌

A Laboratory Manual (2nd Ed.), edited by J. Sambrook and D.W. Russel, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989;

Arabidopsis Protocols, edited by Jose M. Martinez-Zapater and Julio Salinas, Humana press, 1998;

Blazquez et al., 1998. The Plant Journal 13(5): 685-689;

De Virgilio et al., 1993. Eur. J. Biochem. 21: 315-323;

Carruthers et al., 1982. Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 411-418;

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.G.D. Annu. Rev. Plant Physiol. 1997, 48: 575-607;

발명의 효과

본 발명의 효과는 형질전환 식물 조직에서 바람직한 폴리펩타이드를 암호화하는 이형의 유전자에 결합 가능한 식물의 강력한 구조 프로모터를 포함하는 분리된 핵산 구조물을 제공하는 것으로, 상기 구조물은 키메릭 유전자에서 이형의 코딩 서열에 대한 구조물로서 사용될 때 식물 뿌리 조직과 식물 잎 조직에서 바람직한 폴리펩타이드를 높게 발현시키게 할 수 있다. 어느 키메릭 유전자가 상기 구조물에 결합할 수 있는 후에, 결과적인 벡터는 식물 조직에 도입될

수 있고, 그것에 의하여 계획적으로 식물을 형질전환하고 결과적 식물이 그 안에 외래의 성분을 생산하게 만들 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
서열번호: 1로 나타난 뉴클레오타이드 서열(약 1kbp)을 지니는 식물에서 기능하는 분리된 프로모터

청구항 2.
서열번호: 2로 나타난 뉴클레오타이드 서열(약 2kbp)을 지니는 식물에서 기능하는 분리된 프로모터에 있어서, ⅰ) 아리비돕시스 탈리아나로부터 분리됨, ⅱ) SacI(0.12kb), BspHI(0.17kb), SauI(0.78kb) 및 SalI(1.0kb)에 대한 제한 효소 사이트를 지님, ⅲ) 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함함을 특징으로 하는 분리된 프로모터

청구항 3.
삭제

청구항 4.
삭제

청구항 5.
제 1항의 식물 프로모터와 바람직한 폴리펩타이드를 암호화하는 이형의 핵산을 포함하는 키메릭 유전자에 있어서, 상기 프로모터는 1kb 길이의 아라비돕시스 트레할로스-6-포스페이트 합성효소 3 프로모터임을 특징으로 하는 키메릭 유전자

청구항 6.
제 2항의 식물 프로모터와 바람직한 폴리펩타이드를 암호화하는 이형의 핵산을 포함하는 키메릭 유전자에 있어서, 상기 프로모터는 2kb 길이의 아라비돕시스 트레할로스-6-포스페이트 합성효소 3 프로모터임을 특징으로 하는 키메릭 유전자

청구항 7.
삭제

청구항 8.
삭제

청구항 9.
삭제

청구항 10.
삭제

청구항 11.
삭제

청구항 12.
삭제

청구항 13.
삭제

청구항 14.
삭제

청구항 15.
삭제

청구항 16.
삭제

청구항 17.
플라스미드를 포함하는 미생물에 있어서, 상기 미생물은 제 1항의 프로모터를 포함하는 *E.coli* DH5@/pLES99010 (KCTC 0811BP로 기탁됨) 이거나 제 2항의 프로모터를 포함하는 *E.coli* DH5@/pLES99011 (KCTC 0812BP로 기탁됨) 균임을 특징으로 하는 미생물

청구항 18.
구조물을 포함하는 미생물에 있어서, 상기 미생물은 제 1항의 프로모터를 포함하는 아그로박테리움 튜매파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101/pLES99014 (KCTC 0813BP로 기탁됨)이거나 제 2항의 프로모터를 포함하는 아그로박테리움 튜매파시엔스 GV3101/pLES99015 (KCTC 0814BP로 기탁됨) 균임을 특징으로 하는 미생물

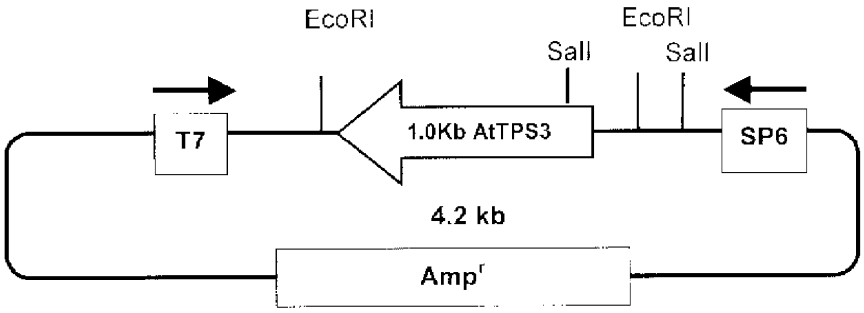
청구항 19.
삭제

청구항 20.
삭제

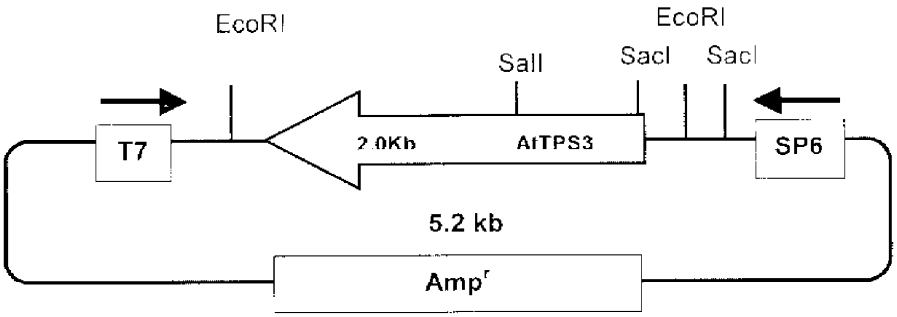
청구항 21.
삭제

도면

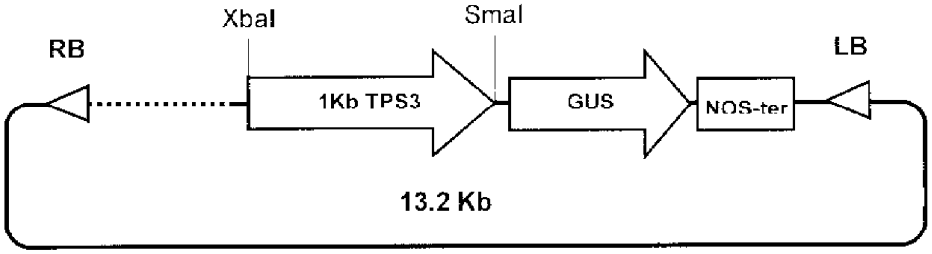
도면1a



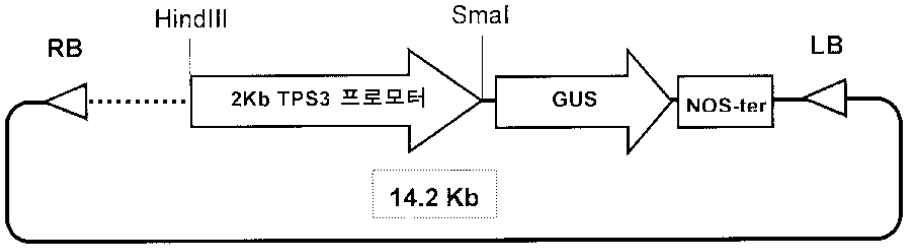
도면1b



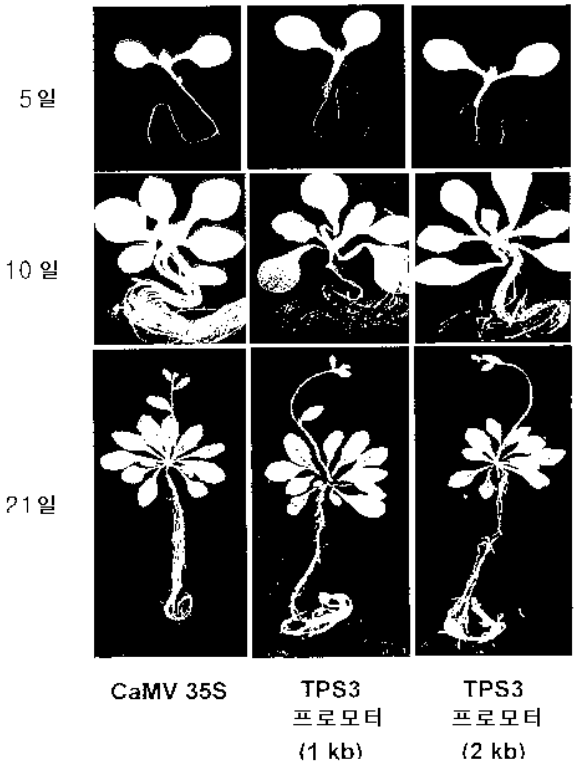
도면2a



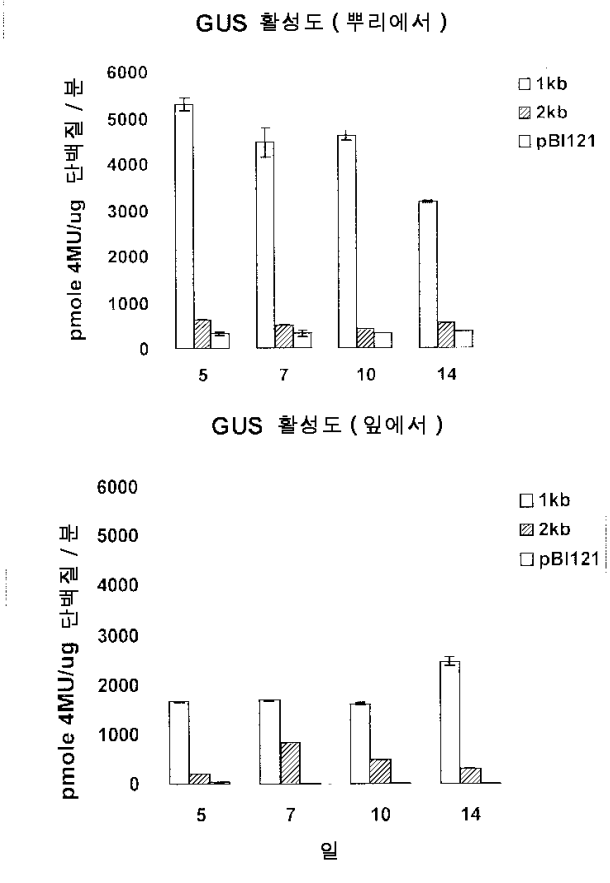
도면2b



도면3



도면4



<110> Korea Kumho Petrochemical Co., Ltd. <120> Expression cassette and plasmid for strong constitutive gene expression and the use thereof <130> KP-556 <160> 5 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 1013 <212> DNA <213> Arabidopsis thaliana <400> 1 gtgttcattt gatagagtct aaaa

tcacca cttacattga ctaaccccaa aaatttgtcc 60 taaacactaa tcaatccgaa gattataaaa tgtcgacaaa gaaaataaa a taaaatagga 120 gtctatgagt cgatggaact tatccaacta aactttaata agaatgaacc aaactcaatt 180 ttg taataat atttaaaata cgtttttact ctctcccaga atatcccatc tctctgattc 240 caattcctcc tctctctctt tcgtctct ct acttcgaatt gattgtttta accgccggtg 300 atcggagcaa actctctgac ggtgaccgcc ggtgatcatt ttttgtgaac tt cacttttg 360 gtaagcagct ttgacttttg ttcataatcc ttcacttttc cttttcaatt ttgctttttc 420 ctctgat ctg atcttagtta ttaagctgtt gaatcgcatg atcctttctt ctctgattga 480 ttatttctaa tccttcatgg gttttatgac g aatcgtgtc ttagggattg gttttttctg 540 ggttgggttt ctaaatttgt tggtctaaga acagtgaaat tgttgtttca gtgatc tcag 600 attctacact tctagtgatt gaactgttat ggaaaattac aaaatatgtg gctctgcttt 660 catttaaatt caatcatcat catctctgct acttgatgat caggtcacct tctctgtgtt 720 ttgtaatctc cataacgtaa gagtttgttt gatat tgcaa ttttgaataa gatgattagc 780 atccaatcca atagctgatg ttgaaaccta actctgtaaa gactttaaat ttgttttctc 840 tggctttgtg ctcgttgaag ggtaacctaa agatttgacc tttttgatcc aacacctctc 900 tttttgtact gtag gtgtat aaagcatagt tcgttgggaa ctttttttta cagctttgga 960 gtaactacct ttcatggttt ttggttccaa caatggggt c aaaatcattt gga 1013 <210> 2 <211> 1943 <212> DNA <213> Arabidopsis thaliana < 400> 2 cgacggcatt aacataaacc ataacgctag aaatcttaaa gtattctaat agcctaattt 60 ggtttttatt agaatt aaaa ccctacataa tcctggatgt gcgtaacgta gtagttgagc 120 tctattctta tacaccagta aagtaaataa ataaaaagaa cagaaaattt catgagcatg 180 cagtagaaaa atcagtcgaa tgttataaaa atagggttac agctaagttc gacgaggtgc 240 tatttcattg gatatcacga aacttgatcg tcaatatgtt ttctttttgt ctttttttgtt 300 tttgggtcaa cagatgtata aatgtatttg tatatagctt acatgaagaa cacttggtta 360 gctaaaaaga aaagctaaaa gaaacaaaag aggaggcagc taaa aaacga aaaaagagcc 420 agcattatag atgagcctct tcgtgagcaa gtgagtcgtt tattgtaaga tttgcctctt 48 0 ctaatttttt tctttaaagc cttataattg tatttaaaca aatatcttca taagaaaaaa 540 tatcaaatag atatcaatgt act tttcttt gaaataggat ttcgctatta atccttattt 600 taacattcat ataactgacc aattatattg gtatacagaa aaaaagaa tt gtatttgttt 660 ttttcacatt ttagtaaatc tcatttttttt ctttctaaat tatgattaat atgaaaatta 720 aa atagaaag tgacatgtcc ttatttttaac tccttttatt tcattcattg gtttaatgtt 780 atttacctaa ggatactaat cattggt ttt tgaaagataa caataaaaat tcattccaaa 840 catgtggtgc aattatatat aattacaaag tggatagagt atagaactac a aaatggata 900 gagtttagtt ataacaacta atttaaaaaa gtgttcattt gatagagtct aaaatcacca 960 cttaca ttga ctaaccccaa aaatttgtcc taaacactaa tcaatccgaa gattataaaa 1020 tgtcgacaaa gaaaataaaa taaaatagga gtctatgagt cgatggaact tatccaacta 1080 aactttaata agaatgaacc aaactcaatt ttgtaataat atttaaaata cgttt ttact 1140 ctctcccaga atatcccatc tctctgattc caattcctcc tctctctctt tcgtctctct 1200 acttcgaatt gattgtttta accgccggtg atcggagcaa actctctgac ggtgaccgcc 1260 ggtgatcatt ttttgtgaac ttcacttttg gtaa gcagct ttgacttttg ttcataatcc 1320 ttcacttttc cttttcaatt ttgcttttttc ctctgatctg atcttagtta ttaagctgt t 1380 gaatcgcatg atcctttctt ctctgattga ttatttctaa tccttcatgg gttttatgac 1440 gaatcgtgtc tta gggattg gttttttctg ggttgggttt ctaaatttgt tggtctaaga 1500 acagtgaaat tgttgtttca gtgatctcag attctaca ct tctagtgatt gaactgttat 1560 ggaaaattac aaaatatgtg gctctgcttt catttaaatt caatcatcat catctctgct 1620 acttgatgat caggtcacct tctctgtgtt ttgtaatctc cataacgtaa gagtttgttt 1680 gatattgcaa ttttgaa taa gatgattagc atccaatcca atagctgatg ttgaaaccta 1740 actctgtaaa gactttaaat ttgttttctc tggctttgtg c tcgttgaag ggtaacctaa 1800 agatttgacc tttttgatcc aacacctctc tttttgtact gtaggtgtat aaagcatagt 1860 tcgttgggaa ctttttttta cagctttgga gtaactacct ttcatggttt ttggttccaa 1920 caatggggtc aaaatcattt gga 1943 <210> 3 <211> 21 <212> DNA <213> Arti ficial Sequence <220> <223> Artificial sequence <400> 3 tccaaatgat tttgacccca t 21 <210> 4 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220 > <223> Artificial sequence <400> 4 gtgttcattt gatagagtct a 21 <210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Artificia l sequence <400> 5 cgacggcatt aacataaacc 20