



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월14일
 (11) 등록번호 10-1857606
 (24) 등록일자 2018년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2018.01)
C12N 9/88 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 15/8271 (2013.01)
A01H 5/00 (2018.05)
 (21) 출원번호 10-2015-0174926
 (22) 출원일자 2015년12월09일
 심사청구일자 2015년12월09일
 (65) 공개번호 10-2016-0078240
 (43) 공개일자 2016년07월04일
 (30) 우선권주장
 1020140188533 2014년12월24일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 Plant Biotechnology, Vol. 26, No. 5, 페이지
 523-533 (2009.11.02.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충북대학교 산학협력단
 충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)
 (72) 발명자
강권규
 충청남도 천안시 동남구 서부대로 257-8, 102동
 101호(신방동, 신방동 대주피오레)
정유진
 경기도 안성시 중앙로 327 한경대학교 I동 316호
조용구
 충청북도 청주시 흥덕구 장구봉로101번길 27, 자
 비동 301호(복대동, 형석타운)
 (74) 대리인
윤대용, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 7 항

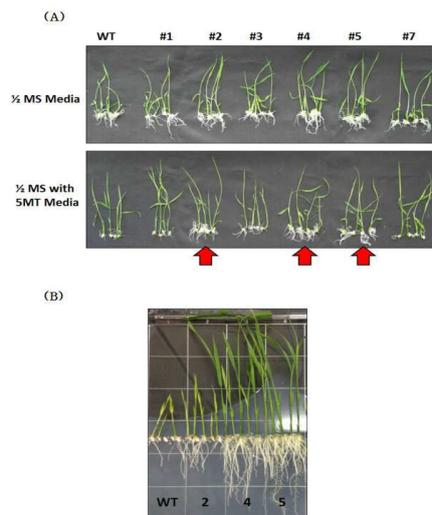
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **5-메틸트립토판 저항성 안트라닐레이트 합성효소 변이체 유전자의 형질전환식물체 선별마커로서의 용도**

(57) 요약

본 발명은 5-메틸트립토판에 대해 저항성을 갖는 안트라닐레이트 합성효소 변이체 코딩 폴리뉴클레오타이드의 형질전환 식물체 선별용 마커로서의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 5-메틸트립토판에 대해 저항성을 갖는 안트라닐레이트 합성효소 변이체 코딩 폴리뉴클레오타이드의 형질전환 식물체 선별용 마커는 종래에 사용되던 항생제 마커를 대체할 수 있으며, 항생제 유전자를 포함하지 않는 GM (Genetically modified) 작물 개발이 가능한 효과를 갖는다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

C12N 9/88 (2013.01)

C12Y 401/03027 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013031239

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기획평가원

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 Gene targeting 기술을 활용한 고품질 tryptophan 생산 고품질 벼 개발

기여율 1/2

주관기관 충북대학교

연구기간 2011.11.10 ~ 2014.11.09

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213001-04-3-SB220

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 Golden Seed 프로젝트 사업

연구과제명 일대잡종 벼 육종효율증진 분자유종 및 생물검정 체계구축

기여율 1/2

주관기관 충북대학교

연구기간 2013.07.25 ~ 2017.05.02

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는, 5-메틸트립토판에 대해 저항성을 갖는 안트라닐레이트 합성효소 (Anthranilate Synthase) 변이체.

청구항 2

제 1 항의 안트라닐레이트 합성효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 형질전환 식물세포 선별용 재조합 벡터.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 3에 도시된 벡터의 구성을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 4

(a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고 5-메틸트립토판에 대해 저항성을 갖는, 안트라닐레이트 합성효소 (Anthranilate Synthase) 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터; 및 (b) 5-메틸트립토판을 포함하는 형질전환 식물세포 선별용 키트.

청구항 5

삭제

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 형질전환된 식물세포를 선별하는 방법:

- (a) 제 2 항 및 제 3 항 중 어느 한 항 기재의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계;
- (b) 상기 형질전환된 식물세포를 5-메틸트립토판이 포함된 배지에서 배양하는 단계; 및
- (c) 상기 배양된 배지에서 성장된 식물세포를 선별하는 단계.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 식물 세포는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 담배, 감자, 토마토, 또는 고구마의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항의 안트라닐레이트 합성효소 변이체 코딩 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 형질전환 식물체.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 5-메틸ทริป토판 저항성 안트라닐레이트 합성효소 변이체 유전자의 형질전환식물체 선별마커로서의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 약 50종의 선별 마커 유전자들이 형질전환식물체 연구 또는 작물 개발에서 효율성, 생물학적 안전성 및 과학적 적용 및 상업화가 가능한 지 여부에 대해 평가되고 있다. 선별 마커 유전자들은 포지티브 선별(positive selection) 또는 네가티브 선별(negative selection)인지 여부와 외부 기질의 존재 여부에 따라 조건적인지 또는 비조건적인지에 따라 분류될 수 있다. 포지티브 선별 마커 유전자는 형질전환체의 성장을 촉진하는 유전자인데 반해, 네가티브 선별 마커 유전자는 형질전환체의 사멸을 유도하는 마커 유전자이다. 최초에는 항생제, 제초제 또는 약물과 같은 독성물질의 사용에 조건적인 포지티브 선별 마커 유전자가 개발되고 사용되었다. 최근에는 형질전환 조직체의 성장과 분화를 유도하기 위한 기질(substrate)이 될 수 있는 비독성제와 같은 포지티브 선별 마커 유전자가 개발되고 있다.

[0004] 안트라닐레이트 합성효소(Anthranilate Synthase)는 방향족 아미노산 시키메이트(shikimate)로부터ทริป토판을 생합성하는 반응의 최초 반응인 코리스메이트(chorismate)를 안트라닐레이트로 변환하는 반응을 촉매하는 효소이다. 고등식물에서ทริป토판 생합성 경로는 단백질 합성을 위한 아미노산을 제공하는 제1의 목적이외에, 중요하고 다양한 2차 대사산물의 합성에 필요한 전구체를 생성하는데 사용된다.ทริป토판 생합성의 최초 반응을 촉매하는 효소인 안트라닐레이트 합성효소는ทริป토판에 의한 피드백 억제(feedback inhibition)를 받는다.ทริป토판 유사체(analog)인 5-메틸ทริป토판(5-methyltryptophan, 5-MT)이 포함된 배지에서 성장할 수 있는 세포는 세포내ทริป토판 생합성계에 이상이 생겨 피드백 억제(feedback inhibition) 작용을 하지 못하도록 변이가 된 것이라고 추정된다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2009-0050189호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 형질전환식물체에서 형질전환 여부를 확인하고 선별하기 위한 선별마커를 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과,ทริป토판 유사체인 5-메틸ทริป토판(5-methyltryptophan, 5-MT)이 포함된 배지에서도 성장성을 부여하는 안트라닐레이트 합성효소(Anthranilate Synthase)의 변이체를 성공적으로 분리하였고, 이렇게 분리된 안트라닐레이트 합성효소 변이체 유전자가 형질전환 식물체를 선별할 수 있는 선별마커로 사용될 수 있음을 실험적으로 증명하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 5-메틸ทริป토판에 대해 저항성을 부여하는 안트라닐레이트 합성효소 변이체 코딩 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 형질전환 식물세포 선별용 재조합 벡터를 제공하는 데에 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 (a) 5-메틸ทริป토판에 대해 저항성을 갖는 안트라닐레이트 합성효소(Anthranilate Synthase) 변이체 코딩 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터; 및 (b) 5-메틸ทริป토판을 포함하는 형질전환 식물세포 선별용 키트를 제공하는 데에 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터를 사용하여 형질전환된 식물세포를 선별하는 방법을 제공하는 데에 있다.

[0014] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 5-메틸트립토판에 대해 저항성을 부여하는 안트라닐레이트 합성효소 (Anthranelate Synthase) 변이체 코딩 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 형질전환 식물세포 선별용 재조합 벡터를 제공한다.

[0017] 본 명세서에서 “안트라닐레이트 합성효소”는 식물의 트립토판 생합성 경로에서 트립토판의 생합성 속도를 조절하는 핵심 효소로서, 이 효소의 α-서브유닛이 생합성 경로의 최종산물인 트립토판에 의한 피드백 억제를 받는 것으로 알려져 있는 효소이다.

[0018] 본 발명의 안트라닐레이트 합성효소의 변이체는 야생형 효소의 아미노산 서열에서 F124V의 단일변이(single mutation) 또는 S126F 및 L530D의 이중변이(double mutation)를 포함하며, 이러한 변이로 인해 트립토판에 의한 피드백 억제 작용이 소멸 또는 완화된 변이체인 것으로 추정된다.

[0019] 본 발명의 안트라닐레이트 합성효소의 변이체를 갖는 식물 세포는 트립토판 유사체(tryptophan analog)인 5-메틸트립토판(5-methyltryptophan)의 존재하에서도 생장이 가능한 5-메틸트립토판 저항성을 갖는다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 상기 5-메틸트립토판에 대해 저항성을 부여하는 안트라닐레이트 합성효소 변이체는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명에서 상기 재조합 벡터는 도 3에 도시된 벡터의 구성을 갖는다.

[0022] 본 명세서에서 용어 “폴리뉴클레오타이드”는 “핵산 분자”, “폴리뉴클레오타이드 분자” 또는 “폴리뉴클레오타이드 서열”과 동일한 의미로 사용된다. 폴리뉴클레오타이드 분자는 뉴클레오타이드 모노머(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오타이드의 폴리머(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA(deoxyribonucleic acid) 또는 RNA(ribonucleic acid) 가닥을 의미한다.

[0023] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 안트라닐레이트 합성효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 3 또는 서열번호 4에 개시된 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0024] 본 발명의 재조합 벡터는 상기 안트라닐레이트 합성효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드(핵산 분자)를 형질전환 식물세포 또는 형질전환 식물체 선별용 마커로서 포함한다.

[0025] 본 발명의 재조합 벡터는 예를 들어 플라스미드, 또는 셔틀(shuttle) 벡터, 박테리아 발현용 또는 클로닝용의 원핵세포용 벡터일 수 있으며, 효모세포용 벡터, 곤충세포용 벡터, 식물세포용, 동물세포용 벡터와 같은 진핵성 벡터일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0026] 본 발명의 벡터는 DNA 재조합 기술을 이용한 공지된 방법에 따라 당업자가 용이하게 제조할 수 있으며, 이에 관한 내용은 예를 들어 선행 문헌 “Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual(2nd ed. 1989; 3rd ed., 2001)” ; “Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual(1990)” ; 및 “Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al., supra. Bacterial expression systems for expressing the ZFP are available in, e.g., E. coli, Bacillus sp., and Salmonella (Palva et al., Gene 22:229-235(1983))” 에 설명되어 있으며, 이들 문헌은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

[0027] 본 발명의 재조합 벡터에서 안트라닐레이트 합성효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 발현조절서열(예컨대 프로모터 서열)에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 본 명세서에서 용어 “작동 가능하게 연결”은 발현조절서열이 안트라닐레이트 합성효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 전사(transcription) 및 번역(translation)을 조절하도록 연결된 것을 의미하며, 발현 조절 서열의 조절하에 폴리뉴클레오타이드 서열이 발현되어 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 안트라닐레이트 합성효소 변이체가 생성되도록 번역 프레임(translation frame)이 정확히 유지되는 것을 포함한다.

[0028] 본 발명의 재조합 벡터에서 사용될 수 있는 프로모터는 식물 세포에서의 항시성(constitutive) 또는 유도성(inducible) 프로모터를 포함한다. 식물세포에서 사용할 수 있는 프로모터는 예컨대, 애기장대(A. thaliana)의 유비퀴틴-3(ubi-3) 유래 프로모터 서열(Callis, et al., 1990, J. Biol. Chem. 265-12486-12493), 아그로박테리움 투메파시엔스(A. tumefaciens) 만노핀 합성효소 유래 프로모터 서열(미국특허 제6,730,824호), 및/또는 CsVMV(Cassava vein mosaic virus) 유래 프로모터 서열(Verdaguer et al., 1996, Plant Molecular Biology

31:1129-1139)을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0029] 본 발명의 재조합 벡터는 전형적으로 원핵 또는 진핵 숙주세포에서 핵산을 발현시키는 데에 요구되는 모든 추가적인 요소를 함유하는 발현 카세트 또는 전사 단위를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 재조합 벡터는 안트라닐레이트 합성효소를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열과 작동적으로 연결된 프로모터 이외에, 전사체의 효율적인 폴리아데닐화 서열, 전사 종결, 리보솜 결합 부위, 또는 번역 종결에 요구되는 신호서열을 포함하며, 부가적 요소로서, 증강요소(enhancer element), 이중 스플라이싱 신호 또는 핵 국제화 신호(NLS) 등이 포함될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 5-메틸트립토판에 대해 저항성을 갖는 안트라닐레이트 합성효소 (Anthranilate Synthase) 변이체 코딩 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터; 및 (b) 5-메틸트립토판을 포함하는 형질전환 식물세포 선별용 키트를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 5-메틸트립토판에 대해 저항성을 갖는 안트라닐레이트 합성효소 변이체는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0032] 본 발명의 재조합 벡터에 대한 내용은 상기 본 발명의 다른 양태인 형질전환 식물세포 선별용 재조합 벡터에서 설명된 내용과 동일하므로, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복하여 설명하지 않는다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 형질전환된 식물체를 선별하는 방법을 제공한다: (a) 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계; (b) 상기 형질전환된 식물세포를 5-메틸트립토판이 포함된 배지에서 배양하는 단계; 및 (c) 상기 배양된 배지에서 성장된 식물세포를 선별하는 단계.
- [0035] 본 발명의 방법에 따르면, 본 발명의 재조합 벡터에는 5-메틸트립토판에 대한 저항성을 부여하는 안트라닐레이트 합성효소 변이체 코딩 폴리뉴클레오타이드 선별 마커가 포함되어 있으므로, 형질전환된 식물세포를 5-메틸트립토판이 포함된 배지에서 배양하면서 성장된 식물세포만을 선별하면 상기 재조합 벡터로 형질전환된 식물세포를 선택적으로 선별할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어 “형질전환” 과 “도입” 은 서로 동일한 의미로 사용되며, 사용된 방법에 관계없이 외래 폴리뉴클레오타이드 서열을 숙주 세포로 전달하는 것을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 재조합 벡터를 사용한 형질전환에 이용될 수 있는 식물조직은 기관 발생이나 배 발생에 의하여 클론 번식이 가능하여, 전체의 식물체가 조직으로부터 재생될 수 있는 조직이다. 형질전환에 이용되는 특정 조직은 형질전환될 특정 종에서 이용 가능한 것으로서 가장 적합한 클론 번식 시스템에 따라 다양하게 선택된다. 예컨대 전형적인 형질전환 타겟 조직은 잎 디스크, 종자, 화분, 배, 자엽, 하배축, 대배우체, 캘러스 조직, 분열조직(예를 들면, 정단 분열조직, 액아, 및 뿌리 분열 조직), 및 유도된 분열조직(예를 들면, 자엽 분열조직 및 하배축 분열조직)을 포함한다.
- [0038] 본 발명에서 도입되는 안트라닐레이트 합성효소 변이체 코딩 폴리뉴클레오타이드는 일시적으로 또는 안정적으로 숙주 세포에 도입되며 예를 들면, 플라스미드처럼 비통합적으로 유지될 수 있으며, 또는 숙주의 지놈(genome)안으로 통합될 수 있다. 제조된 형질전환 식물 세포는 당업자에게 주지된 방식으로 형질전환 식물을 재생하는데 사용된다.
- [0039] 본 발명에서 사용될 수 있는 형질전환 방법은 리포솜, 전기천공법, 유리 DNA 흡수를 증가시키는 화학물질, 식물체 내로 DNA의 직접적인 주입, 입자총 충격법, 바이러스 또는 화분을 이용한 형질전환 및 미세주입법(microprojection), 원형질에 대한 칼슘/폴리에틸렌글리콜법(Krenset et al, 1982; Negrutiu et al, 1987), 원형질의 전기천공법(Shillito et al, 1985), 미세주사법(microinjection)(Crossway et al, 1986), DNA 또는 RNA 코팅된 입자 충격법(Klein et al, 1987), 바이러스 감염에 의한 방법, 및 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)-매개 형질전환법을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 온전한 식물로 재생되는 체세포의 형질전환 외에, 식물의 분열조직 특히 종자로 발달하는 세포의 형질전환이 가능하다. 이 경우에, 형질전환된 종자는 자연적인 식물 발달 과정을 거쳐 형질전환 식물이 된다. 예를 들어, 형질전환시킬 식물체의 종자를 재조합 발현 벡터를 갖는 아그로박테리움 투메파시엔스로 처리하여 형질전환된 종자를 얻고, 형질전환된 종자가 형질전환 식물체로 성장된다.
- [0041] 본 발명의 형질전환 식물체는 바람직하게는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리, 수수 등의 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 과, 양파 및 당근 등의 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채 등의 특용 작물류; 사과나무, 배

나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나 등의 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립 등의 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스 등의 사료 작물류를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 형질전환 식물체는 바람직하게는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 담배, 감자, 토마토, 또는 고구마이며, 가장 바람직하게는 벼이다.

발명의 효과

[0043] 본 발명은 5-메틸트립토판에 대해 저항성을 갖는 안트라닐레이트 합성효소 변이체 코딩 폴리뉴클레오타이드의 형질전환 식물체 선별용 마커로서의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 5-메틸트립토판에 대해 저항성을 갖는 안트라닐레이트 합성효소 변이체 코딩 폴리뉴클레오타이드의 형질전환 식물체 선별용 마커는 종래에 사용되던 항생제 마커를 대체할 수 있으며, 항생제 유전자를 포함하지 않는 GM (Genetically modified) 작물 개발이 가능한 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 식물에서의 트립토판 생합성 경로를 모식적으로 보여준다. 안트라닐레이트 합성효소(anthranilate synthase)는 트립토판 생합성의 핵심 효소이다.

도 2는 야생형과 변이형 벼의 표현형을 나타낸다. 5-메틸트립토판 처리 후 14일 후의 사진이다.

도 3은 벼에서 제초제 저항성 유전자 Bar(phosphinotricine acetyltransferase gene)을 과발현을 위한 Ti-플라스미드 벡터 구조를 보여준다. PGD1 프로모터 및 CaMV 35s 프로모터 유전자, 선별마커로 사용되는 OsASA2 유전자, 3' PINII: 프로테아제 억제자 II 종결자 유전자, 및 3' nos(nopaline synthase terminator) 유전자가 표시되어 있다.

도 4는 아그로박테리움 매개 형질전환법을 통해 변이체 OsASA2 유전자를 도입하는 과정을 보여준다. 종자를 N6D 배지에 침종, 접종, 2N6-AS 배지에서 공동배양, 2N6-C 배지에서 캘러스 성장, 줄기(shoot) 형성 및 성장, 뿌리 형성 및 성장, 및 순화의 과정을 프로토콜에 따라 실시하였다.

도 5의 패널 A는 형질전환 벼 계통에서 도입된 유전자(Bar, *PGDI::OsASA2*)의 PCR 증폭결과를 보여준다. 증폭산물을 1.5% 아가로스젤상에서 분리하였다. Lane M; DNA ladder, Lane WT; 야생형 식물, Lane MC; Mock 대조군, Lane 1-2; 개별의 형질전환 벼 계통(S-TG; 단일 점 변이체, D-TG; 이중 점 변이체). 패널 B는 역전사 PCR 방법에 의해 얻은 형질전환체 계통에서 OsASA2 발현을 분석한 결과이다. 총 RNA를 각 식물체로부터 분리하고, 0.5 μg의 RNA를 유전자 특이적 프라이머로 증폭하였다. 로딩 대조군으로서, 액틴 유전자에 대해 특이적인 프라이머로 증폭한 샘플도 로딩하였다.

도 6은 형질전환 벼에서 단일 카피(single copy) 선별을 위해 TaqMan 프로브를 사용하여 행한 TaqMan PCR 분석 결과를 보여준다.

도 7은 벼에서 야생형, mock 대조군 및 OsASA2 형질전환체의 표현형을 보여준다. (S-TG; 단일 점 변이체, D-TG; 이중 점 변이체). 패널 A는 T1 세대, 패널 B는 T2 세대.

도 8은 야생형(WT) 및 OsASA2 형질전환체(S-TG 및 D-TG) 벼 종자계통에서의 대표 크로마토그램을 보여준다. 추출물을 PDA 검출과 조합한 HPLC에 의한 대사 프로파일링을 수행하였다. 패널 A는 트립토판 및 IAN(Indole-3-acetonitrile)이고 패널 B는 IAA(Indole-3-acetic acid)이다.

도 9는 논에서 성장시킨 형질전환체들로부터 유래한 종자들의 Trp, IAN 및 IAA 함량을 측정된 결과이다. 유리 Trp, IAN 및 IAA의 양을 S-TG, D-TG 또는 야생형(WT) 식물체의 동일한 종자내에서 정량하였다. 데이터는 건조 종자 중량의 그램당 분석물의 나노몰로 표현하였고, 6개 종자의 3개 그룹로부터 측정된 평균 ± SD로 나타내었다.

도 10의 패널 A는 식물에서 트립토판의 생합성 경로를 보여준다. 본 발명에서 언급된 관련 경로를 나타내었다. 트립토판으로부터 안트라닐레이트 합성효소(anthranilate synthase)로의 곡선은 억제적 피드백 조절을 나타낸다. 패널 B는 트립토판 대사와 관련된 몇 개 유전자들의 발현 수준을 나타낸다.

도 11은 25 mg/L 5-메틸트립토판을 포함한 Murashige and Skoog 배지(1/2MS)에서 종자를 성장시켜 다양한 계통의 종자를 스크리닝한 결과를 보여준다. 변이체 계통 5MT-4 및 5MT-5는 줄기와 뿌리가 잘 성장하였다(패널 A, 및 B). 야생형은 동진벼를 사용하였다.

도 12에는 5MT를 25ppm 함유한 배지에서 야생형 동진(Dongjin)벼 캘러스와 상기 실시예 3에서 제조한 pSP1-5MT 벡터를 형질전환시킨 형질전환 동진벼 캘러스를 배양한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0048] **실시예**

[0050] **실시예 1: 5-메틸트립토판 저항성 벼 돌연변이체의 선별**

[0051] 벼에 EMS 처리를 하여 돌연변이를 유도하였으며, 벼 돌연변이체를 5-메틸트립토판(5-methyltryptophan) 25 ppm을 포함한 MS 배지에서 배양하여 5-메틸트립토판 저항성 벼 계통을 선별하였다. 5-메틸트립토판 저항성 계통으로 확인된 #2 계통(Mutant line 2)와 #4 계통(Mutant line 4)를 5-메틸트립토판 50 ppm을 포함한 MS 배지에서 14일간 생육시킨 후 벼를 관찰한 사진을 도 2에 나타내었다. 도 2에서 보여지는 바와 같이, 5-메틸트립토판 저항성 계통 #2와 #4 계통의 뿌리 및 줄기의 생육은 정상적이었으며, 대조구에서는 생육이 되지 않았다. 상기 결과는 5-메틸트립토판이 포함된 배지에서 생육할 수 있는 벼는 세포내 트립토판 생합성계에 이상이 생겨 피드백 억제 작용을 하지 못하도록 변이가 유도되어 결국 세포내에 트립토판의 함량이 높아지는 현상에 기인한다. 초기 5-메틸트립토판 저항성 돌연변이체에서 트립토판의 함량이 대조구에 비해 8배 이상 높게 나타났다.

[0053] **실시예 2: 5-메틸트립토판 저항성 돌연변이 ASA2 유전자의 구조 분석**

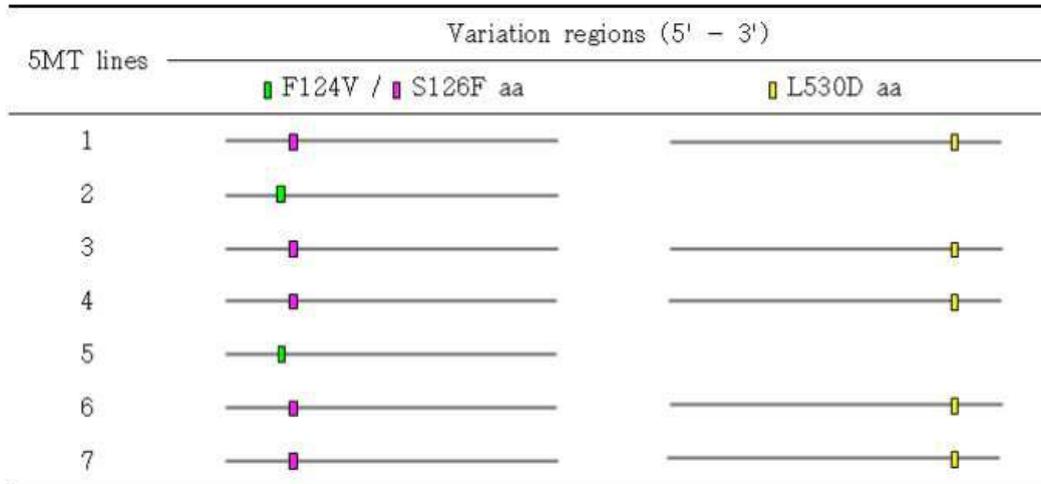
[0054] 트립토판 생합성 경로의 핵심 효소인 안트라닐레이트 합성효소(Anthranilate synthase)를 코딩하는 유전자는 OsASA1과 OsASA2로 알려져 있다(NCBI database). 이들 유전자는 3번 염색체상에 위치하고 있으며, OsASA1는 short arm에 존재하며 11개의 엑손으로 구성되어 있으며, 총 1831bp의 ORF로 이루어졌다. 또한 OsASA2 유전자는 3번 염색체 long arm에 위치하며, 10개의 엑손영역과 9개의 인트론 영역으로 1821bp의 ORF로 이루어져 있다. 5-메틸트립토판 저항성 변이체는 트립토판 생합성 경로중의 합성 조절의 핵심 효소인 안트라닐레이트 합성효소 α-서브유닛 유전자가 변이되어 최종 산물인 트립토판에 의한 피드백 억제가 낮게 나타난 것으로 추정되었다. 따라서, 저항성 변이체의 안트라닐레이트 합성효소 유전자에 대해 변이 여부를 확인하기 위해, 상기 효소의 클로닝을 위한 프라이머 세트를 제작하였다. 제작한 프라이머는 다음과 같다: 프라이머 : [정방향: 5' - ATGGAGTCCATCGCCGCCCA-3' (서열번호 5), 역방향: 5' -AGCTTTCGTAGACAAGGAATAG-3' (서열번호 6)].

[0055] 지놈 DNA의 분리는 CTAB(Cetyltrimethyl ammonium bromide) 법을 이용하였다. 식물로부터 0.5g의 잎을 채취하여 액체 질소를 이용하여 미세하게 분쇄하였고, DNA 추출 완충액[100mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM EDTA, 500mM NaCl] 400 가 담긴 1.5 ml 원심분리용 튜브에 분쇄한 조직을 넣고 상하로 20회 흔들어 혼합하였다. 그 후, 2X CTAB 완충액 [2% (w/v) CTAB, 100mM Tris-HCl (pH8.0), 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 1% pvp-40 (polyvinylpyrrolidone)] 200 를 첨가하여 같은 방법으로 혼합하고 10% SDS를 넣고 10회 정도 상하로 흔들어 혼합한 후, 65℃ 항온수조에 20분간 방치하였다. 5M 포타슘 아세테이트(potassium acetate, pH 7.5) 200를 첨가하고 50회 정도로 상하로 흔들어 섞어준 후, PCI [Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25: 24: 1)]를 700넣고 30회 정도 상하로 섞어 실온에서 12,000rpm, 10분간 원심분리 하여 단백질을 분리해냈다. 상층 400 정도를 새로운 1.5 ml 튜브로 옮긴 후 동량의 이소프로판올(isopropanol)을 첨가하여 -20℃ 냉동고에 20분간 보관하였다가 4℃의 12,000rpm에서 15분간 원심분리 하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 70% 에탄올 1 ml를 넣고 세척한 다음 실온에서 완전히 건조시키고 RNase (1mg/ml) 2 가 첨가된 TE 완충액(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.4) 50 에 충분히 녹인 후 37℃에서 1시간 방치한 후 사용하였다.

[0056] 제작한 프라이머를 사용하여 PCR을 95℃에서 5분간 전-변성(pre-denaturation)시킨 후 94℃에서 1분간 변성(denaturation), 58℃에서 1분간 어닐링(annealing), 72℃에서 2분간 연장(extension)의 과정을 35 사이클 행하였으며, 마지막으로 72℃에서 5분간 연장을 실시하였다. PCR 산물을 0.8% 아가로즈젤에 전기영동한 결과 예상했던 1.2 kb 밴드가 검출되었다. 이들 밴드를 젤로부터 회수하여 pGEM T-easy 벡터에 삽입한 후 염기서열을 분석하였다. 그 결과 유전자의 전장은 2248bp 이었으며, 1824bp의 ORF와 35bp크기의 5UTR, 349bp의 3UTR으로 이루어졌다. 5-메틸트립토판 저항성의 7개 계통의 변이체에서 #2와 #5 계통은 124 번째 아미노산 위치에서 아미노산 F(Phenylalanine)가 V(Valine)으로 바뀌었으며, 나머지 계통들에서는 2개의 점돌연변이가 각각 126번 아미노산 위치에서 TCC(Serine) → TTC(Phenylalanine)으로, 530번 아미노산 위치에서 CTT(Leucine) →

GAC(Aspartic acid)으로 바뀌어 나타났다(표 1).

표 1



[0057]

[0059] 실시예 3: OsASA2 변이체 유전자를 선발마커로 포함하는 Ti-플라스미드 벡터의 구축

[0060] 식물 형질전환용 운반체는 pPDG1 벡터(MYONGJI UNIVERSITY)를 모벡터로 사용하였고, 목표 유전자의 발현을 검정하기 위하여 Bar 유전자를 CaMV 35S 프로모터에 연결하여 제작하였다. 형질전환된 캘러스 및 식물체의 선발을 위해서는 PDG1 프로모터에 의해 제어되는 변이체 OsASA2(anthranilate synthase) 유전자를 이용하였다. 실험에 사용된 운반체의 모식도는 도 3에 나타내었다. 식물 발현용 벡터 구축이 확인된 플라스미드를 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) LBA 4404에 형질전환시켰다. 28℃에서 동일한 방법으로 제조된 아그로박테리움 투메파시엔스 컴피턴트 세포(A. tumefaciens competent cell) LBA4404 를 얼음에서 녹인 후 플라스미드 DNA 1µL와 혼합한 후 전기충격 큐벳에 주입하였다. 그 다음 1,440 V로 전기충격을 가하여 형질전환시킨 후 SOC 배지 1 mL을 주입하여 혼합한 후, 멸균된 시험관에 넣고 28℃에서 200 rpm으로 1시간 동안 배양하였다. 배양액은 카나마이신 50 mg/L을 포함한 AB 아가(Agar) 배지에 200 µL를 피펫으로 떨어뜨려서 도말하고, 28℃ 항온기에서 페트리 디쉬에 2-3일 동안 배양하여 콜로니를 관찰하였다. 콜로니 PCR 방법으로 형질전환 여부를 확인하고, 확인된 균주의 배양은 카나마이신 50 mg/L이 첨가된 AB 액체배지에 접종한 후, 2-3일 동안 28℃ 인큐베이터에서 200 rpm으로 배양하였다. 배양액은 50% 글리세롤을 동량 첨가하여 초저온 냉동고(-80℃)에 저장하였다.

[0062] 실시예 4: 5-메틸트립토판 저항성 OsASA2 변이체 유전자 도입 형질전환 벼의 제작

[0063] 벼에 형질전환하기 위해 일반적으로 많이 이용되는 방법은 벼 종자에서 캘러스를 유기한 후 캘러스에 아그로박테리움균과 함께 접종하는 방법이 주로 이용되고 있는데 보통 형질전환체를 얻기까지 약 4 개월이 소요된다. 본 실험에서는 벼 형질전환에 소모되는 시간을 단축시키고자 벼 성숙종자를 세척한 후 N6 액체배지에 24시간 침중한 후 배반 부분이 부풀어 오르기 시작한 종자를 이용하여 아그로박테리움 접종을 시도하였다. 표면 살균한 종자를 2 mg/L의 2,4-D가 포함된 N6 액체배지[Chu CC, Wang CS, Sun CC, Hsu C, Yin KC, Chu CY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on thenitrogen sources. Sci Sinica 18:659-668]에 침중하여 30℃ 암상태에서 24시간 동안 발아시켜, 배 부분이 부풀어 오르면 식물체가 분화가 되기 시작한 종자를 15 mL의 아그로박테리움 현탁액이 담겨있는 튜브에 담가 약 20 분간 접종한 다음 멸균한 필터페이퍼 위에 종자를 올려놓아 여분의 아그로박테리움을 제거하였다. 아그로박테리움을 접종한 종자를 1 mM의 DTT(dithiothreitol), 3 mg/L의 AgNO₃(silver nitrate), 0.5% gelrite가 포함된 2N6-AS 배지 위에 필터페이퍼를 깔고 그 위에 치상하여 25℃ 암조건에서 3일간 공동 배양하였고, 그 후 배지 성분의 영향력을 높이기 위해 필터페이퍼를 제거한 배지에 치상하여 25℃ 암조건에서 4일간 공동 배양하였다. 공동배양 기간 동안 아그로박테리움의 과도한 성장을 막고 아그로박테리움 도입에 따른 식물세포의 방어가작으로 생성될 수 있는 물질을 줄이기 위해 1 mM의 DTT(dithiothreitol), 3 mg/L의 AgNO₃(silver nitrate) 등을 배지에 포함하였다. 7일간의 공동 배양 후 호르몬에 따른 캘러스 형성율을 살펴본 결과 박테리움에 감염 후 캘러

스 형성 및 생육은 감염되지 않았을 경우 보다 효율적이지 못하였다. 공동배양 시 아그로박테리움의 과도한 생육을 억제할 수 있는 항산화 물질의 첨가와 더불어 사용되는 호르몬의 적절한 조절은 공동배양 과정에서 효율적인 캘러스 형성 및 아그로박테리움에 의한 목표 유전자의 도입을 가능하게 할 수 있을 것으로 판단되었다. 본 실험에서 사용한 종자는 아직 캘러스 증식이 충분치 않은 상태이기 때문에, 건전한 상태의 캘러스를 증식시키고 아그로박테리움의 생장 억제를 위해 400 mg/L의 카르베니실린(carbenicillin)만이 포함된 N6D 배지에 옮겨 32°C의 지속 광조건으로 1주 동안 배양하여 캘러스를 증식하였다. 캘러스 증식 1주 후 건전한 상태의 캘러스를 이용하여 유전자가 삽입된 캘러스 선발을 위해 25 mg/L 5-메틸트리프토판(5-MT)와 400 mg/L 카르베니실린이 포함된 N6D 배지에 옮겨 32°C 지속 광조건으로 2주 동안 배양하였다.

[0064] 배양 후 배반으로부터 왕성하게 증식하는 캘러스를 SF(shoot formation) 배지로 옮겨 식물체의 재분화를 유도하였다. 항생제가 포함된 배지에서 2주가 지난 후부 터 캘러스에서 그린 스팟(green spot)이 형성되기 시작하였고(도 4 참조), 약 3주의 배양기간 후에는 캘러스에서 줄기(shoot)가 형성되기 시작하였다(도 4 참조). 항생제 배지에서 SF 배지로 옮긴 후 그린 스팟 형성 및 재분화 효율은 접종하는 유전자에 따라 다른 양상을 보였다. 지상부가 재분화된 식물체를 RF(root formation) 배지(도 4)로 옮겨 뿌리 발생을 유도하였으며, 순화된 버 형질전환 식물체를 온실에서 포트에 이식하여 재배하였다(도 4). 본 실험에서 사용한 동진 버는 형질전환 캘러스 115개 중 총 35개의 형질전환 식물체를 얻어 높은 형질전환 효율을 보였다.

[0066] **실시예 5: 형질전환후대에서 도입 OsASA2 유전자 확인 및 유전자 발현 해석**

[0067] 형질전환 실험에서 얻어진 형질전환 후대 식물체를 대상으로 버 계놈상에서 OsASA2 유전자의 도입 여부 및 유전자의 발현 양상을 살펴본 결과는 도 5에 나타내었다. 먼저 유전자 도입의 확인은 T0 식물체로부터 종자를 얻어 버 유도상자에 계통당 20개씩 종자를 파종하고, 발아시킨 후, 14 일경에 4ppm의 bastar 처리를 통해 저항성을 보인 식물체를 이용하여 도입유전자 Bar 및 OsASA2 유전자 특이 증폭용 프라이머 세트(primer set)를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 조사한 단일 변이(single mutation)을 일으킨 ASA2 유전자 및 이중 변이(double mutation)을 일으킨 ASA2 유전자를 도입한 형질전환 후대에서 Bar 및 OsASA2 유전자가 검출되었다(도 5의 패널 A). 또한 이들 식물체에서 도입 유전자가 대조구 및 Mock 에서보다 많이 발현하였다(도 4의 패널 B). 이는 OsASA2 유전자가 버 계놈에 잘 도입되어 후대에 잘 전이되었으며, 유전자의 발현이 잘 되고 있음을 의미한다.

[0069] **실시예 6: 단일카피(Single copy) 도입 형질전환체의 선발**

[0070] 단일 카피가 도입된 형질전환 버의 선발은 TaqMan PCR 법으로 행하였다. TaqMan PCR법에 의한 단일카피(single copy) 도입 형질전환체를 선발하기 위하여 Takara사로부터 제공받은 프로토콜에 따라 OsASA2 유전자 말단에 있는 nos 종결자 영역의 특이적 서열에 결합하는 표지된 프로브 프라이머를 이용하였다. 형질전환체는 bar 및 OsASA2 유전자로 PCR 분석에 의해 확인된 20개 식물체 계놈을 대상으로 계놈내 OsASA2 유전자의 정량을 위한 절대표준농도(absolute standard concentration)을 계산할 수 있었다. 총 20개체의 형질전환 T0 개체 중에서 16개 식물체가 도입유전자가 단일 카피(single copy)로 삽입되어 있었다(도 6).

[0072] **실시예 7: 형질전환체의 아미노산 분석**

[0073] 단일변이(single mutation)을 일으킨 ASA2 유전자 및 이중변이(double mutation)을 일으킨 ASA2 유전자를 도입한 형질전환 후대에서 유리 아미노산 총량은 대조구에 비해 약 10-30 배로 높게 나타났다. 단일 변이(single mutation) 유전자가 이중 변이(double mutation) 보다도 높게 나타났다. 특히 트립토판, 페닐알라닌, 트레오닌, 세린 및 발린 함량에서 대조구에 비해 6.7, 4.6, 3.6, 2.8 및 2.0 배가 높게 나타났다(표 2). 따라서 OsASA2 유전자를 과발현시키면, 트립토판 생합성 회로상에서 피드백 억제(feedback inhibition)가 둔감하게 되어 아미노산 함량이 전체적으로 높아지고, 특정 아미노산이 높은 결과를 초래하였다. 하기 표 2에서 # 데이터는 아미노산 나노몰/g 건조 종자 중량으로 나타내었고, 야생형(동진버), Mock 대조구(Ti-플라스미드 벡터) 또는 5-MT 저항성 형질전환 식물체(단일 점 변이 및 이중 점 변이체)의 6개 종자의 평균±SD이다. 동일한 문자에 의해 표시된 평균 값들은 5% 수준(Student's t test)에서 유의한 차이가 없었다.

표 2

Amino acid	Free amino acid content (nmol g ⁻¹)					
	WT	Mock	S-TG (Mean±SD)		D-TG (Mean±SD)	
	(Mean±SD)	(Mean±SD)	#1	#2	#1	#2
Asp	118±12 a	132±22 a	108±13 a	548±59 b	489±44 b	221±16 a
Thr	89±29 a	142±12 a	321±102 b	472±157 b	187±37 a	211±42 b
Ser	198±45 a	242±32 a	778±301 b	1021±411 b	1521±189 b	388±104 a
Asn	1021±21 a	1918±10 a	3651±199 b	7811±201 b	6689±427 b	4878±521 b
Glu	980±17 a	872±19 a	879±65 a	3521±126 b	6887±145 b	3761±127 b
Pro	103±31 a	99±33 a	211±19 a	338±24 a	259±17 a	174±25 a
Gly	99±5 a	105±51 a	520±201 b	509±115 b	641±213 b	315±110 a
Ala	510±89 a	289±135 a	897±78 b	1041±141 b	948±84 b	610±49 b
Val	89±15 a	69±29 a	99±19 a	214±74 b	340±81 b	94±25 a
Gln	76±19 a	102±26 a	51±10 a	127±18 a	138±12 a	67±15 a
Lys	59±7 a	79±41 a	44±17 a	87±9 a	103±22 a	68±24 a
Met	26±8 a	11±5 a	15±7 a	38±9 a	47±11 a	29±12 a
Ile	38±12 a	21±11 a	37±11 a	128±37 b	98±12 b	77±20 b
Leu	102±47 a	87±23 a	320±44 b	212±35 a	514±118 b	225±71 a
Tyr	278±99 a	349±102 a	208±49 a	351±121 a	408±187 a	287±74 a
Phe	9±5 a	15±8 a	11±5 a	37±9 a	46±12 a	22±9 a
Trp	18±9 a	20±5 a	197±27 b	589±65 b	493±42 b	251±39 b
Arg	114±28 a	129±22 a	152±21 a	207±18 a	308±12 b	216±57 a
His	81±31 a	79±14 a	69±19 a	103±17 a	127±33 a	94±25 a
Total	4008±529 a	4760±231 a	8569±1207 b	17356±1646 b	20244±1698 b	11990±1365 b

[0074]

[0076]

실시예 8: 형질전환체의 농업형질 분석

[0077]

선발된 단일 카피(single copy)를 가지고 호모계통이면서 유전자 사이(intergenic) 형질전환체를 오창 생명공학 연구소 GMO 포장에 계통별로 파종하여 수확하였다(도 7). 형질전환체의 농업 형질조사는 출수 일수, 간장, 수장, 분얼수, 입실율, 입실/식물체, 종자건물중/30식물체, 화분임성, 1000립중 등을 2013년 10월 2일에 수확하여 측정된 결과는 표 3에 나타내었다. 출수 일수는 100일 정도, 간장은 78-81 cm, 수장은 18-20 cm 등 대조품종인 동안벼와 MOCK 등의 결과와 거의 유사한 결과를 얻었다. 이런 의미는 형질전환체가 T2 세대에서 대조구와 거의 유사한 형질을 보여, 유전자 도입에 따른 영향이 크게 없는 것으로 간주된다.

표 3

Line	Days to heading ±SD	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	No. of tillers plant ⁻¹	Spikelet fertility (%) ±SD ^a	No. of spikelets plant ⁻¹	Mean dry matter of harvested seeds (30 plants g ⁻¹) ±SD ^b	Pollen fertility (%) ^c	Brown seed weight (1000 grains g ⁻¹) ^d
WT	100±0.50	78.9 a	18.8 a	15.5 a	82.8±2.99	118.2 a	758.2±21.09	98.1	20.1 b
Mock	100±0.50	76.5 a	17.6 a	13.8 a	78.2±3.62	94.1 b	642.8±27.21	95.2	20.0 b
S-TG #1	100±0.00	79.1 a	19.1 a	15.6 a	81.5±2.35	106.4 a	746.3±18.99	97.3	20.2 b
S-TG #2	101±0.50	80.3 a	19.7 a	12.9 a	88.3±2.11	116.1 a	769.1±24.22	98.2	20.6 a
D-TG #1	101±0.00	81.5 a	20.1 a	12.2 a	91.8±2.92	121.3 a	821.1±28.22	99.3	21.0 a
D-TG #2	100±0.50	80.1 a	19.2 a	13.1 a	89.2±2.01	109.3 a	781.4±22.34	98.6	20.6 a

[0078]

[0079]

a: 임실율(Spikelet fertility)은 2012년에 10개 식물체의 모든 이삭과 2013년에 60개 식물체의 주 줄기의 3개 이삭에 대해서 기록하였다.

[0080]

b: 공기 건조한 수확한 종자의 평균건중량에서 종자는 약 10-15%의 수분함량을 포함한 것으로 추정된다.

[0081]

c: 화분임성(Pollen fertility)은 3개의 무작위로 선별된 각 식물체의 3개의 작은이삭에 대해 기록하였다.

[0082]

d: 1000개 종자의 중량은 20 또는 100 낱알의 것으로부터 측정하였다.

[0084]

실시예 9: ASA 유전자 도입 형질전환체를 이용한 트립토판 생합성계 제어 해석

[0085]

ASA2 변이 유전자의 도입에 의한 유리 Trp 함량이 증가한 벼 호모 계통(T3 세대)을 육성했다. 이 종자의 유리 Trp 함량은 비재조합에 비해 15-33배 증가했고, 벼 종자 단백질인 프로모터에 의한 발현을 제어한 계통에서는 종자의 건물중의 차이는 약 0.4%에 달했다. 고 Trp 함량 종자는 정상적으로 발아, 성장하고 임성을 가지고 있었다. 이들 식물체 중 아미노산 함량이 가장 많이 변한 계통을 이용하여 도 7에 나타난 부분마다 80% 아세톤에서 추출하여, 추출물을 역상계의 고체 카트리지를 사용하여 정제한 뒤 LC/MS/MS분석을 수행하였다(도 8).

[0086]

단일 돌연변이 유전자 도입 형질전환체(S-TG)와 이중 돌연변이 유전자 도입 형질전환체(D-TG)의 Trp, IAN 및 IAA 아미노산 함량을 뿌리, 줄기, 제1잎, 제2잎, 제3잎을 나누어 측정된 결과, Trp의 경우 모든 부위에서 형질전환체가 높게 나타났으며, 특히 leaf 3에서 대조구에 비해 월등히 높게 나타났다. IAN 및 IAA 함량은 거의 유사한 패턴을 보였다. 이들 결과로부터 OASA2 도입 벼는 대조구에 비해 IAA 함량은 식물체의 생장으로 유의로 증가하고 있었다. 흥미롭게도 IAA의 식물 체내에 생합성 분포는 Trp 축적과 같은 경향을 나타내고 있었다. 또한 IAN도 이들 두 성분과 같은 추세로 증가하고 있으며, 축적하고 있는 IAA가 Trp에서 IAN을 거쳐 생합성되고 있는 것으로 나타났다(도 9).

[0087]

OASA2 변이체 유전자가 도입된 형질전환체는 Trp, IAA 함량이 대조구에 비해 높게 나타난 결과로부터 Trp의 축적량은 생화학적인 효소 기능을 반영하고 있음이 명백하며, 효소의 피드백 저해의 강약의 차이를 이용해 세포내에 Trp축적 농도를 어느 정도 제어하는 것이 드러났다. 벼의 Trp 생합성 경로 상류에 위치한 chorismate 경로에 관련된 효소들의 기본 유전자 중에서 특히 대사 제어에 중요하다고 추정된 DAHP 합성 효소 4 종류, chorismate kinase 3종류, EPSP 합성 효소 1 종류에 대해서 단백질 합성을 하고 효소 등 기본 기능 해석을 실시했다. chorismate kinase는 방향족 아미노산 및 관련 화합물의 생합성에 중요하며, 탄닌 등의 이차 대사물의 전구체도 된다. 본 발명의 효소 발현 해석에서 S-GT, GT-ST, ATR1 유전자에서 형질전환체들에서 발현량이 월등히 높게 나타났다. 이런 의미는 식물체내에 트립토판 함량이 높아져 IAA 함량 및 2차 대사산물인 S-GT, GT-ST, ATR1 유전자를 코딩하는 단백질이 높게 발현하고 있다고 할 수 있다(도 10).

[0089]

실시예 10: 5MT에서 형질전환체 선발 가능 시험

[0090] 아미노산 함량을 분석한 결과 5MT-4, 5 계통의 경우 트립토판 함량이 야생형에 비해 각각 22배 및 30배 증가하였는데, 5MT-2의 경우 트립토판의 함량이 야생형과 비교했을 때 크게 차이가 없어서 기존에 선발한 5MT-2, 4, 5 계통의 후대를 증식하여 5MT에 저항성 검정을 다시 실시하였다. 그 결과 도 11에서 보는 바와 같이 5MT-2는 전 세대에서는 저항성을 보였으나, 후대에서는 야생형과 마찬가지로 25 mg/L 5-메틸트립토판이 포함된 배지에서 생육하지 못하는 것으로 나타났다.

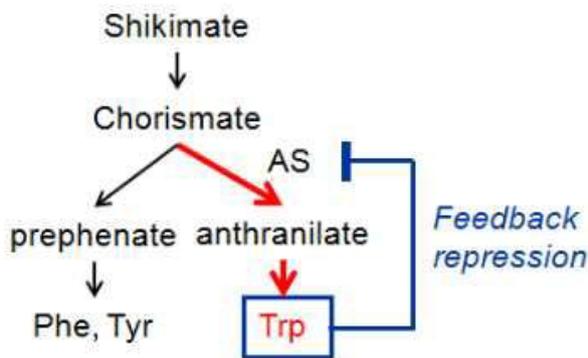
[0092] 실시예 11: 5-메틸트립토판 저항성 돌연변이 ASA2 유전자가 포함된 벡터를 이용한 형질전환 식물체의 선발 시험

[0093] 도 12에는 5MT를 25ppm 함유한 배지에서 야생형 캘러스(callus)와, 상기 실시예 3에서 제조한 벡터(pSP1-5MT 벡터)를 형질전환시킨 캘러스를 각각 배양한 결과를 보여준다. 도 12의 패널 A는 야생형 동진(Dongjin)벼의 캘러스를 5MT 25 ppm을 함유한 배지에 배양한 결과이고, 패널 B는 pSP1-5MT 벡터를 도입시킨 형질전환된 동진 벼 캘러스를 5MT 25 ppm을 함유한 배지에서 배양한 결과이다. 패널 A의 결과와 비교하여 패널 B의 pSP1-5MT 벡터로 형질전환된 캘러스는 OsASA2 변이체 유전자 선별마커를 포함한 pSP1-5MT 벡터가 도입됨에 따라 뿌리의 발생도 가능함을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 OsASA2 변이체 유전자 선별마커를 포함한 pSP1-5MT 벡터는 5MT가 포함된 배지에서 재분화된 개체를 선발하는데 매우 유용함을 확인하였다.

[0095] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

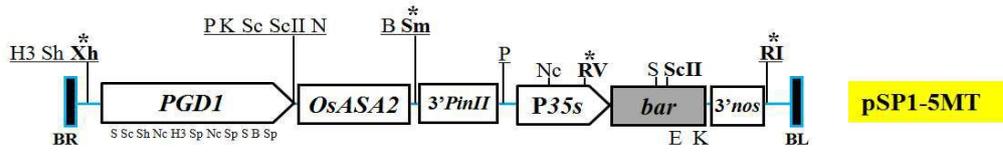
도면1



도면2



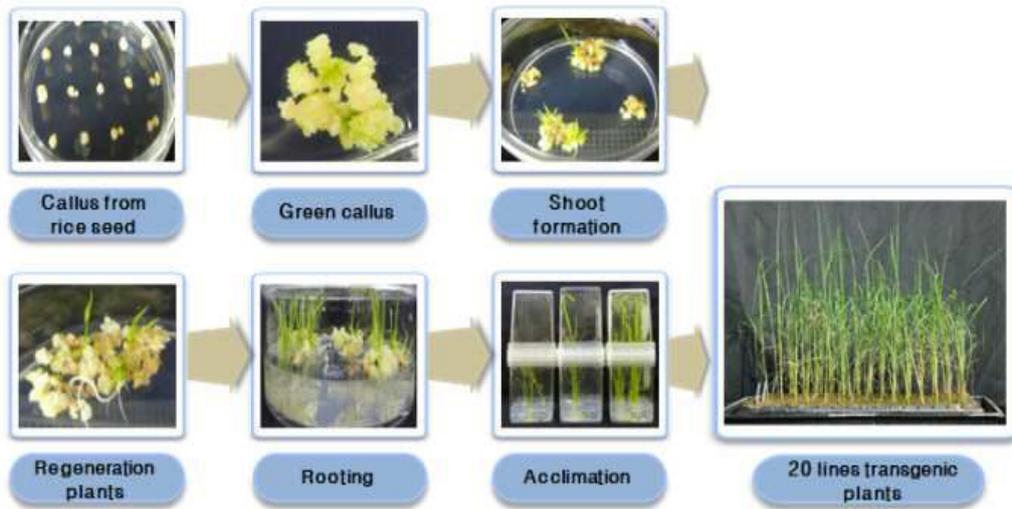
도면3



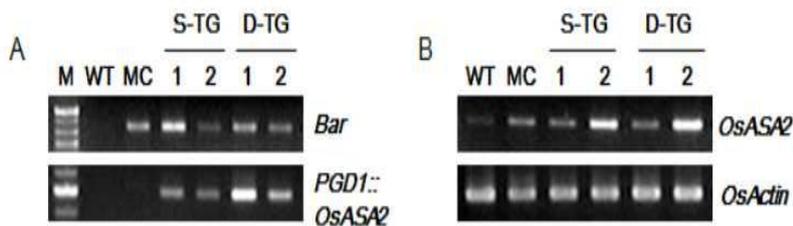
선별마커 유전자가 도입된 재조합 벡터 pSP1-5-MT

PGD1: 향시발현 프로모터
 OsASA2: 선별마커 유전자
 3'PinII: 터미네이터
 P35s: 향시발현 프로모터
 Bar: 도입 유전자
 3'nos: 터미네이터

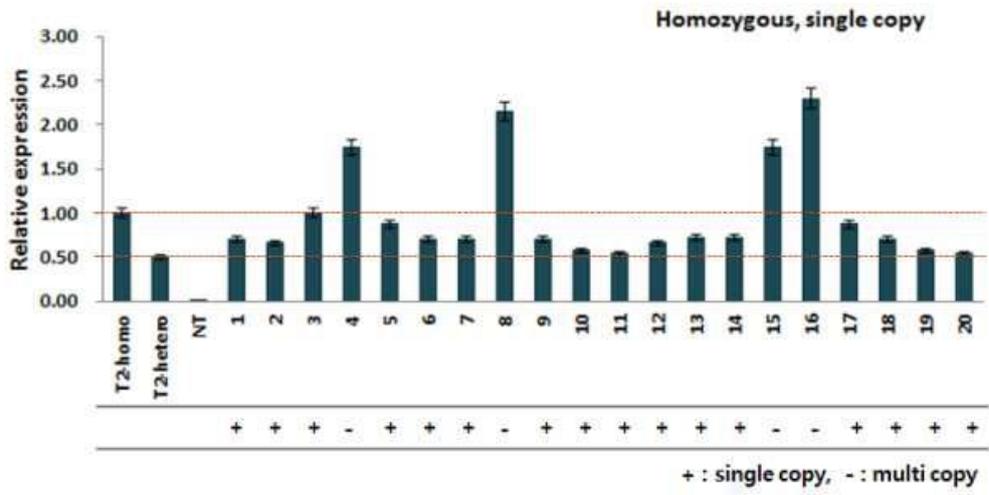
도면4



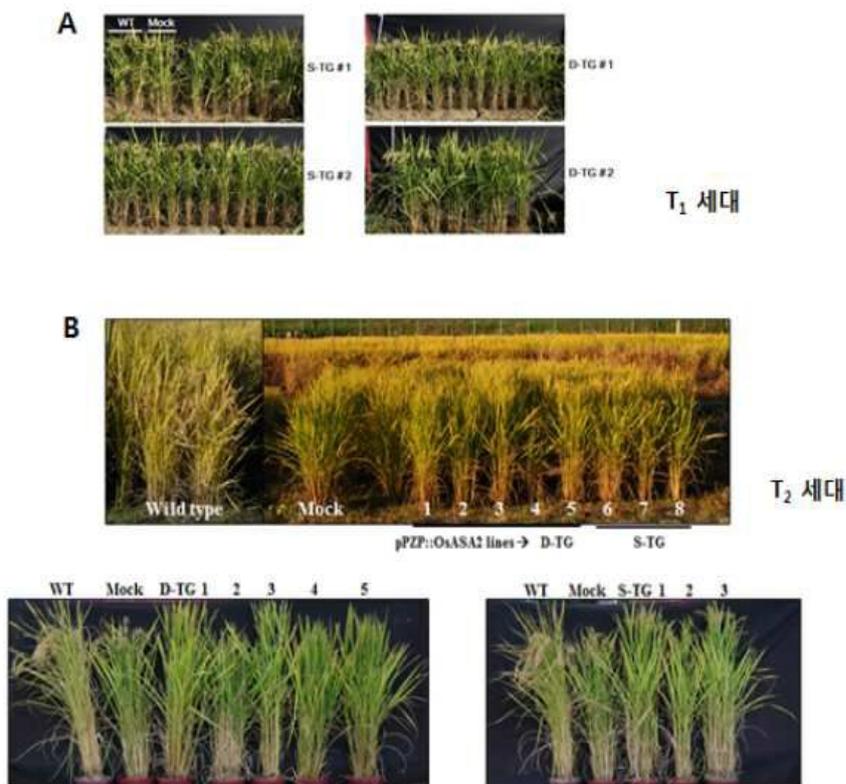
도면5



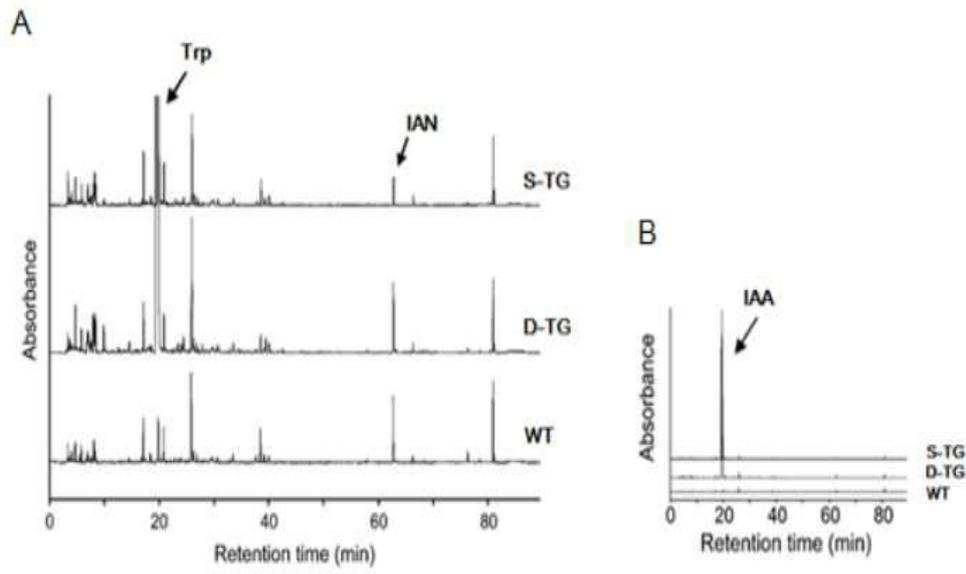
도면6



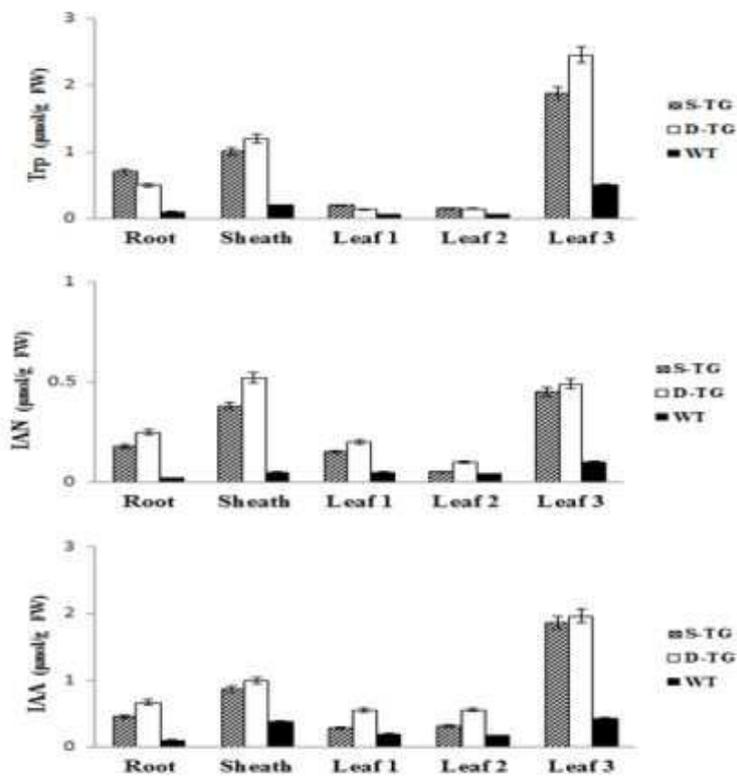
도면7



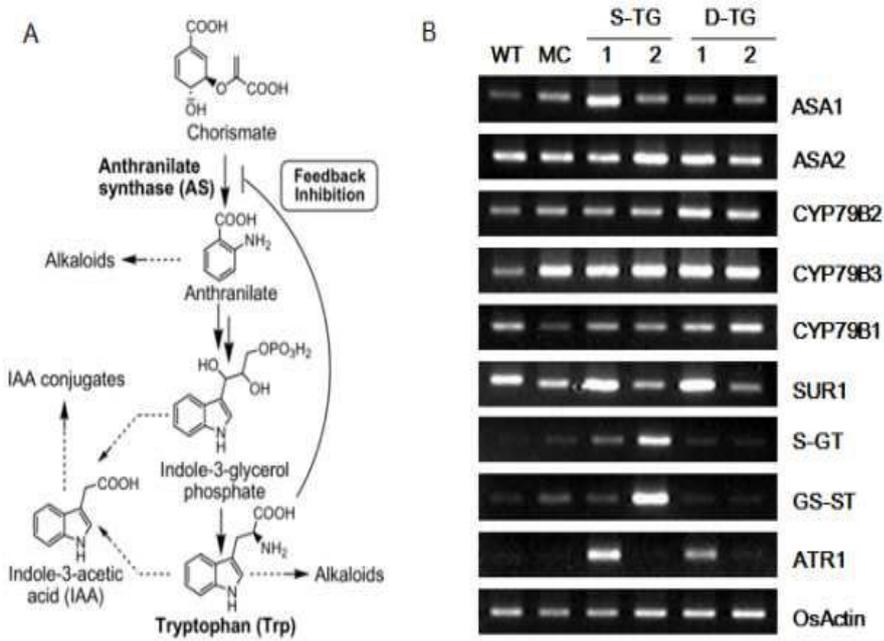
도면8



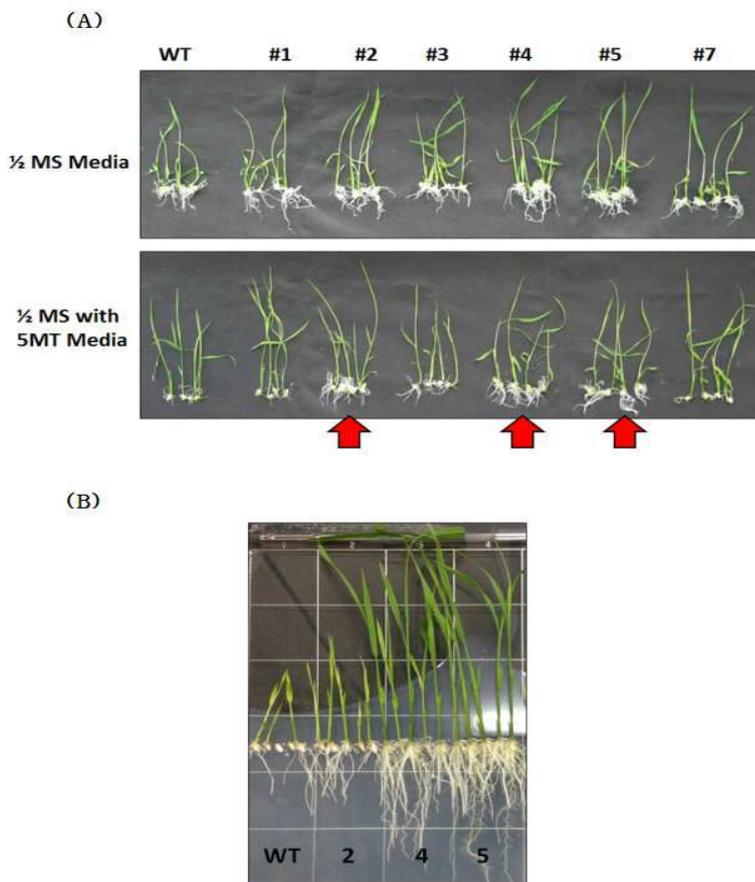
도면9



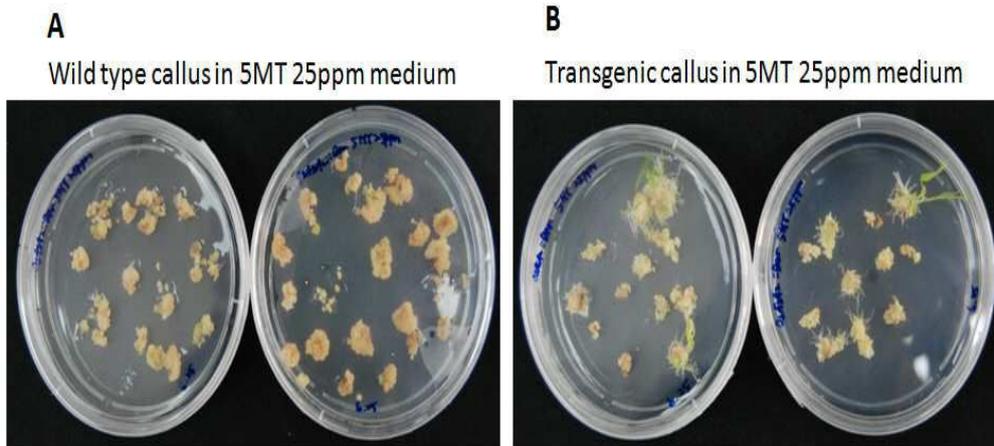
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> Chungbuk National University Industry Academic Cooperation Foundation
- <120> Use of Mutated Anthranilate Synthase Gene for Selection Marker of Plant Transformation
- <130> MP14-0315
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 606
- <212> PRT
- <213> Oryza sativa L.
- <400> 1

Met Glu Ser Ile Ala Ala Ala Thr Phe Thr Pro Ser Arg Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Arg Pro Ala Thr Pro Ala Ala Ala Ala Pro Val Arg Ala Arg Ala
 20 25 30
 Ala Val Ala Ala Gly Gly Arg Arg Arg Thr Ser Arg Arg Gly Gly Val
 35 40 45
 Arg Cys Ser Ala Gly Lys Pro Glu Ala Ser Ala Val Ile Asn Gly Ser
 50 55 60
 Ala Ala Ala Arg Ala Ala Glu Glu Asp Arg Arg Arg Phe Phe Glu Ala
 65 70 75 80
 Ala Glu Arg Gly Ser Gly Lys Gly Asn Leu Val Pro Met Trp Glu Cys

	85	90	95
Ile Val Ser Asp His Leu Thr Pro Val Leu Ala Tyr Arg Cys Leu Val			
	100	105	110
Pro Glu Asp Asn Met Glu Thr Pro Ser Phe Leu Val Glu Ser Val Glu			
	115	120	125
Gln Gly Pro Glu Gly Thr Thr Asn Val Gly Arg Tyr Ser Met Val Gly			
	130	135	140
Ala His Pro Val Met Glu Val Val Ala Lys Glu His Lys Val Thr Ile			
145	150	155	160
Met Asp His Glu Lys Gly Lys Val Thr Glu Gln Val Val Asp Asp Pro			
	165	170	175
Met Gln Ile Pro Arg Ser Met Met Glu Gly Trp His Pro Gln Gln Ile			
	180	185	190
Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Thr Gly Gly Trp Val Gly Phe Phe Ser			
	195	200	205
Tyr Asp Thr Val Arg Tyr Val Glu Lys Lys Lys Leu Pro Phe Ser Gly			
	210	215	220
Ala Pro Gln Asp Asp Arg Asn Leu Pro Asp Val His Leu Gly Leu Tyr			
225	230	235	240
Asp Asp Val Leu Val Phe Asp Asn Val Glu Lys Lys Val Tyr Val Ile			
	245	250	255
His Trp Val Asn Leu Asp Arg His Ala Thr Thr Glu Asp Ala Phe Gln			
	260	265	270
Asp Gly Lys Ser Arg Leu Asn Leu Leu Leu Ser Lys Val His Asn Ser			
	275	280	285
Asn Val Pro Lys Leu Ser Pro Gly Phe Val Lys Leu His Thr Arg Gln			
	290	295	300
Phe Gly Thr Pro Leu Asn Lys Ser Thr Met Thr Ser Asp Glu Tyr Lys			
	305	310	315
Asn Ala Val Met Gln Ala Lys Glu His Ile Met Ala Gly Asp Ile Phe			
	325	330	335

Gln Ile Val Leu Ser Gln Arg Phe Glu Arg Arg Thr Tyr Ala Asn Pro
 340 345 350

Phe Glu Val Tyr Arg Ala Leu Arg Ile Val Asn Pro Ser Pro Tyr Met
 355 360 365

Ala Tyr Val Gln Ala Arg Gly Cys Val Leu Val Ala Ser Ser Pro Glu
 370 375 380

Ile Leu Thr Arg Val Arg Lys Gly Lys Ile Ile Asn Arg Pro Leu Ala
 385 390 395 400

Gly Thr Val Arg Arg Gly Lys Thr Glu Lys Glu Asp Glu Met Gln Glu
 405 410 415

Gln Gln Leu Leu Ser Asp Glu Lys Gln Cys Ala Glu His Ile Met Leu
 420 425 430

Val Asp Leu Gly Arg Asn Asp Val Gly Lys Val Ser Lys Pro Gly Ser
 435 440 445

Val Lys Val Glu Lys Leu Met Asn Ile Glu Arg Tyr Ser His Val Met
 450 455 460

His Ile Ser Ser Thr Val Ser Gly Glu Leu Asp Asp His Leu Gln Ser
 465 470 475 480

Trp Asp Ala Leu Arg Ala Ala Leu Pro Val Gly Thr Val Ser Gly Ala
 485 490 495

Pro Lys Val Lys Ala Met Glu Leu Ile Asp Glu Leu Glu Val Thr Arg
 500 505 510

Arg Gly Pro Tyr Ser Gly Gly Leu Gly Gly Ile Ser Phe Asp Gly Asp
 515 520 525

Met Leu Ile Ala Leu Ala Leu Arg Thr Ile Val Phe Ser Thr Ala Pro
 530 535 540

Ser His Asn Thr Met Tyr Ser Tyr Lys Asp Thr Glu Arg Arg Arg Glu
 545 550 555 560

Trp Val Ala His Leu Gln Ala Gly Ala Gly Ile Val Ala Asp Ser Ser
 565 570 575

Pro Asp Asp Glu Gln Arg Glu Cys Glu Asn Lys Ala Ala Ala Leu Ala
 580 585 590

Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Thr Gly Gly Trp Val Gly Phe Phe Ser
 195 200 205
 Tyr Asp Thr Val Arg Tyr Val Glu Lys Lys Lys Leu Pro Phe Ser Gly
 210 215 220
 Ala Pro Gln Asp Asp Arg Asn Leu Pro Asp Val His Leu Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Asp Asp Val Leu Val Phe Asp Asn Val Glu Lys Lys Val Tyr Val Ile
 245 250 255
 His Trp Val Asn Leu Asp Arg His Ala Thr Thr Glu Asp Ala Phe Gln
 260 265 270

 Asp Gly Lys Ser Arg Leu Asn Leu Leu Leu Ser Lys Val His Asn Ser
 275 280 285
 Asn Val Pro Lys Leu Ser Pro Gly Phe Val Lys Leu His Thr Arg Gln
 290 295 300
 Phe Gly Thr Pro Leu Asn Lys Ser Thr Met Thr Ser Asp Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Asn Ala Val Met Gln Ala Lys Glu His Ile Met Ala Gly Asp Ile Phe
 325 330 335
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Arg Phe Glu Arg Arg Thr Tyr Ala Asn Pro

 340 345 350
 Phe Glu Val Tyr Arg Ala Leu Arg Ile Val Asn Pro Ser Pro Tyr Met
 355 360 365
 Ala Tyr Val Gln Ala Arg Gly Cys Val Leu Val Ala Ser Ser Pro Glu
 370 375 380
 Ile Leu Thr Arg Val Arg Lys Gly Lys Ile Ile Asn Arg Pro Leu Ala
 385 390 395 400
 Gly Thr Val Arg Arg Gly Lys Thr Glu Lys Glu Asp Glu Met Gln Glu
 405 410 415

 Gln Gln Leu Leu Ser Asp Glu Lys Gln Cys Ala Glu His Ile Met Leu
 420 425 430
 Val Asp Leu Gly Arg Asn Asp Val Gly Lys Val Ser Lys Pro Gly Ser

agcttctctg tcgagtcctg cgagcagggg cccgagggca ccaccaacgt cggtcgctat 420
agcatggtgg gagccccacc agtgatggag gtcgtggcaa aggagcacia ggtcacaatc 480

atggaccacg agaagggcaa ggtgacggag caggctgtgg atgatcctat gcagatcccc 540
aggagcatga tggaaggatg gcaccgcgag cagatcgatc agtccccga ttccttcacc 600
ggtggatggg tcgggttctt ttcctatgat acagtcctgt atgttgaaaa gaagaagctg 660
cccttctccg gtgctcccca ggacgatagg aaccttctg atgttcacct tgggctttat 720
gatgatgttc tcgtcttcga caatgtcgag aagaaagtat atgtcatcca ttgggtaaat 780
cttgatcgge atgcaaccac cgaggatgca ttccaagatg gcaagtcccg gctgaacctg 840
ttgctatcta aagtgcacia ttcaaatgia cccaagcttt ctccaggatt tgtaaagtta 900

cacactcgge agtttggtag accttgaac aaatcaacca tgacaagtga tgagtacaag 960
aatgctgtta tgcaggtcaa ggagcatatt atggctggg atattttcca gattgtttta 1020
agccagaggt ttgagaggcg aacatagcc aatccattg aagtctatcg agctttacga 1080
attgtgaacc caagtcata catggcata gtacaggcaa gaggtgtgt cctggtagca 1140
tctagtccag aaattcttac tcgtgtgagg aagggtaaaa ttattaaccg tccacttget 1200
gggactgttc gaaggggcaa gacagagaag gaagatgaaa tgcaagagca acagctacta 1260
agtgatgaaa aacagtgtgc tgaacatatt atgctttag atttgggaag gaatgatgtt 1320

ggaaaggtct ccaaacctgg atctgtgaag gtggagaaat taatgaacat tgaacgtac 1380
tccatgtca tgcacatcag ttccacggtg agtggagagt tggatgatca tctcaaagt 1440
tgggatgccc tgcgagccgc gttgcctgtt ggaacagtta gtggagcacc aaaggtgaaa 1500
gccatggagc tgatagacga gctagaggtc acaagacgag gaccatacag tggcggcctt 1560
ggagggatat catttgacgg agacatgctt atcgtcttg cactccgcac catttgttcc 1620
tcaacagcgc caagccaaa cacgatgtac tcatacaaag acaccgagag gcgccgggag 1680
tgggtcgctc accttcaggc tgggtctggc attgtcgctg atagcagccc agacgacgag 1740

caacgtgaat gcgagaacia ggcagccgct ctggctcgag ccatcgatct tgctgaatca 1800
gctttcgtag acaaggaata g 1821

<210> 4
<211> 1821
<212> DNA
<213> Oryza sativa L.
<400> 4

atggagtcca tcgccgccg cacgttcacg ccctcgccc tcgccgccg ccccgcact 60

ccggcggcgg cggcggcccc ggtagagcg agggcggcgg tagcggcagg agggaggagg 120
 aggacgagta ggcgcgcgcg cgtgaggtgc tccgcgggga agccagagc aagcgcggtg 180
 atcaacggga gcgcggcgcg gcggcgcgcg gaggaggaca ggaggcgctt cttcgaggcg 240

 gcggagcgtg ggagcgggaa gggcaacctg gtgccatgt gggagtgcac cgtctccgac 300
 cacctcacc ccgtgctcgc ctaccgctgc ctgctcccc aggacaacat ggagacgccc 360
 agcttctct tegagttcgt cgagcagggg cccgagggca ccaccaacgt cggtcgctat 420
 agcatggtgg gagccccacc agtgatggag gtcgtggcaa aggagcacia ggtcacaatc 480
 atggaccacg agaagggcaa ggtgacggag caggtcgtgg atgatcctat gcagatcccc 540
 aggagcatga tgaaggatg gcaccgcag cagatcgatc agtccccga ttccttcacc 600
 ggtggatggg tcgggttctt ttcctatgat acagtccgtt atgtgaaaa gaagaagctg 660

 ccttctccg gtgctccca ggacgatagg aaccttctg atgtcacct tgggtttat 720
 gatgatgttc tcgtcttca caatgctgag aagaaagtat atgcatcca tgggtaaat 780
 ctgatcggc atgcaaccac cgaggatgca ttccaagatg gcaagtccc gctgaacctg 840
 ttgctatcta aagtgcacia ttcaaatgta cccaagcttt ctccaggatt tgtaaagtta 900
 cacactcggc agtttggtag accttgaac aatcaacca tgacaagtga tgagtacaag 960
 aatgctgta tgcaggctaa ggagcatatt atggctggtg atatttcca gattgtttta 1020
 agccagaggt ttgagaggcg aacatagcc aatccattg aagtctatcg agctttacga 1080

 atgtgaacc caagtcata catggcata gtacaggcaa gaggtgtgt cctggtagca 1140
 tctagtcag aaattcttac tcgtgtgagg aagggtaaaa ttattaaccg tccacttget 1200
 gggactgttc gaaggggcaa gacagagaag gaagatgaaa tgcaagagca acagctacta 1260
 agtgatgaaa aacagtgtgc tgaacatatt atgctttag atttgggaag gaatgatgtt 1320
 ggaaaggctt ccaaacctgg atctgtgaag gtggagaaat taatgaacat tgaacgtac 1380
 tcccatgtca tgcacatcag ttccacggtg agtggagagt tggatgatca tctcaaagt 1440
 tgggatgccc tgcgagccc gttgctgtt ggaacagtta gtggagcacc aaagtgaaa 1500

 gccatggagc tgatagacga gctagaggtc acaagacgag gaccatacag tggcgccctt 1560
 ggagggatat catttgacgg agacatggac atcgctcttg cactccgac cattgtgttc 1620
 tcaacagcgc caagccaaa cacgatgtac tcatacaaag acaccgagag gcgcggggag 1680
 tgggtcgctc accttcaggc tgggtctggc attgtcgtg atagcagccc agacgacgag 1740
 caacgtgaat gcgagaacia ggcagccgct ctggctcgag ccatcgatct tgetgaatca 1800
 gctttcgtag acaaggaata g 1821

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 5

atggagtcca tcgccgccgc ca 22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 6

agctttcgta gacaaggaat ag 22