



등록특허 10-2860995



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년09월17일

(11) 등록번호 10-2860995

(24) 등록일자 2025년09월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)

A01H 1/06 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8273 (2013.01)

A01H 1/06 (2021.01)

(21) 출원번호 10-2024-0118309

(22) 출원일자 2024년09월02일

심사청구일자 2024년09월02일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100124385 A*

Chi 등, Plant Physiology, Vol. 148, No. 2, 페이지 808-817 (2008.08.22.)*

Park 등, Antioxidants, Vol. 8, No. 12, 페이지 1-12 (2019.11.29.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

국립생태원

충청남도 서천군 마서면 금강로 1210 ()

(72) 발명자

이중로

전북특별자치도 군산시 궁포2로 77 더샵디오션시
티그랑시엘2차 505동 1402호

정영준

전북특별자치도 군산시 수송동로 100 세영리첼아
파트 112동 301호

(74) 대리인

특허법인로드

전체 청구항 수 : 총 3 항

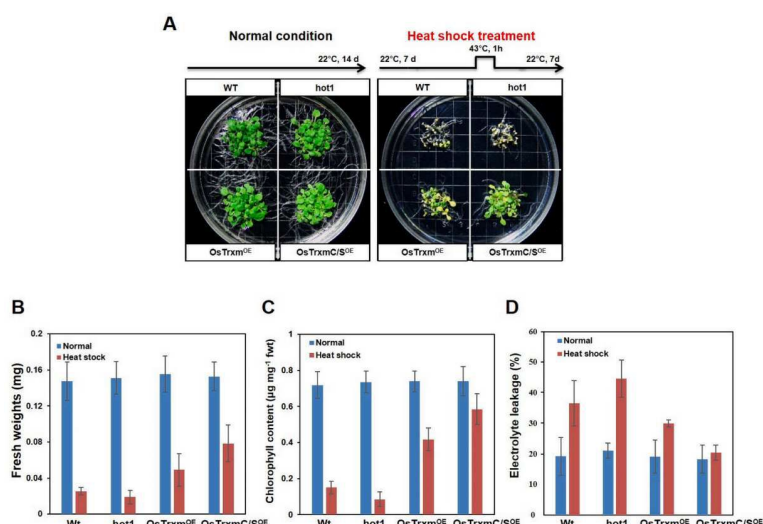
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 **OsTrxm 단백질 과발현을 통한 식물의 온도 스트레스 저항성 증대 방법 및 이의 방법으로 제조된 온도 스트레스 저항성 형질전환 식물체**

(57) 요약

본 발명은 OsTrxm 단백질 과발현을 통한 식물의 온도 스트레스 저항성 증대 방법 및 이의 방법으로 제조된 온도 스트레스 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 본 발명의 OsTrxm과 두 개의 보존된 활성 시스테인 돌연변이체(OsTrxm C95S/C98S, OsTrxmC/S라고 함) 단백질을 식물체에서 OsTrxm의 활성 시스테인의 생체 내 역할을 특성화하기 위해 과발현시켜 보았고, 이때, OsTrxm 과발현 식물체는 고온으로 인한 열 충격 스트레스에 뛰어난 내성이 있음을 확인하였다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A01H 1/1225 (2021.01)

C07K 14/415 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	202307
과제번호	NIE-A-2023-07
부처명	환경부
과제관리(전문)기관명	국립생태원
연구사업명	LMO 안전관리
연구과제명	2023년 LMO 자연환경 모니터링 및 사후관리 연구
과제수행기관명	국립생태원
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

식물체 내에서 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 OsTrxmC/S 단백질을 과발현시키는 단계를 포함하는 식물의 고온으로 인한 열 충격 스트레스 저항성 증대 방법.

청구항 2

식물체 내에서 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 OsTrxmC/S 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드를 유효 성분으로 포함하는 고온으로 인한 열 충격 스트레스 저항성이 증대된 식물체를 제조하기 위한 벡터.

청구항 3

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 OsTrxmC/S 단백질이 도입된 고온으로 인한 열 충격 스트레스 저항성이 증대된 식물체.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 OsTrxm 단백질 과발현을 통한 식물의 온도 스트레스 저항성 증대 방법 및 이의 방법으로 제조된 온도 스트레스 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Trx(thioredoxins) 단백질은 리보뉴클레오타이드 환원효소(ribonucleotide reductase) 활성화, 전사 인자 조절, 반응성 산소종(ROS, reactive oxygen species) 소거, 다양한 종양 촉진, 식물 세포의 광합성 활동을 포함한 수많은 편재 세포 과정에서 작은 이황화물 환원효소로 기능한다(Holmgren, 1989; Balmer 등, 2003; Ravi 등, 2005).

[0003] Trx 단백질은 시퀀싱된 애기장대(Arabidopsis thaliana) 게놈(Arabidopsis Genome, 2000)에서 Trx-f, -h, -m, -o, -x, -y를 포함하여 최소 6개의 주요 Trx 그룹이 확인되었다. Trx-f, -m, -x, -y 단백질은 엽록체에 위치하며 광합성에 관여하는 효소의 산화환원 상태를 조절하는 것으로 알려져 있다(Wolosiuk 등, 1993). Trx-o 단백질은 미토콘드리아에 분포한다(Laloi 등, 2001). Trx-h 단백질은 세포질과 미토콘드리아, 핵, 세포질 막과 같은 다른 식물 기관에 국한되어 있다(Marcus 등, 1991; Ishiwatari 등, 1995; Gelhaye 등, 2004; Meng 등, 2010; Serrato and Cejudo, 2003).

[0004] 세포질과 미토콘드리아 Trx는 특정 NADPH/티오레독신 환원효소(NTR)에 의해 환원되는 반면, 엽록체 Trx는 광합성 전자 전달 사슬에서 제공된 전자를 가진 페레독신/티오레독신 환원효소(FTR)에 의해 환원된다(Lemaire 등, 2007; Schurmann 등, 2008). 광합성 및 이영양 조직 모두에 존재하는 일부 플라스티드 Trx는 애기장대(Arabidopsis thaliana)(Collin 등, 2004) 및 완두콩(de Dios Barajas-Lopez 등, 2007; Traverso 등, 2008)에 서도 보고되었다. 그러나 플라스티드 Trxs는 다른 동형체 Trx와 유사한 환원효소로 기능하고 구조적으로 유사한 형태를 가지고 있지만 플라스티드 Trx의 분자 생물학적 기능에 대한 연구는 수행되지 않았다(Chi 등, 2008). 이러한 이유로, 광합성 효소 조절에 대한 고전적 기능 연구보다는 비생물적 및 생물학적 스트레스에서 플라스티드

Trx의 새로운 분자 생물학적 기능을 연구하는 것이 필수적이다. 식물에서 애기장대 Trx의 h3-이형체(AtTrx-h3)와 Trx 유사 단백질(AtTDX)의 분자 샤페론 기능이 최근에 다루어졌다(Park 등, 2009; Lee 등, 2009). Trx 폴드를 보유한 단백질인 2-Cys 퍼옥시레독신(2-Cys Prx)은 분자 샤페론으로 기능하는 것으로 나타났다(Jang 등, 2004).

[0005] 이때 식물 Trx가 단백질 폴딩 및 유지의 촉진제 및 조절제로 기능할 수 있을 것으로 예상할 수 있다. 벼의 단백질 m형 티오레독신(OsTrxm)은 OsTrxm 돌연변이 식물에서 엽록체 발달 및 성장 억제에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Chi 등, 2008). 그러나 열 스트레스 조건에서 OsTrxm의 생화학적 메커니즘과 분자 기능에 대한 정보는 발표되지 않았다.

[0006] 따라서, 본 발명의 OsTrxm과 두 개의 보존된 활성 시스테인 돌연변이체(OsTrxm C95S/C98S, OsTrxmC/S라고 함) 단백질은 애기장대(Arabidopsis thaliana)에서 OsTrxm의 활성 시스테인의 생체 내 역할을 특성화하기 위해 과발현시켜 보았고, 이때, OsTrxm 과발현 변종 식물은 열 충격(열 스트레스) 처리에 내성이 있음을 확인하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-1857452
(특허문헌 0002) KR 10-1752654

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기 문제점을 해결하기 본 발명의 일 과제는 OsTrxm 또는 OsTrxmC/S 단백질 과발현을 통한 식물의 온도 스트레스 저항성 증대 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 또한, 상기 문제점을 해결하기 본 발명의 일 과제는 식물체 내에서 OsTrxm 또는 OsTrxmC/S 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 온도 스트레스 저항성이 증대된 식물체를 제조하기 위한 벡터를 제공하는 데 있다.

[0010] 마지막으로, 상기 문제점을 해결하기 본 발명의 일 과제는 OsTrxm 또는 OsTrxmC/S 단백질이 도입된 온도 스트레스 저항성이 증대된 식물체를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 식물체 내에서 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 OsTrxm 단백질 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 OsTrxmC/S 단백질을 과발현시키는 단계를 포함하는 식물의 온도 스트레스 저항성 증대 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 "온도 스트레스"는 고온으로 인한 열 충격 스트레스인 것일 수 있다.

[0013] 또한, 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 식물체 내에서 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 OsTrxm 단백질 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 OsTrxmC/S 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 온도 스트레스 저항성이 증대된 식물체를 제조하기 위한 벡터를 제공한다.

[0014] 또한, 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 OsTrxm 단백질 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 OsTrxmC/S 단백질이 도입된 온도 스트레스 저항성이 증대된 식물체를 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 OsTrxm 단백질 과발현을 통한 식물의 온도 스트레스 저항성 증대 방법 및 이의 방법으로 제조된 온도 스트레스 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 본 발명의 OsTrxm과 두 개의 보존된 활성 시스테인 돌연변이체(OsTrxm C95S/C98S, OsTrxmC/S라고 함) 단백질을 식물체에서 OsTrxm의 활성 시스테인의 생체 내 역할을 특성화하기 위해 과발현시켜 보았고, 이때, OsTrxm 과발현 식물체는 고온으로 인한 열 충격 스트

레스에 뛰어난 내성이 있음을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 OsTrxm 또는 OsTrxmC/S 단백질을 형질전환시킨 식물체에서 강하게 과발현됨을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 야생형(WT), OsTrxm 및 OsTrxmC/S 과발현 애기장대 식물체의 단백질 구조를 비교한 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 야생형(WT), OsTrxm 및 OsTrxmC/S 과발현 애기장대 식물체의 열 충격 저항성을 비교한 도이다((A) 7일 된 애기장대 묘목을 43 °C에서 1시간 동안 열 충격을 가한 다음 22 °C의 최적 성장 조건으로 옮겼다. 식물의 열 충격 내성은 7일 회복 기간(hot1 녹아웃 식물로 음성 대조군 사용) 후 최적 조건에서 검사하였다. 7일 된 애기장대 묘목을 대조군으로 22°C에서 7일 동안 재배하였다. (B) 지정된 식물의 생체 중량을 나타낸 것이고, (C) 엽록소 함량 및 (D) 전해질 누출(전체 전해질 누출의 %)을 측정결과를 나타낸 것이다. WT 및 hot1, OsTrxmOE 및 OsTrxmC/SOE의 전해질 누출은 탈이온수에서 재수화한 후 비교하였다. 모든 값은 최소 3개의 독립적인 실험에 대한 평균 $\pm$ SD이다).

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 시험관 내 OsTrxm의 구조를 분석한 도이다((A) 재조합 OsTrxm은 12% 환원 SDS-PAGE로 은 염색하여 분석하였다. (B) 인슐린(30 μ M) 이황화물 결합의 환원은 1 μ M(■), 3 μ M(▲), 5 μ M(●) OsTrxm의 농도에서 0.5 mM DTT의 존재 하에 분석하였다. (C) (A)와 같이 OsTrxm의 구조 분석은 SEC를 사용하여 분석하였다. (D) SEC(C)의 각 분획은 10% 네이티브 PAGE(상단 섹션) 및 12% SDS-PAGE(하단 섹션) 젤에서 분리한 후 은 염색을 거쳤다.).

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsTrxm의 분자 샤페론 활성을 나타낸 도이다(20 μ g MDH의 열 응집은 OsTrxm이 존재하는 상태에서 45 °C에서 20분 동안 조사되었다. OsTrxm 대 MDH의 몰 비율은 5:1(▲), 10:1(●), 30:1(□)이었다. 분자 샤페론 활동은 음성 대조군으로 GST(■)를 사용하여 측정하였다.).

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsTrxm의 구조 의존적 분자 샤페론 기능을 나타낸 도이다((A) 인슐린(30 μ M) 이황화물 결합의 감소는 5 μ M 농도의 OsTrxm FI(●) 및 OsTrxm FII(○)에서 0.5 mM DTT의 존재 하에 검정되었다. (B) 두 SEC 분획(도 4C의 FI 및 FII)과 총 단백질의 일정량에서 OsTrxm 수준을 동일하게 한 후, 이황화물 환원 활성(흰색 막대)과 분자 샤페론 활성(검은색 막대)을 측정하였다. 상대 활성 계산을 위해 총 단백질의 활성을 1로 설정하고 각 단백질의 활성을 비율(배수)로 표현하였다. (C) FI와 FII 분획 간의 소수성 비교. Bis-ANS(10 μ M)를 SEC로 분리한 OsTrxm(10 μ M) 단백질(예: Total, FI, FII 및 단백질 없음(Con))과 함께 25 °C에서 30분 동안 배양하였다. bis-ANS의 형광 강도는 여기 파장 390nm와 방출 파장 400~600nm를 사용하여 측정하였다. 결과는 최소 3회 독립 실험에 대한 평균 $\pm$ SD이다.).

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 열 충격과 OsTrxm Cys 잔류물이 기능에 미치는 영향을 나타낸 도이다((A) SEC에 의한 OsTrxm과 OsTrxmC/S의 구조 비교. OsTrxm과 OsTrxmC/S의 구조에 대한 개략적 표현. (B) OsTrxm과 OsTrxmC/S의 소수성 분석은 bis-ANS 결합에 의해 수행되었다. (C) OsTrxm과 OsTrxmC/S의 이황화물 환원 활성(흰색 막대)과 분자 샤페론 활성(검은색 막대)을 측정하였다. 결과는 최소 3개의 독립적인 실험에 대한 평균 $\pm$ SD이다. 상대적 활성 계산을 위해 총 단백질의 활성을 1로 설정하고 각 단백질의 활성을 비율(폴드)로 표현하였다.).

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 구조에 대한 열 충격과 OsTrxm Cys 잔류물의 효과를 나타낸 도이다((A-F) 고 분자량(A 및 D, 2,000kDa 분획), 중 분자량(B 및 E, 232-669kDa) 및 저 분자량(C 및 F, 43kDa) 분획에서 추출한 분획 단백질 OsTrxm 및 OsTrxmC/S의 음성 염색된 필드. 검은색과 흰색 화살표는 필드(A 및 D)에서 고 분자량 올리고머 복합체를 나타낸다. 검은색과 흰색 화살표는 저 분자량 분획(C 및 F)의 필드에서 발견된 개별 분자를 가리킨다. 필드의 스케일 막대는 500nm에서 필드(A 및 D), 100nm에서 필드(B 및 E), 50nm에서 필드(C 및 F)를 나타낸다.).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본

발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0018] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0019] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0021] 유비쿼터스(Ubiquitous) 이황화물 환원효소인 티오레독신(Trxs, thioredoxins)은 모든 생물체의 산화환원 균형에서 기능한다. 엽록체 발달에서 벼(*Oryza sativa*) Trx m형 동형체(OsTrxm, Trx m-type isoform)의 역할은 이미 발표되었지만 OsTrxm의 생화학적 및 분자적 기능은 수십 년 동안 밝혀지지 않았다. OsTrxm과 두 개의 보존된 활성 시스테인 돌연변이체(OsTrxm C95S/C98S, OsTrxmC/S라고 함) 단백질은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 OsTrxm의 활성 시스테인의 생체 내 역할을 특성화하기 위해 과발현되었다. 이때, OsTrxm 과발현 변종 식물은 열 충격(열 스트레스) 처리에 내성이 있음을 확인하였다. 특히, 분자량이 더 높은(HMW) 복합체를 가진 OsTrxmC/S는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 분자량이 더 낮은(LMW) 구조를 가진 OsTrxm보다 더 높은 내열성을 보였다. 열 스트레스 하에서 구조적 변화에 대한 활성 시스테인의 중요성을 확인하기 위해 OsTrxm과 OsTrxmC/S 단백질을 박테리아에서 발현시키고 분리하였다. 본 발명에서 두 단백질은 LMW에서 HMW 복합체에 이르기까지 다양한 구조를 가지고 있으며, 디설파이드(disulfide) 환원효소와 분자 샤페론(molecular chaperone)으로서 잠재적인 기능을 가지고 있다는 것을 발견했는데, 이는 지금까지 보고된 적이 없다. 분자 샤페론의 기능은 HMW 복합체에서 우세한 반면, 디설파이드 환원효소 기능은 LMW 형태에서 관찰되었다. 이러한 결과는 OsTrxm의 활성 시스테인이 식물의 단백질 구조적 변화와 내열성에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사하는 것이다.

[0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0025] <실험방법>

[0026] 1. 실험재료 및 생육조건

[0027] 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물(ecotype Columbia)은 22℃, 습도 70%에서 16/8시간 명암 주기로 재배되었다. OsTrxm 및 OsTrxmC/S의 과발현 형질전환 식물체를 구축하기 위해 해당 유전자의 cDNA를 CaMV35S 프로모터(Hellens 등, 2000)의 제어 하에 C-말단 영역에 3xHA 태그가 있는 이진 벡터 pCambia1300에 삽입하였다. OsTrxm 및 OsTrxmC/S 과발현 라인은 항-HA 항체(Abcam Cambridge, UK)를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 분석하였다. 이때 OsTrxm 및 OsTrxmC/S에 대한 아미노산 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

서열번호	명칭	서열
1	OsTrxm	MALETCTFRAWTLHAPQPSSGGSRDRLLLSGAGSSQSKPRLSVASPSPLRPASRFA CQCSNVVDEVVVADEKNWDSMVLGSEAPVLVEFWAPWCGPCR
2	OsTrxmC/S	MALETCTFRAWTLHAPQPSSGGSRDRLLLSGAGSSQSKPRLSVASPSPLRPASRFA CQCSNVVDEVVVADEKNWDSMVLGSEAPVLVEFWAPWWSGSPSR

[0031] 2. OsTrxm 변이체의 클로닝 및 *Escherichia coli*에서의 발현

[0032] 재조합 OsTrxm 및 OsTrxmC/S 단백질은 *E. coli*에서 발현되었다. 95 및 98의 시스테인(Cysteine, Cys, C)이 세린(Serine, Ser, S) 잔류물(C95S/C98S)로 대체된 OsTrxm의 시스테인 돌연변이(OsTrxmC/S)는 표준 PCR 매개 부위 지향 돌연변이에 의해 생성되었다. Cys를 Ser로 변환하는 단일 염기 불일치를 포함하는 상보적 프라이머를 사용하였다. 최종 돌연변이 유전자는 pGEX 벡터에 연결되었고(Jang 등, 2004; Yang 등, 2002), BL21(DE3) 세포

의 형질전환체는 LB 배지에서 37℃에서 배양되었으며, 변형 단백질은 0.4 mM 이소프로필-β-D-티오갈락토-피라노사이드(IPTG, isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside)를 첨가하여 유도되었다. 분리된 재조합 OsTrxm 및 OsTrxmC/S는 Superdex 200 HR 10/30 컬럼을 사용하여 FPLC로 추가로 정제되었다. OsTrxm 및 OsTrxmC/S의 순도는 SDS-PAGE를 사용하여 결정하였다.

[0034] **3. 이황화물 환원효소 및 분자 샤페론 분석법의 결정**

[0035] 이황화물 환원효소 활동은 A650nm에서 흡광도 변화를 통해 인슐린과 DTT를 사용하여 측정하였다(Dyson 등, 1997). 분자 샤페론 활동은 모델 기질 말산 탈수소효소(malate dehydrogenase, MDH)를 사용하여 결정하였다. MDH는 다양한 농도의 OsTrxm과 함께 45℃에서 50 mM Hepes-KOH(pH 8.0) 완충액에서 배양하였다. 20분 배양하는 동안 MDH의 열 응집은 온도 제어 분광 광도계(DU800; Beckman)에서 A340에서 탁도 증가를 모니터링하여 결정하였다(Lee 등, 2009; Jang 등, 2004). MDH와 인슐린은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0037] **4. bis-ANS 형광 측정을 이용한 소수성 분석**

[0038] OsTrxm의 노출된 소수성 영역은 SFM 25 분광형광계(Kontrom, 취리히, 스위스)를 사용하여 각 분획에 대한 bis-ANS[1,1-bi(4-anilinoanthracene-5-sulfonic acid)]의 결합을 측정하여 조사하였다(Jung 등, 2013). bis-ANS 형광의 여기 파장은 380nm로 설정되었고, 방출 스펙트럼은 400~650nm 사이에서 스캔되었다. 50mM Hepes(pH 8.0)에 각 분획 10 μM을 함유한 반응 혼합물을 25℃에서 30분 동안 10 μM bis-ANS와 함께 배양하였다. Bis-ANS는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0040] **5. 크기 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography, SEC)**

[0041] FPLC(AKTA; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에 의한 SEC는 50 mM Hepes-KOH(pH 8.0) 완충액으로 25℃에서 0.5 ml/min의 유속으로 평형화된 Superdex 200 HR 10/30 컬럼을 사용하여 수행하였다. 단백질 피크(A280)에 해당하는 분획을 분리하고, Centricon YM-30 필터(Millipore Co., Santa Clara, USA)를 사용하여 4℃에서 농축하였다(Park 등, 2009; Jung 등, 2013).

[0043] **6. 투과 전자 현미경(Transmission electron microscopy, TEM)**

[0044] 음성 염색을 위해 분획된 단백질을 50 mM Hepes(pH 8.0)로 10~50배 희석하였다. 희석 후 최종 혼합물 5 μl를 즉시(~5초) 글로우 방전된 탄소 코팅 그리드(Harrick Plasma, Ithaca, NY)에 3분간 공기 중에서 적용하였다. 그런 다음 그리드를 1.0% 우라닐 아세테이트(Sakai 등, 2015)를 사용하여 음성 염색하였다. 이러한 그리드는 100 kV에서 작동하는 Technai 10 투과 전자 현미경(FEI, 미국)에서 검사하였다. 이미지는 2Kx2K, Ultrascan 1000 CCD 카메라(Gatan, 미국)에서 배율 30,000(0.32nm/픽셀)으로 녹화하였다.

[0046] **7. 열충격 처리 및 엽록소 함량의 전해질 누출 측정**

[0047] 애기장대 묘목은 페트리 접시에 3.0%의 수크로스(sucrose)를 함유한 MS 배지에서 배양하였다. 7일 된 애기장대 묘목이 담긴 플레이트를 43℃의 수조에 1시간 동안 두어 열 충격을 가하였다. 8%(v/v) 아세톤을 사용하여 추출한 엽록소 함량은 전도도 측정기(Orion star A212 Thermo Fisher)로 측정하였다(Park 등, 2009; Jung 등, 2015). 이온 전도도를 측정하기 위해 9개의 잎 디스크(직경 10mm)를 25ml의 탈이온수가 담긴 시험관에 넣고 열 충격을 처리한 후 밤새도록 흔들었다. 고압 살균 후 잎이 담긴 튜브를 실온으로 식힌 다음 전도도를 다시 측정하였다. 전해액 누출은 고압 살균 전후 전도도의 백분율로 계산하였다. 이 분석은 최소 3회 수행했으며 각각 3회 반복하였다.

[0049] **<실험결과>**

[0050] **1. OsTrxm의 활성 시스테인 잔류물의 열충격 내성에 대한 중요한 역할**

[0051] 엽록체는 광합성을 통해 산소와 에너지를 생산하여 식물의 성장과 수확에 필수적인 역할을 한다(Serrano 등, 2016; Mamaeva 등, 2020; Watson 등, 2018; Bose 등, 2017). 엽록체는 비생물적 및 생물학적 스트레스 조건에 대한 식물 반응의 중요한 조절자이다(Chan 등, 2016; Crawford 등, 2018). 엽록체 발달의 억제제는 비정상적인 엽록체 구조, 엽록소 및 카로티노이드 감소 등으로 인해 발생한다. 이러한 요인은 특정 유전자의 결함과 환경 스트레스로 인해 발생한다(Zhang 등, 2020; Littlejohn 등, 2021). OsTrxm의 기능적 특성은 엽록체 발달, 성장 억제, 2-Cys Prx의 산화환원 조절 불활성화와 같은 표현형에서 발견되었다(Chi 등, 2008). Ostrxm RNA 간섭(RNAi) 벼 식물은 엷은 녹색 잎, 비정상적인 엽록체 구조, 엽록소와 카로티노이드 감소로 인한 광합성 효율 감소를 보였으며, 이는 벼 성장 결함을 초래하였다(Chi 등, 2008). 이러한 결과는 OsTrxm 단백질이 엽록체 생합성

경로에 관여할 가능성을 제기한다. 그러나 벼 엽록체에서 Trx 단백질의 생화학적 기능은 아직 광범위하게 연구되지 않았다. OsTrxm과 활성 시스테인 돌연변이 OsTrxmC/S 간의 기능적 차이점을 특성화하기 위해 우리는 애기장대 식물에서 상기 2가지 유전자를 과발현시켰다. 4주 된 애기장대 묘목을 사용하여, 우리는 항-HA 태그 항체를 사용한 웨스턴 블롯을 통해 야생형(WT)과 OsTrxm 또는 OsTrxmC/S 단백질의 발현 수준을 분석하였다. 야생형 식물과 비교했을 때, 형질전환 식물은 OsTrxm 또는 OsTrxmC/S 단백질을 강하게 과발현함을 확인하였다(도 1). OsTrxmC/S를 과발현하는 형질전환 식물체(OsTrxmC/SOE)의 생체 내 단백질 구조의 올리고머 복합체는 네이티브 PAGE(도 2)로 추정된 정상 조건에서도 OsTrxm을 과발현하는 형질전환 식물체(OsTrxmOE) 보다 상당히 높았다.

[0052] OsTrxmOE와 OsTrxmC/SOE 식물체의 내열성을 조사하기 위해, 애기장대 묘목을 MS 배지 플레이트에서 22℃에서 7일간 배양하고, 43℃에서 1시간 동안 배양한 후, 22℃에서 7일간 회복되도록 두었다(도 3A). WT와 hot1(heat shock protein 101, 열충격 단백질 101) 돌연변이 식물은 열에 민감한 표현형을 보인 반면, OsTrxmOE 또는 OsTrxmC/SOE 식물체는 녹색 색소를 가지는 것으로 보아 비교적 더 높은 내열성을 보였다. 특히, OsTrxmC/SOE는 OsTrxmOE보다 훨씬 더 나은 내열성을 보였다. OsTrxmOE에 비해 OsTrxmC/SOE의 더 높은 내열성은 단백질의 구조적 특성에 기인할 수 있다는 것이 확인되었다(도 2).

[0053] 다음으로, 본 발명에서는 OsTrxmOE와 OsTrxmC/SOE의 구조적 변화에 따른 내열성을 명확히 확인하기 위해 신선한 무게, 엽록소 함량, 전해질 누출을 측정하였다. 신선한 무게, 엽록소 함량, 전해질 누출에 대한 결과는 OsTrxmOE와 OsTrxmC/SOE 식물체가 WT와 hot1 돌연변이 식물에는 존재하지 않는 내열성 표현형을 가지고 있음을 확인하였다(도 3B-D). 흥미롭게도, OsTrxmC/SOE 식물은 OsTrxmOE 식물보다 더 중요한 생존 특성으로 열 충격 내성을 보였다. 이러한 결과는 식물체에서 OsTrxm이 식물을 외부 열 스트레스로부터 보호하는 데 중요한 역할을 하며 OsTrxm의 활성 시스테인 잔류물이 구조적 변화와 열 충격 저항성에 필수적임을 시사하는 것이다.

[0054] 그러나 열 스트레스 조건에서 OsTrxm의 분자적 메커니즘과 기능적 특성은 아직 불분명하다. 따라서 OsTrxm의 구조와 기능에서 활성 시스테인 잔류물이 차지하는 중요한 역할에 대한 추가 연구가 이루어졌다.

[0056] 2. OsTrxm 구조와 그 기능

[0057] 구조적 변화는 분자 샤페론으로 기능하고 세포를 열 충격 스트레스로부터 보호하는 많은 종류의 소형 열충격 단백질(sHSP, small heat shock proteins)에서 보고되었다(Jung 등, 2015; Hendrick 및 Hartl, 1993; Haley 등, 1998; Haslbeck 등, 2005). 구조적 재배열은 소수성의 변화에 의해 유도된다(Lee 등, 2009). 특히 AtTrx-h3, AtTDX, 2-Cys Prx와 같은 산화환원 단백질은 분자량이 다른 구조의 구조적 변화와 밀접한 관련이 있다(Park 등, 2009; Lee 등, 2009; Jang 등, 2004). 따라서 본 발명에서는 OsTrxm의 신호 펩타이드(아미노산 1-64)에서 제거된 박테리아 발현 가용성 재조합 OsTrxm WT 단백질을 사용했고(Chi 등, 2008), SDS-PAGE로 분자 크기를 조사하였다(도 4A). 이황화물 결합을 포함하는 표적 단백질의 환원이 Trx 단백질의 주요 역할이라는 것은 잘 알려져 있다(Dyson 등, 1997; Chi 등, 2008; Park 등, 2009; Lee 등, 2009). 따라서 재조합 OsTrxm 단백질을 정제한 후, 0.5 mM DTT가 존재할 때 OsTrxm이 인슐린을 환원하는 능력을 측정하였다. 도 4B는 OsTrxm의 양이 증가함에 따라 인슐린 감소율이 상당히 증가했음을 나타낸다. 게다가, 재조합 OsTrxm의 구조는 SEC로 조사되었고, 다양한 단백질 복합체가 확인되었다(도 4C). 각 분획의 구조적 형태는 10% 네이티브 PAGE 겔에서 은 염색을 통해 확인되었다(도 4D). 흥미롭게도, SEC의 FI 분획에 있는 단백질은 고분자량(HMW)의 올리고머 단백질 밴드로 구성되었지만, FII 분획의 단백질은 분자량이 낮았다(도 4D, 위). 반면에, 모든 단백질 분획은 SDS-PAGE 겔에서 추정 분자량이 15kDa인 단일 밴드를 생성하였다(도 4D, 아래). 이러한 결과는 OsTrxm의 다중 피크가 다양한 구조를 가진 순수한 OsTrxm 단백질로 구성되어 있음을 시사한다.

[0059] 3. OsTrxm의 분자 샤페론 기능

[0060] 일반적으로 HMW 단백질은 기능상 필수적이라고 여겨진다(Jang 등, 2004; Hendrick 및 Hartl, 1993). 예를 들어, 외부 스트레스에 의해 변성된 기질은 HMW 단백질에 의해 보호되는데, 이는 분자 샤페론의 전형적인 특성이다(Lee 등, 2009; Jung 등, 2013; Datta 및 Rao, 1999).

[0061] OsTrxm의 분자 샤페론 활성은 기질인 말산 탈수소효소(MDH, malate dehydrogenase)의 열 응집을 억제하는 능력을 평가하여 측정하였다. MDH를 OsTrxm의 양을 증가시키면서 배양하면 기질의 열 응집이 점차 방지되었으며, 이는 1 MDH 대 30 OsTrxm의 서브유닛 몰 비율에서 상당히 차단되었다(도 5). 이러한 결과는 OsTrxm이 이황화물 환원효소와 분자 샤페론으로서 이중 기능을 가지고 있음을 확인하였다. OsTrxm의 구조에 따른 분자 샤페론 기능을 알아보기 위해 SEC로 분리된 두 분획(도 4C의 FI와 FII)을 조사하였다. 먼저 Trx 단백질의 고유한 기능인 이황화물 환원효소 활성을 OsTrxm의 두 분획(FI와 FII)을 사용하여 측정하였다. FII 분획은 FI 분획에 비해 강력한

이황화물 환원효소 활성을 보였다(도 6A). 반면에 FI 분획은 FII 분획에 비해 더 강력한 분자 샤페론 활성을 보였다(도 6B). 그런 다음 두 분획의 이중 기능을 조사하여 OsTrxm 구조와 기능 간의 관계를 평가하였다. FI 분획은 분리되지 않은 총 단백질에 비해 1.8배 더 높은 분자 샤페론 활성을 나타냈다(도 6B). 이와 대조적으로, 높은 이황화물 환원을 가진 FII 분획은 분리되지 않은 총 단백질보다 약 50%의 분자 샤페론 활성을 나타냈다(도 6A 및 B). 또한, 소수성 영역은 외부 스트레스에 의한 LMW에서 HMW로의 단백질 구조 변화에 중요하다(Park 등, 2009; Jang 등, 2004). OsTrxm의 HMW도 소수성 상호 작용에 의해 결정된다. 소수성은 소수성 영역에 결합하는 bis-ANS를 사용하여 FI와 FII 분획 간의 소수성을 비교하여 다양한 OsTrxm 구조가 분자 샤페론 활성에 미치는 영향을 파악하였다(Winter 등, 2008; Sharma 등, 1998). FI 분획의 단백질 결합 bis-ANS의 형광 강도가 FII 분획보다 더 높았으며, 이는 FI의 소수성 영역이 FII보다 더 노출되었음을 나타낸다(도 6C). 이러한 결과는 OsTrxm의 분자 샤페론 기능이 주로 HMW 복합체에서 발생하는 반면, 이황화물 환원 활성은 LMW 구조에서 나타난다는 가설을 강력하게 뒷받침한다.

[0063] **4. 시험관 내 구조 및 기능 변화에 대한 활성 OsTrxm 시스템인 잔류물의 중요한 역할**

[0064] 산화환원단백질의 보존된 활성 시스템 잔류물은 이황화물 환원효소 활성에 필수적이다. 일부 산화환원단백질의 활성 시스템 잔류물은 단백질 기능 변화와 깊은 관련이 있다(Park 등, 2009; Jang 등, 2004). 2-Cys Prx 단백질의 경우, 과산화효소 활성이 없는 $\Delta cPrxI/II$ 효모에서 C47/170 S-cPrxI의 발현은 $\Delta cPrxI/II$ 세포에 열 충격 저항성을 일관되게 부여하였다(Jang 등, 2004). 그러나 생체 내 구조적 변화에 대한 산화환원단백질의 활성 시스템 잔류물의 영향은 아직 알려지지 않았다.

[0065] 흥미롭게도 본 발명의 OsTrxm/SOE 식물체는 생체 내에서 열충격 내성과 올리고머 단백질을 보였다. 따라서 OsTrxm/SOE 식물의 열 내성과 올리고머 구조를 이해하기 위해, Cys 아미노산 둘 다를 Ser 잔기로 대체한 재조합 단백질(OsTrxmC/S)을 제조한 다음(도 7A, 위), 단백질 변종의 구조와 기능을 검정하였다. OsTrxmC/S 단백질의 구조는 기본 OsTrxm에 비해 LMW 중에서 HMW 복합체로 약간 이동하였다(도 7A, 아래). OsTrxmC/S의 bis-ANS 형광 강도는 기본 OsTrxm보다 상당히 높았다(도 7B). OsTrxm과 OsTrxmC/S 단백질의 이황화물 환원효소와 분자 샤페론 활성을 측정하였다(도 7C). OsTrxmC/S는 OsTrxm보다 상당히 높은 분자 샤페론 활성을 보였다. 대조적으로 OsTrxm의 이황화물 환원 활성은 OsTrxmC/S보다 높았다. 이러한 OsTrxm 생화학적 데이터(도 7)는 OsTrxmOE 및 OsTrxmC/SOE 내열성을 나타내는 생리학적 데이터(도 3)와 상관 관계가 있다.

[0066] OsTrxm의 시스템 잔류물에 의한 올리고머 변화는 분자 샤페론 기능을 활성화하고 식물 내열성에 필수적인 역할을 한다. 이러한 기능은 작은 열충격 단백질과 유사한 기능을 보인다. 그러나 이 연구에서 OsTrxm의 두 활성 시스템 잔류물이 OsTrxm의 올리고머화와 이황화물 환원효소에서 분자 샤페론으로의 기능적 변화에 상당한 영향을 미친다는 것이 새롭게 제안되었다. 또한 두 활성 시스템이 소수성 잔류물 노출과 올리고머화에 의한 구조적 변화에 중요하다는 것을 확인하였다. 전자 현미경(EM)을 사용하여 OsTrxm과 OsTrxmC/S의 SEC 분리 분획 구조를 분석하였다(도 7A).

[0067] 음성 염색 후 단일 입자 이미지 처리를 통해 OsTrxm과 OsTrxmC/S 복합체의 구조적 특성을 확인하였다. 직경 범위가 100~500nm인 고 분자량 및 중 분자량 단백질 분획에서 OsTrxmC/S는 OsTrxm보다 크고 단백질 입자가 더 많았다(도 8A 및 D; 도 8B 및 E). 그러나 직경이 약 50nm인 OsTrxmC/S의 저 분자량 단백질 분획은 OsTrxm보다 단백질 입자 밀도가 낮았다(도 8C 및 F). EM에서 분자 형태를 관찰한 결과 OsTrxmC/S는 고분자량 올리고머 복합체와 결합할 수 있는 반면 OsTrxm은 주로 저 분자량 올리고머로 구성되어 있음을 뒷받침하였다. OsTrxm과 OsTrxmC/S 단백질의 서로 다른 올리고머 구조는 다양한 분자 샤페론 활동을 보였다.

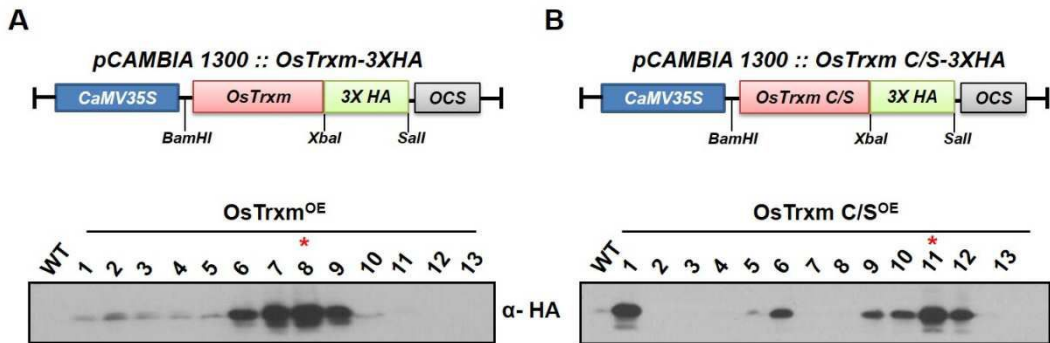
[0069] 즉, 위 실험들을 통해 본 발명은 OsTrxm 또는 OsTrxmC/S가 분자 샤페론으로서 새로운 생리적 및 분자적 기능을 보여 주었으며, 열 충격 스트레스 하에서 식물을 보호하는 역할을 한다는 것을 보여주었다. 그러나 구조적 및 기능적 변화에 대한 중요한 OsTrxm 시스템 조절 모드는 아직 확인되지 않았다. 따라서 NMR, 결정 구조 또는 생물정보학 분석을 통해 다른 Trx 유형 단백질과 비교하여 단백질 구조에서 OsTrxm 활성 시스템의 조절 메커니즘에 대한 추가 연구가 필요할 것이다.

[0071] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야

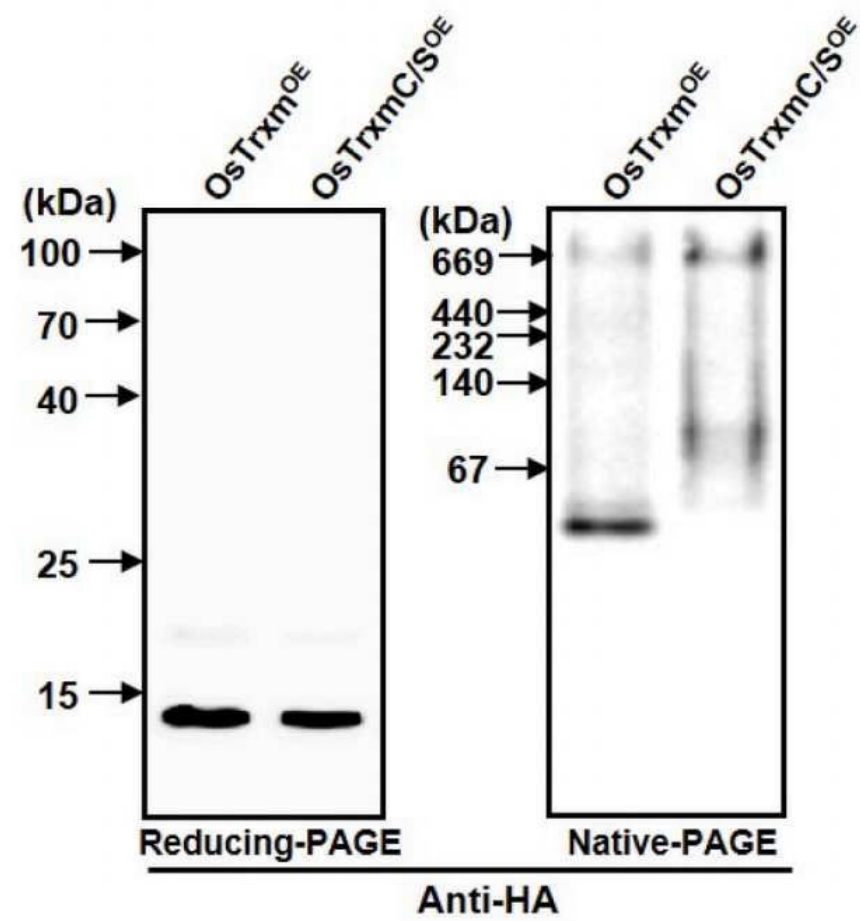
한다.

도면

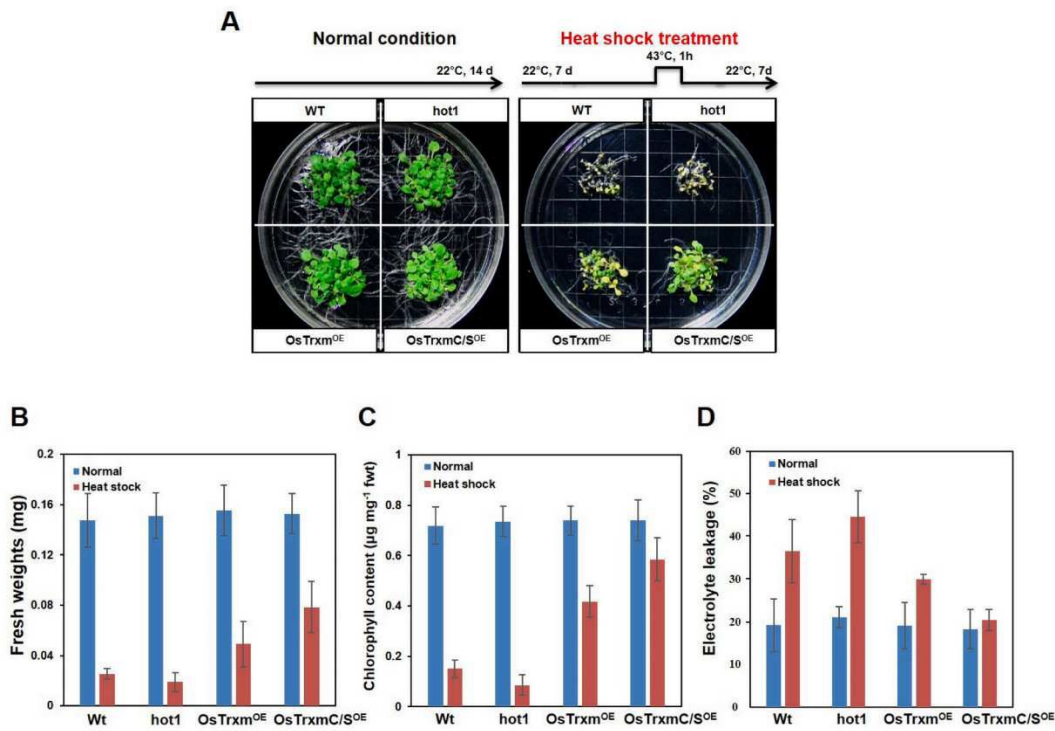
도면1



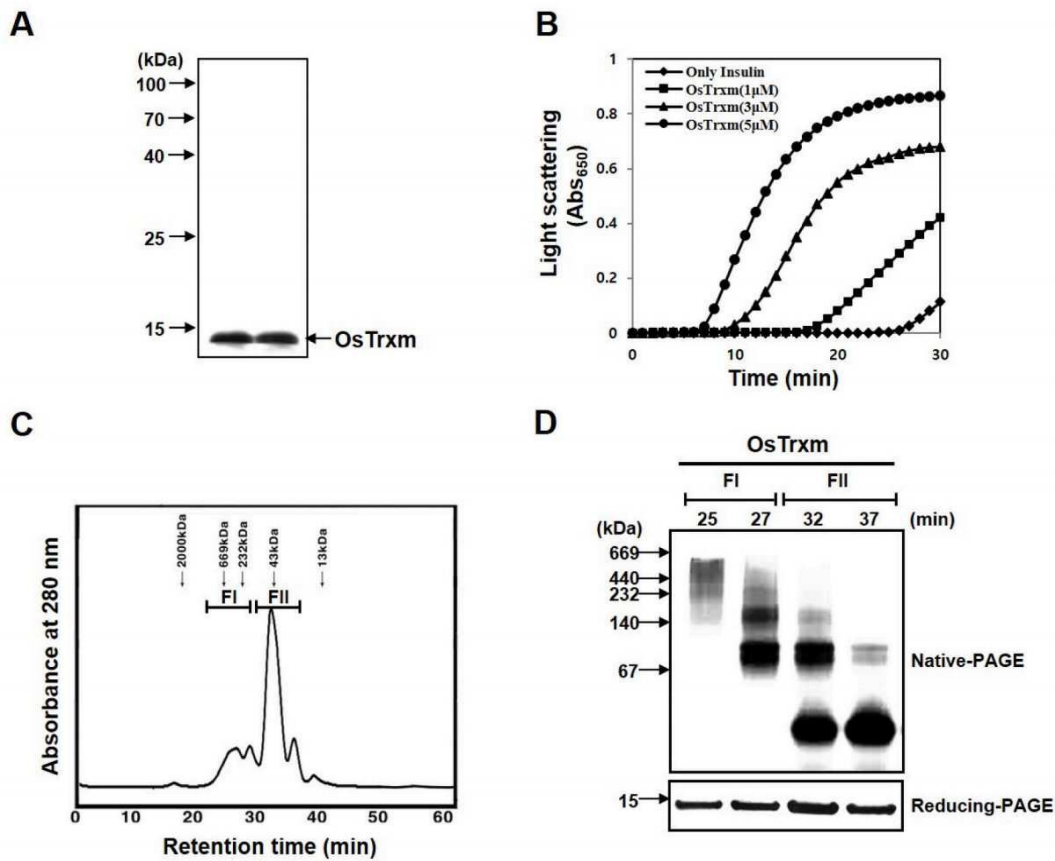
도면2



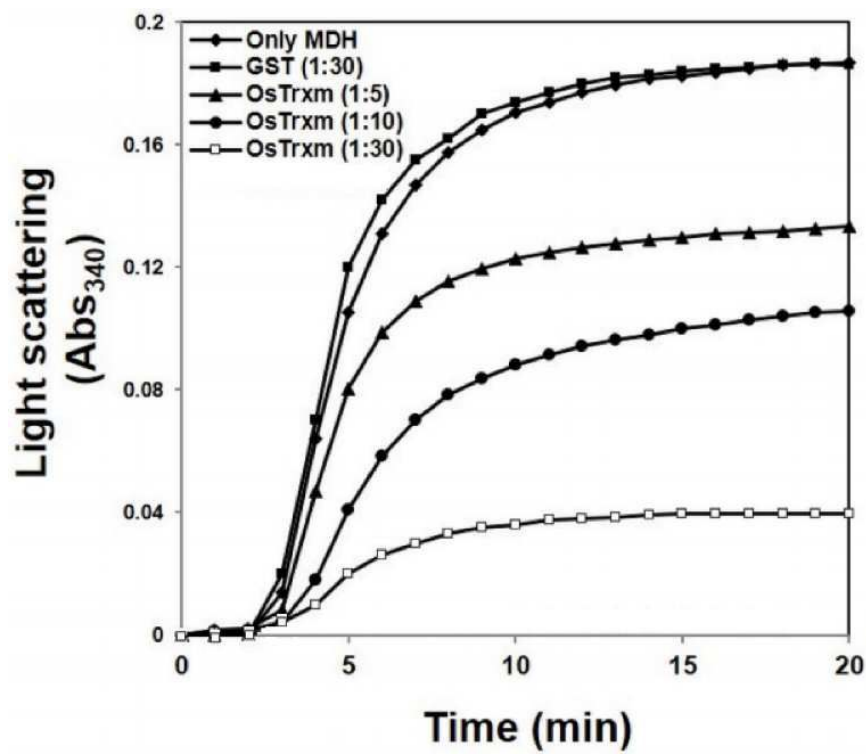
도면3



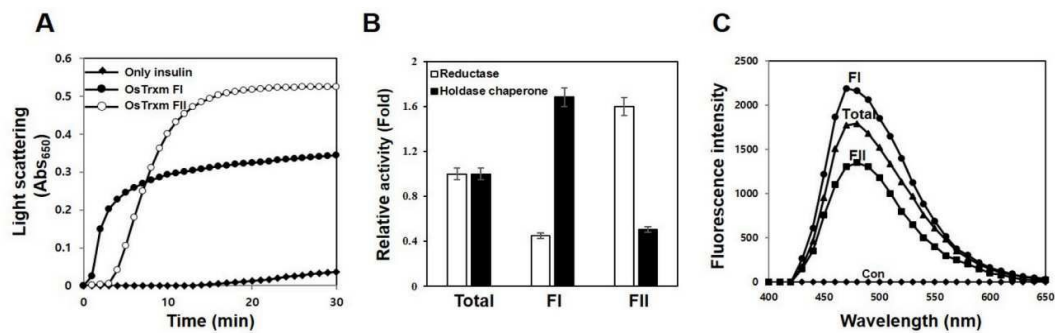
도면4



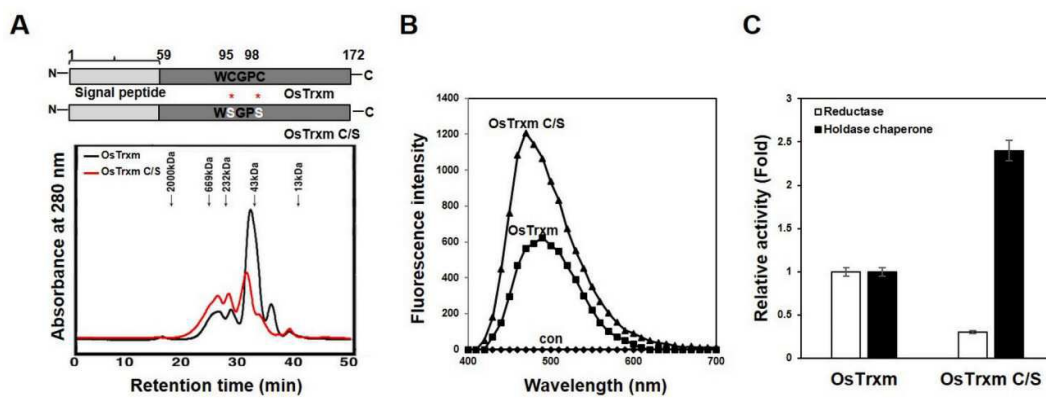
도면5



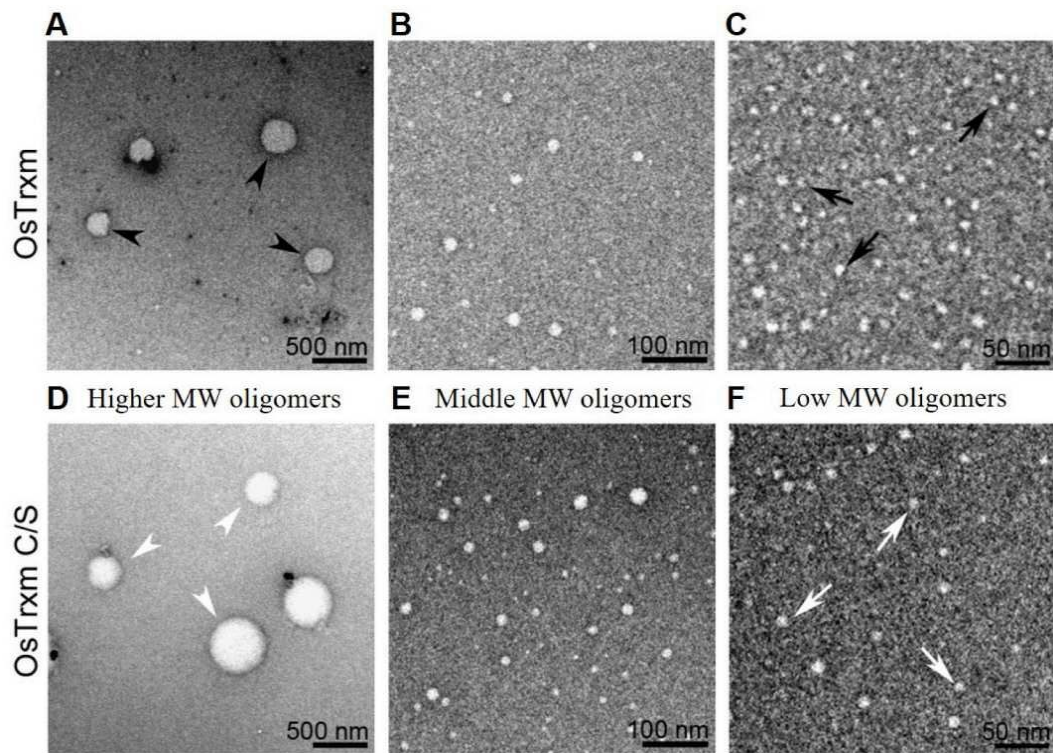
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.