(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0176877
(43) 공개일자 2024년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)
A01H 6/54 (2018.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8261 (2013.01)
A01H 5/10 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2023-0077198
(22) 출원일자 2023년06월16일
심사청구일자 2023년06월16일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김민철
경상남도 진주시 하대로 142, 105동 2001호 (하대동, 현대아파트)
전현진
경상남도 진주시 하대로 142, 105동 2001호 (하대동, 현대아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

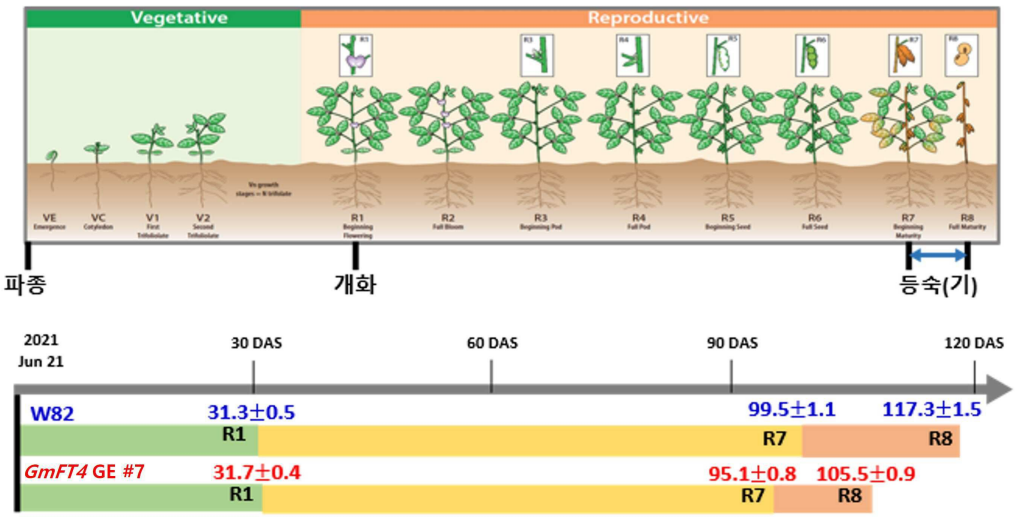
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **GmFT4 유전자 교정에 의해 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체**

(57) 요 약

본 발명은 콩 유래 *GmFT4* (*Glycine max* FLOWERING LOCUS T 4) 유전자 교정에 의해 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체에 관한 것이다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A01H 6/54 (2022.05)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자
박미숙
경상남도 진주시 초전북로 148-3 (초전동)
정춘희
경상남도 진주시 평거로139번길 11-3, 203동 505호 (신안동, 신안흥한타운2차아파트)
김채연
경상남도 창원시 진해구 풍호로 68, 106동 303호 (풍호동, 풍호동 한림리츠빌)
이수현
경상남도 거제시 거제면 소랑1길 72
진병준
경상남도 창원시 마산합포구 산호북15길 11, 2동 505호 (산호동, 한진아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345363648
과제번호	2018R1D1A3B07049940
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	PEBP Family 유전자 발현 조절을 통한 콩의 개화시기 및 초형 조절기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2023.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 콩 유래 *GmFT4* (*Glycine max* FLOWERING LOCUS T 4) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 콩 식물세포에 도입하여 유전체를 교정하는 단계; 및

(b) 상기 유전체가 교정된 콩 식물세포로부터 콩 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열은 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 가이드 RNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 콩 식물세포에 도입하는 것은, 콩 유래 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터; 또는 콩 유래 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체;를 이용하는 것을 특징으로 하는, 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체.

청구항 5

제4항에 따른 콩 식물체의 유전체가 교정된 종자.

청구항 6

콩 유래 *GmFT4* (*Glycine max* FLOWERING LOCUS T 4) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA)를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터; 또는 콩 유래 *GmFT4* (*Glycine max* FLOWERING LOCUS T 4) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체;를 유효성분으로 함유하는, 콩 식물체의 조기 등숙을 유도하기 위한 유전체 교정용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열은 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 콩 식물체의 조기 등숙을 유도하기 위한 유전체 교정용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 *GmFT4* (*Glycine max* FLOWERING LOCUS T 4) 유전자 교정에 의해 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 콩(*Glycine max*)은 단백질, 지방 및 식이섬유가 풍부하며, 이소플라본, 안토시아닌, 레시틴, 루테인, 사포닌 등 다양한 건강 기능성 물질을 함유하고 있어 식품으로써 높은 영양학적 가치를 가지고 있을뿐만 아니라, 사료 및 가공용 등의 산업적 가치도 큰 작물이다. 국내 재배용 콩 대부분의 등숙기(ripening stage)는 10월 초순에서 중

순인데, 최근 기후변화로 인해 콩 수확기에 가을장마 및 잦은 태풍 등이 발생하여 콩의 수량 및 품질이 저하되는 문제가 빈번히 발생하고 있다.

[0003] 이에, 콩의 등숙기를 앞당기는 연구는 최근 콩의 생산성 및 품질을 저해하는 가을 수확기의 악화된 기상조건을 회피하는 효과를 가짐으로써 작부체계 개선을 통한 농가 소득 증대 측면에서 매우 중요한 의미가 있다. 특히, 기능성 및 산업적 이용성이 증진된 고품질 콩의 안정적인 대량생산을 위해서는 변화된 기후의 재배조건에서도 높은 생산성이 보장되는 콩 품종의 육성이 매우 중요하다.

[0004] 게놈을 교정하는 방법들 중에 최근 주목받고 있는 것이 CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9) 시스템이다. 제 3세대 유전자가위 기술인 CRISPR/Cas9 기술을 이용하면 단기간에 세포내 원하는 유전자만을 특이적으로 교정할 수 있다. 기존의 1세대 유전자가위 기술인 징크핑거 뉴클레이즈(ZFNs: Zinc Finger Nucleases)와 2세대 탈렌(TALENs: Transcriptor Activator-Like Effector Nucleases) 기술보다 정확성과 효율이 입증되었으며, 설계가 단순하고 비용이 저렴하다는 장점이 있다. 그리고 최근 이를 이용하여 토마토, 포도, 벼 등과 같은 다양한 식물 종에서 형질전환을 일으키는 데 성공하였다고 보고된 바 있다. 또한, 이러한 돌연변이 개체들이 다음 세대로 안정적으로 전달되는 것도 확인되었다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제0742219호에는 '멜론 유래의 익스펜신 유전자를 이용한 과실의 성숙조절방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2023-0029430호에는 '메디카고 트런카툴라에서 분리된 MtAHL23과 MtAHL5 유전자를 이용한 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 콩 식물체의 제조 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 *GmFT4* 유전자 교정에 의해 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 콩 유래 *GmFT4*(*Glycine max* FLOWERING LOCUS T 4) 유전자를 표적으로 하는 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 제조한 유전자 교정 콩 식물체의 등숙기가 야생형 대비 약 6~8일 단축되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 (a) 콩 유래 *GmFT4* (*Glycine max* FLOWERING LOCUS T 4) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 콩 식물세포에 도입하여 유전체를 교정하는 단계; 및 (b) 상기 유전체가 교정된 콩 식물세포로부터 콩 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 콩 유래 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터; 또는 콩 유래 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체;를 유효성분으로 함유하는, 콩 식물체의 조기 등숙을 유도하기 위한 유전체 교정용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 유전체 교정 식물체의 제조방법은 외부 유전자가 삽입되어 있지 않고 자연적 변이와 구별할 수 없는 작은 변이만 가지고 있어, 안전성과 환경 유해성 여부를 평가하기 위해 막대한 비용과 시간이 소모되는 GMO 작물과 달리 비용과 시간을 절약할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, CRISPR 유전자가위 기술은 특정 유전자의 변이를 도입하는 방식이므로 양적 형질을 향상시킬 수 있는 영구적인 방법이 될 것으로 기대된다.

[0011] 또한, 본 발명의 제조방법은 콩 식물체의 조기 등숙 유도를 통해 수확시기를 앞당길 수 있으므로, 콩 수확기의 기상조건 악화를 회피하여 콩 수확량 개선에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1A는 본 발명의 gRNA1의 표적 서열(Target 1: *GmFT4* 유전자의 첫 번째 엑손 내) 및 gRNA2의 표적 서열(Target 2: *GmFT4* 유전자의 두 번째 엑손 내)의 위치를 나타내는 모식도이고, 도 1B는 본 발명의 gRNA1 및 gRNA2가 *GmFT4* 유전자에만 특이적으로 결합하는 것을 확인한 결과이다.

도 2는 본 발명에서 *GmFT4* 유전자 교정에 사용한 pMDC123_pcoCas9_CRISPR_FT4 벡터의 모식도(A) 및 상기 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주를 이용하여 콩 식물체에서 *GmFT4* 유전자를 교정하는 과정을 나타낸 사진(B)이다.

도 3은 *GmFT4* 유전자가 교정된 T_1 형질전환체의 *GmFT4* 유전자 교정 여부를 확인한 PCR 결과이다. *Bar*는 마커 유전자이고, WT는 야생형 콩 식물체이다.

도 4는 *GmFT4* 유전자가 교정된 T_1 형질전환체의 *GmFT4* 유전자의 염기서열(A) 및 아미노산 서열(B)을 야생형 콩 식물체와 비교 분석한 결과이다.

도 5는 *GmFT4* 유전자가 교정된 T_2 형질전환체의 개화기(A), 최초 등숙기(B), 최종 등숙기(C), 총 등숙기(D)를 확인한 결과이다. R1: 최초 개화 시기, R7: 꼬투리 하나가 처음으로 노랗게 익는 시기, R8: 95%의 꼬투리가 노랗게 익는 시기, R7~R8: 꼬투리가 처음 익기 시작한 시기부터 95% 이상 익을 때까지 소요되는 기간, W82: 야생형 콩 식물체, DAS: day after sowing.

도 6은 *GmFT4* 유전자가 교정된 T_2 형질전환체 종자를 파종한 후 108일 째의 꼬투리 표현형을 확인한 사진이다. W82: 야생형 콩 식물체, DAS: day after sowing.

도 7은 *GmFT4* 유전자가 교정된 T_2 형질전환체 종자를 파종한 후 108일 째 초장(A), 꼬투리를 가지는 유효 마디수(B), 종자 수(C)를 확인한 결과 및 *GmFT4* 유전자 교정 T_2 형질전환체로부터 확보한 T_3 종자의 사진(D)이다.

도 8은 *GmFT4* 유전자가 교정된 형질전환체(*GmFT4* GE #7) 및 야생형(W82)의 등숙기를 보여주는 모식도이다. DAS: day after sowing.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 콩 유래 *GmFT4* (*Glycine max* FLOWERING LOCUS T 4) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 콩 식물세포에 도입하여 유전체를 교정하는 단계; 및

[0014] (b) 상기 유전체가 교정된 콩 식물세포로부터 콩 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법에 있어서, 상기 등숙기(ripening stage)는 콩 식물체의 꼬투리가 노랗게 익는 시기를 말하는 것으로, 바람직하게는 꼬투리 하나가 처음으로 노랗게 익기 시작한 시기부터 95% 이상의 꼬투리가 노랗게 익을 때까지 소요되는 기간을 말하는 것이다.

[0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법에 있어서, 상기 콩 유래 *GmFT4* 유전자는 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체의 제조방법에 있어서, 상기 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열은 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 본 발명에 따른 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA가 표적하는 *GmFT4* 유전자 내 위치는 총 2개로, 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 용어 "유전체/유전자 교정(genome/gene editing)"은, 인간 세포를 비롯한 동·식물 세포의 유전체 염기서열에 표적지향형 변이를 도입할 수 있는 기술로서, DNA 절단에 의한 하나 이상의 핵산 분자의 결실, 삽입, 치환 등에 의하여 특정 유전자를 녹-아웃(knock-out) 또는 녹-인(knock-in)하거나, 단백질을 생성하지 않는 비-코딩 DNA 서열에도 변이를 도입할 수 있는 기술을 말한다. 본 발명의 목적상 상기 유전체 교정은 특히 엔도뉴클레아제(endonuclease) 예컨대, Cas9 단백질 및 가이드 RNA를 이용하여 식물체에 변이를 도입하는 것일 수 있다.

[0019] 용어 "표적 유전자"는 본 발명을 통해 교정하고자 하는 식물체의 유전체 내에 있는 일부 DNA를 의미한다. 즉, 원칙적으로 그 유전자의 종류에 제한되지 않으며, 코딩 영역 및 비-코딩(non-coding) 영역을 모두 포함할 수 있

다. 당업자는 그 목적에 따라, 제조하고자 하는 유전체 교정 식물체에 대하여 원하는 변이에 따라 상기 표적 유전자를 선별할 수 있다.

[0020] 용어 "가이드 RNA(guide RNA)"는 표적 유전자의 염기서열을 암호화하는 DNA에 특이적인 RNA를 의미하며, 표적 DNA 염기서열과 전부 또는 일부가 상보적으로 결합하여 해당 표적 DNA 염기서열로 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 이끄는 역할을 하는 리보핵산을 의미한다. 상기 가이드 RNA는 두 개의 RNA, 즉, crRNA(CRISPR RNA) 및 tracrRNA(trans-activating crRNA)를 구성 요소로 포함하는 이중 RNA(dual RNA); 또는 표적 DNA 내 염기서열과 전부 또는 일부 상보적인 서열을 포함하는 제1 부위 및 RNA-가이드 뉴클레아제와 상호작용하는 서열을 포함하는 제2 부위를 포함하는 단일 사슬 가이드 RNA(sgRNA) 형태를 말하나, RNA-가이드 뉴클레아제가 표적 염기서열에서 활성을 가질 수 있는 형태라면 제한 없이 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 가이드 RNA는 바람직하게는, 단일 가닥 가이드 RNA 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 사용된 엔도뉴클레아제의 종류 또는 엔도뉴클레아제의 유래 미생물 등에 당업계의 공지된 기술에 따라서 적절히 선택할 수 있다.

[0021] 또한, 상기 가이드 RNA는 플라스미드 주형으로부터 전사된 것 또는 생체 외(*in vitro*)에서 전사된(transcribed) 것(예컨대, 올리고뉴클레오티드 이중가닥)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 가이드 RNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 콩 식물세포에 도입하는 것은, 콩 유래 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터; 또는 콩 유래 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체;를 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 엔도뉴클레아제 단백질은 Cas9(CRISPR associated protein 9), Cpf1(CRISPR from Prevotella and Francisella 1), TALEN(Transcription activator-like effector nuclease), ZFN(Zinc Finger Nuclease) 또는 이의 기능적 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 Cas9 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] Cas9 단백질 또는 유전자 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 같은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다. 예컨대, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피요제네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 Cas9 단백질, 캠필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 또는 스트렙토코커스 아우레우스(*Streptocuccus aureus*) 유래의 Cas9 단백질, 네이쎄리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) 유래의 Cas9 단백질, 파스투렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*) 유래의 Cas9 단백질, 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*) 유래의 Cas9 단백질 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] Cas9 단백질은 RNA-guided DNA 엔도뉴클레아제 효소로, 이중 가닥 DNA 절단(double stranded DNA break)을 유도한다. Cas9 단백질이 정확하게 표적 DNA의 염기서열에 결합하여 DNA 가닥을 잘라내기 위해서는 PAM(Protospacer Adjacent Motif)이라 알려진 3개의 염기로 이루어진 짧은 염기서열이 표적 DNA의 염기서열 옆에 존재해야 하며, Cas9 단백질은 PAM 서열(NGG)로부터 3번째와 4번째 염기쌍 사이를 추정하여 절단한다.

[0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질은 리보핵산-단백질(ribonucleoprotein) 복합체를 형성하여 RNA 유전자 가위(RNA-Guided Engineered Nuclease, RGEN)로 작동한다.

[0027] 본 발명에서 사용된 CRISPR/Cas9 시스템은 교정하고자 하는 특정 유전자의 특정위치에 이중나선 절단을 도입하여 DNA 수선 과정에서 유도되는 불완전 수선에 의한 삽입-결실(insertion-deletion, InDel) 돌연변이를 유도시키는 NHEJ(non-homologous end joining) 기작에 의한 유전자 교정 방법이다.

[0028] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체를 식물세포에 형질도입하는 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens et al., 1982, Nature 296: 72-74; Negrutiu et al., 1987, Plant Mol. Biol. 8: 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito et al., 1985, Bio/Technol. 3: 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway et al.,1986, Mol. Gen. Genet. 202: 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein et al.,1987, Nature 327: 70), 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.

[0029] 또한, 상기 재조합 벡터를 식물세포에 도입하는 것은 형질전환 방법을 의미한다. 식물 종의 형질전환은 이제는

쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다.

[0030] 상기 형질교정에 이용되는 "식물세포"는 어떤 식물세포도 된다. 식물세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물이다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 신초 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

[0031] 본 발명의 제조방법에 있어서, 유전체가 교정된 식물세포로부터 유전체가 교정된 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 유전체가 교정된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0032] 본 발명은 또한, 상기 제조방법에 의해 제조된 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체 및 상기 식물체의 종자를 제공한다.

[0033] 본 발명에 따른 조기 등숙이 유도된 유전체 교정 콩 식물체는 *GmFT4* 유전자를 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 교정한 것으로, 콩 유래 *GmFT4* 유전자가 녹-아웃되어, 유전체를 교정하지 않은 콩 식물체에 비해 조기 등숙이 유도된 콩 식물체이다.

[0034] 본 발명은 또한, 콩 유래 *GmFT4* (*Glycine max* FLOWERING LOCUS T 4) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA)를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터; 또는 콩 유래 *GmFT4* (*Glycine max* FLOWERING LOCUS T 4) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체;를 유효성분으로 함유하는, 콩 식물체의 조기 등숙을 유도하기 위한 유전체 교정용 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명의 유전체 교정용 조성물에 있어서, 상기 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열은 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 발명의 유전체 교정용 조성물은 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터, 또는 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체를 포함하고 있어, 상기 조성물을 콩 식물세포에 처리할 경우, 상기 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체가 RNA 유전자 가위로 작동하여 표적 유전자를 교정할 수 있다.

[0037] 본 발명의 유전체 교정용 조성물은 바람직하게는, 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 *GmFT4* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA를 포함하고 있어, *GmFT4* 유전자를 녹-아웃시킬 수 있고, *GmFT4* 유전자의 녹-아웃을 통해 콩 식물체의 조기 등숙을 유도할 수 있는 것이다.

[0039] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] **재료 및 방법**

[0042] **1. 식물재료**

[0043] 콩(*Glycine max*) Williams 82 품종의 종자를 흐르는 물에 30분 동안 세척한 뒤 정상적인 종피를 가지는 종자를 골라 70%(v/v) 에탄올에서 30초 동안 살균하고, 1%(v/v) 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite) 용액에서 30분 동안 살균한 뒤 세척하고, 여분의 물기를 제거하여 준비하였다. 이후, 종자의 배꼽이 아래로 가도록 발아 배지(B5 배지 3.2 g, 수크로스 20 g, MES 0.5 g, 아가 8 g, pH 5.7)에 올려놓고 26℃ 배양기에서 20시간 동안 암조건으로 발아시킨 후, 온실에서 장시간 조건(16시간 빛, 8시간 어둠)으로 재배하였다.

[0045] **2. 형질전환을 위한 벡터 구축 및 콩 형질전환**

[0046] 콩 유래 *GmFT4* (*Glycine max* FLOWERING LOCUS T 4, Glyma08g363100) 유전자를 표적으로 하는 유정자 교정을 실시하기 위해서 *GmFT4* 유전자의 첫 번째 엑손 또는 두 번째 엑손 내의 표적서열에 특이적으로 결합하는 각각의 gRNA(gRNA1 또는 gRNA2)를 CRISPRdirect 웹 도구를 사용하여 설계하고(도 1A), gRNA1 및 gRNA2를 코돈 최적화된 *Cas9* 유전자(plant codon optimized Cas9)가 포함된 pMDC123 벡터에 골든 게이트 복제를 통해 삽입하여 pMDC123_pcoCas9_CRISPR_FT4 벡터를 제조하였다(도 2A). 이후, 20시간 동안 발아 배지에서 발아시킨 콩 종자를 블레이드를 이용하여 절반으로 쪼개어 상기 pMDC123_pcoCas9_CRISPR_FT4 벡터가 포함된 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 균주와 4일 동안 공동 배양하고, SEMP5 배지(1 ℓ 당: MS B5 배지 4.4 g, 수크로스 30 g, 티오황산나트륨 158 mg, DTT 154 mg, MES 0.6 g, 아스파라긴 50 mg, 피로글루탐산 100 mg, 아가 8 g, 제아틴 1 mg, GA3 1 mg, IAA 0.1 mg, 세포탁심 125 mg, 티메틴 50 mg, 반코마이신 50 mg)에 치상한 후, 계대 배양하여 줄기가 4 cm 이상 신장하였을 때 줄기 부분을 절단하여 항생제가 첨가되지 않은 뿌리 유도 배지(1 ℓ 당: MS B5 배지 4.4 g, 수크로스 30g, 티오황산나트륨 158 mg, DTT 154 mg, MES 0.6 g, 아스파라긴 50 mg, 피로글루탐산 100 mg, 아가 8 g, IBA 1 mg, 세포탁심 50 mg, 티메틴 50 mg, 반코마이신 25 mg)에서 뿌리를 유도하였다. 이후, 줄기의 절단면에서 뿌리가 발생한 형질전환체는 작은 화분으로 옮겨 플라스틱 통에서 2주 동안 순화한 후 큰 화분으로 옮겨 온실에서 재배하였다(도 2B).

[0048] **실시예 1. *GmFT4* 유전자가 교정된 콩 형질전환체 제조**

[0049] 콩 유래 *GmFT4* 유전자의 첫 번째 엑손 부위를 표적으로 하는 gRNA1 및 두 번째 엑손 부위를 표적으로 하는 gRNA2를 디자인하여(표 1), 다른 *GmFT* 패밀리 유전자(*GmFT1*, *GmFT2*, *GmFT3*, *GmFT5* 또는 *GmFT6*)의 염기서열과 비교한 결과, gRNA1 및 gRNA2는 *GmFT4* 유전자에만 특이적으로 결합할 수 있는 서열임을 확인하였다(도 1).

표 1

[0050] *GmFT4* 유전자를 표적으로 하는 gRNA 정보

구분	gRNA 서열 (3'-5')	서열번호
gRNA1	AGGGTTTAGCAGTTGTTTGG	2
gRNA2	TGTATACTTCCTTATAAACG	3

[0052] 이후, gRNA1 및 gRNA2를 발현하도록 제조한 pMDC123_pcoCas9_CRISPR_FT4 벡터가 포함된 아그로박테리움 튜머파시엔스 균주를 콩 종자와 공동 배양하여 *GmFT4* 유전자가 교정된 형질전환체(T_0)를 제조하였고(도 2), 세대를 진전시켜 종자를 확보하고 이를 온실에서 재배하여 14개의 T_1 형질전환체를 확보하였다. 상기 T_1 형질전환체 각 개체의 게노믹 DNA를 추출하고 하기 표 2의 프라이머를 이용하여 마커 유전자인 *Bar* 유전자 및 *GmFT4* 유전자에 대한 PCR을 수행하여 형질전환된 콩 식물체의 유전자 교정 여부를 확인하였다.

표 2

[0053] PCR 분석에 사용한 프라이머 정보

구분	프라이머 서열 (5'-3')	서열번호
Bar 유전자	F: AAACCCACGTCATGCCAGTTC	4
	R: CCATCGTCAACCACTACATCGAGAC	5
GmFT4 유전자	F: CAAGATAGGCCAAAAGCTAGC	6
	R: AGCTTATATACTACGTTGTTACGC	7

[0055] 그 결과, 야생형 식물체에서는 나타나지 않았던 282 bp의 밴드가 T_1 형질전환체에서만 나타나는 것을 확임함으로써, T_1 형질전환체는 gRNA1 및 gRNA2를 통한 유전자 교정에 의해 *GmFT4* 유전자의 발현이 저해되는 것을 확인하였다(도 3).

[0056] 또한, *GmFT4* 유전자의 시퀀싱 분석을 수행한 결과, T_1 형질전환체의 *GmFT4* 유전자의 염기서열은 야생형의 *GmFT4* 유전자의 염기서열에 비해 226 bp의 염기가 결실된 것을 확인하였고(도 4A), T_1 형질전환체의 염기서열을 가상으로 번역한 결과, 조기 종결 코돈이 발생하는 것을 확인함으로써 형질전환체는 정상적인 GmFT4 단백질이 생성되지 않음을 알 수 있었다(도 4B).

[0058] **실시예 2. *GmFT4* 유전자가 교정된 콩 형질전환체의 개화기 및 등숙기 확인**

[0059] 본 발명에 따른 *GmFT4* 유전자 교정 T_1 형질전환체 중에서 5개 계통(#7-2, #7-3, #7-7, #7-9, #7-14)을 선발하여 세대를 진전시켜 T_2 종자를 얻은 후 각각 8립씩 파종하여 108일 동안 온실에서 배양하며 개화기(R1) 및 등숙기(R7, R8)를 확인하였다. R1은 최초 개화 시기이고, R7은 꼬투리 하나가 처음으로 노랗게 익는 시기이고, R8은 95%의 꼬투리가 노랗게 익는 시기를 나타내며, 이들을 파종 후 날수(DAS, day after sowing)로 표시하였다. R7~R8은 꼬투리가 처음 익기 시작한 시기부터 95% 이상 익을 때까지 소요되는 기간이다.

[0060] 그 결과, *GmFT4* 유전자 교정 T_2 형질전환체의 개화기(R1)는 야생형과 큰 차이가 없는 것을 확인한 반면, *GmFT4* 유전자 교정 T_2 형질전환체의 최초 등숙기(R7)는 야생형 대비 약 3~5일, 최종 등숙기(R8)는 야생형 대비 약 10~12일, 총 등숙기(R7~R8)는 약 6~8일 단축되는 것을 확인하였다(도 5).

[0061] 또한, 파종 후 108일 째 되는 날 꼬투리 표현형을 확인한 결과, 야생형은 성숙되지 않아 일부 초록색의 꼬투리가 남은 반면, *GmFT4* 유전자 교정 T_2 형질전환체는 95% 이상의 꼬투리가 모두 성숙하는 것을 확인하였다(도 6).

[0063] **실시예 3. *GmFT4* 유전자가 교정된 콩 형질전환체의 생육 및 수확량 확인**

[0064] 본 발명에 따른 *GmFT4* 유전자 교정 T_1 형질전환체 중에서 5개 계통(#7-2, #7-3, #7-7, #7-9, #7-14)을 선발하여 세대를 진전시켜 T_2 종자를 얻은 후 각각 8립씩 파종하여 108일 동안 온실에서 배양한 후, 각 식물체의 초장, 꼬투리를 가지는 유효 마디 수, 종자 수를 조사하였다.

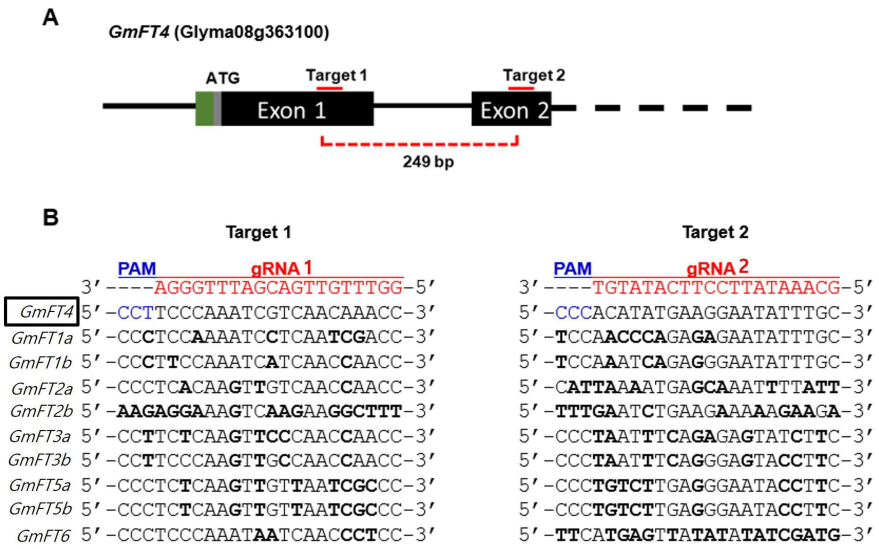
[0065] 그 결과, *GmFT4* 유전자 교정 T_2 형질전환체의 초장은 야생형 대비 전반적으로 감소하였고, 유효마디 수는 야생형 대비 약 1~3마디 증가하였고, 종자수는 야생형 대비 약 22% 증가하는 것을 확인하였다(도 7A, 7B 및 7C).

[0066] 또한, *GmFT4* 유전자 교정 T_2 형질전환체로부터 확보한 T_3 종자를 같은 원형 플레이트에 꽉 차도록 종자를 담아 확인한 결과, *GmFT4* 유전자 교정에 의해 종자의 크기와 품질에는 차이가 없다는 것을 확인하였다(도 7D).

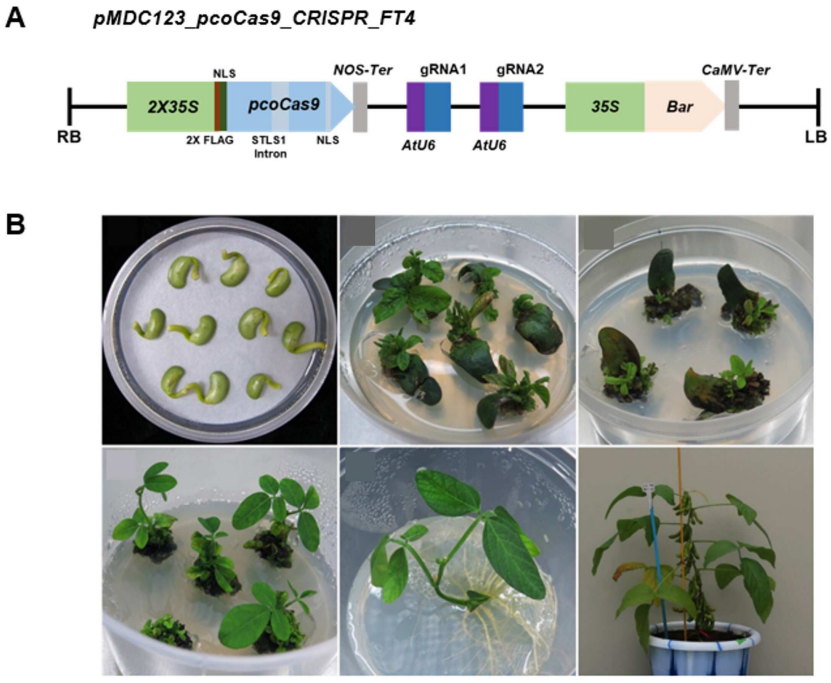
[0068] 상기 결과를 바탕으로 *GmFT4* 유전자 교정을 통해 콩 식물체의 등숙기가 효과적으로 단축되어, 야생형에 비해 약 11일 정도 수확시기를 앞당길 수 있음을 알 수 있었다(도 8).

도면

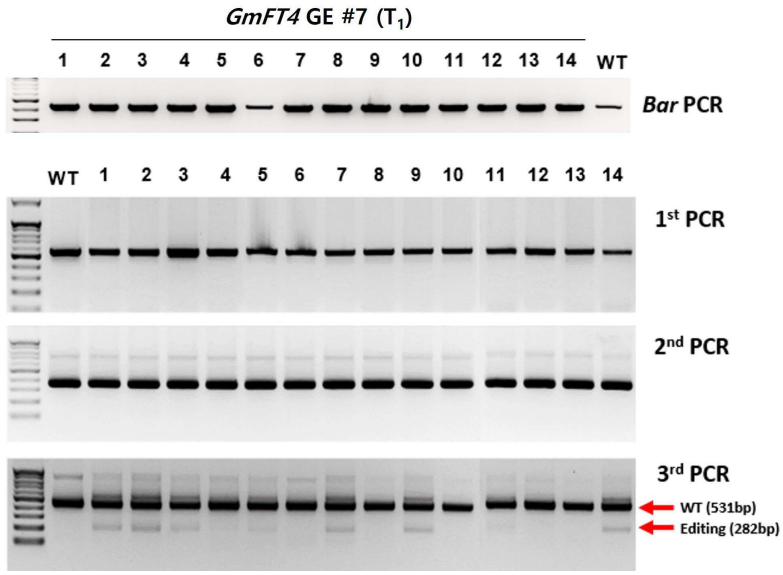
도면1


A
GmFT4 (Glyma08g363100)
ATG
Target 1
Target 2
Exon 1
Exon 2
249 bp
B
Target 1
Target 2
PAM
gRNA 1
PAM
gRNA 2
3′----AGGGTTTAGCAGTTGTTTGG-5′
GmFT4 5′-CCTTCCCAAATCGTCAACAAACC-3′
GmFT1a 5′-CCCTCCAAAATCCTCAATCGACC-3′
GmFT1b 5′-CCCTTCCAAATCATCAACCAACC-3′
GmFT2a 5′-CCCTCACAAGTTGTCAACCAACC-3′
GmFT2b 5′-AAGAGGAAAGTCAAGAAGGCTTT-3′
GmFT3a 5′-CCTTCTCAAGTTCCCAACCAACC-3′
GmFT3b 5′-CCTTCCCAAGTTGCCAACCAACC-3′
GmFT5a 5′-CCCTCTCAAGTTGTTAATCGCCC-3′
GmFT5b 5′-CCCTCTCAAGTTGTTAATCGCCC-3′
GmFT6 5′-CCCTCCCAAATAATCAACCTCC-3′
3′----TGTATACTTCCTTATAAACG-5′
5′-CCCACATATGAAGGAATATTTGC-3′
5′-TCCAACCCAGAGAGAATATTTGC-3′
5′-TCCAAATCAGAGGGAATATTTGC-3′
5′-CATTAAAATGAGCAAATTTTATT-3′
5′-TTTGAATCTGAAGAAAAAGAAGA-3′
5′-CCCTAATTTCAGAGAGTATCTTC-3′
5′-CCCTAATTTCAGGGAGTACCTTC-3′
5′-CCCTGTCTTGAGGGAATACCTTC-3′
5′-CCCTGTCTTGAGGGAATACCTTC-3′
5′-TTCATGAGTTATATATATCGATG-3′

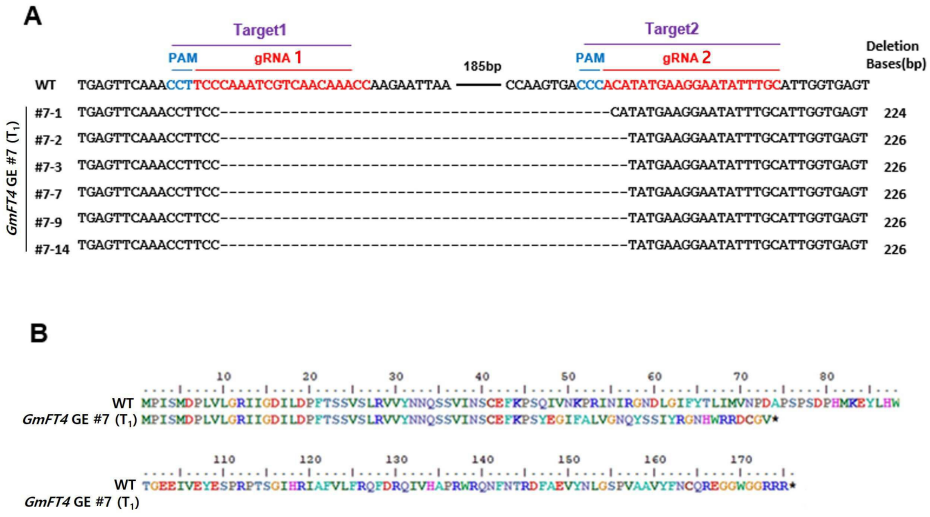
도면2


A
pMDC123_pcoCas9_CRISPR_FT4
RB
2X35S
NLS
2X FLAG
pcoCas9
STLS1 Intron
NLS
NOS-Ter
gRNA1
AtU6
gRNA2
AtU6
35S
Bar
CaMV-Ter
LB
B

도면3

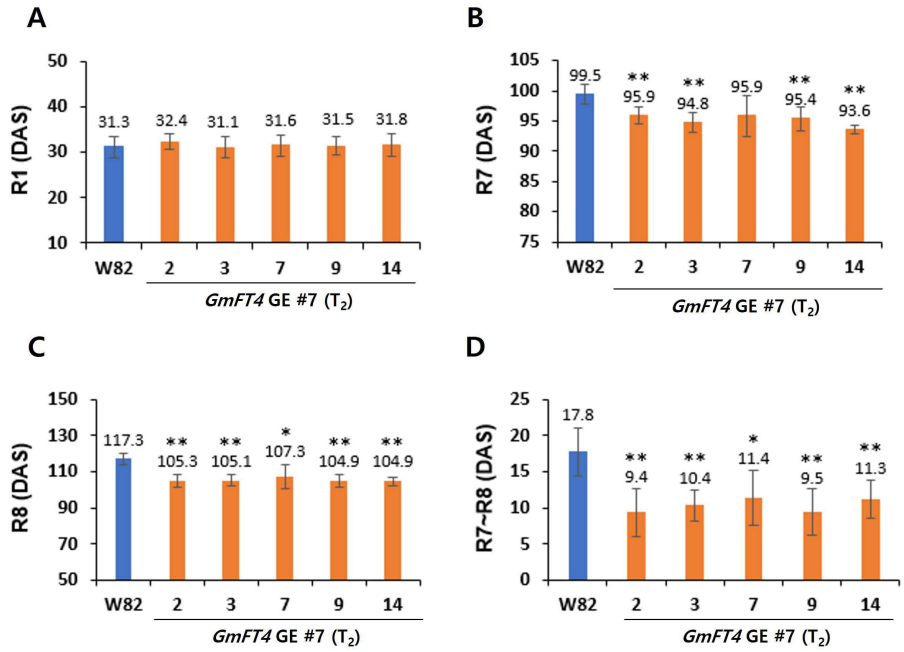

GmFT4 GE #7 (T1)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 WT
Bar PCR
WT 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
1st PCR
2nd PCR
3rd PCR
WT (531bp)
Editing (282bp)

도면4

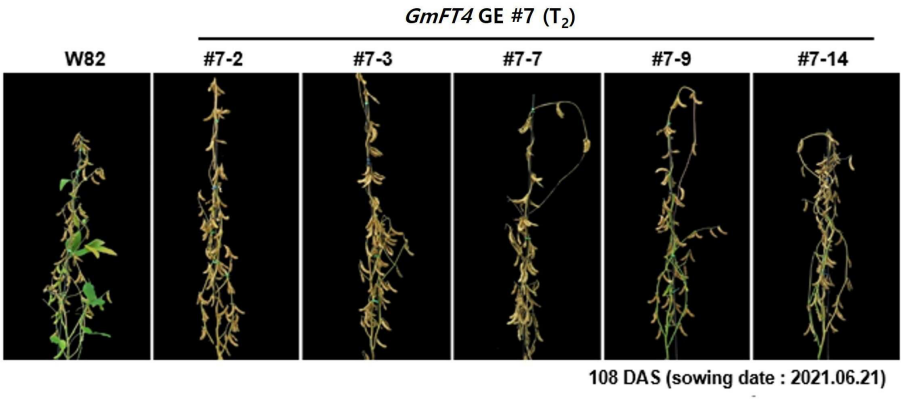

A
Target1
PAM
gRNA 1
185bp
Target2
PAM
gRNA 2
Deletion Bases(bp)
WT TGAGTTCAAACCTTCCCAAATCGTCAACAAACCAAGAATTAA CCAAGTGACCCACATATGAAGGAATATTTGCATTGGTGAGT
GmFT4 GE #7 (T1)
#7-1 TGAGTTCAAACCTTCC----------CATATGAAGGAATATTTGCATTGGTGAGT 224
#7-2 TGAGTTCAAACCTTCC----------TATGAAGGAATATTTGCATTGGTGAGT 226
#7-3 TGAGTTCAAACCTTCC----------TATGAAGGAATATTTGCATTGGTGAGT 226
#7-7 TGAGTTCAAACCTTCC----------TATGAAGGAATATTTGCATTGGTGAGT 226
#7-9 TGAGTTCAAACCTTCC----------TATGAAGGAATATTTGCATTGGTGAGT 226
#7-14 TGAGTTCAAACCTTCC----------TATGAAGGAATATTTGCATTGGTGAGT 226

B
WT MPISMDPLVLGRIIGDILDPFTSSVSLRVVYNNQSSVINSCEFKPSQIVNKPRINIRGNDLGIFYTLIMVNPDAPSPSDPHMKEYLHW
GmFT4 GE #7 (T1) MPISMDPLVLGRIIGDILDPFTSSVSLRVVYNNQSSVINSCEFKPSYEGIFALVGNQYSSIYRGNHWRRDCGV*
WT TGEEIVEYESPRPTSGIHRIAFVLFRQFDRQIVHAPRWRQNFNTRDFAEVYNLGSPVAAVYFNCQREGGWGGRRR*
GmFT4 GE #7 (T1)

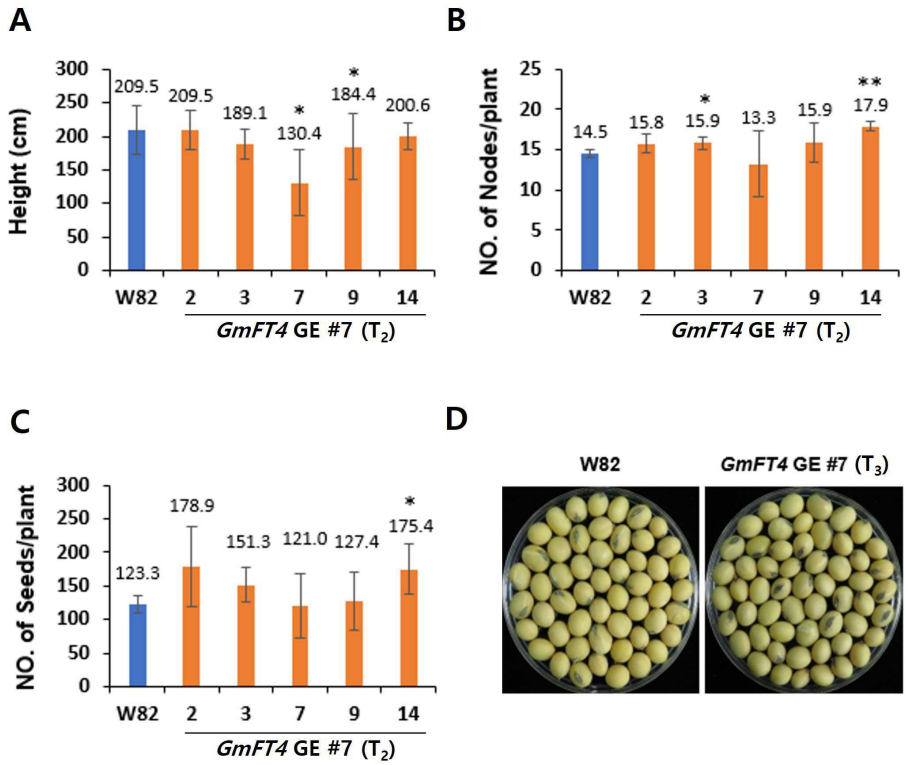
도면5


A
R1 (DAS)
31.3
32.4
31.1
31.6
31.5
31.8
W82
2
3
7
9
14
GmFT4 GE #7 (T2)
B
R7 (DAS)
99.5
95.9
94.8
95.9
95.4
93.6
C
R8 (DAS)
117.3
105.3
105.1
107.3
104.9
104.9
D
R7~R8 (DAS)
17.8
9.4
10.4
11.4
9.5
11.3

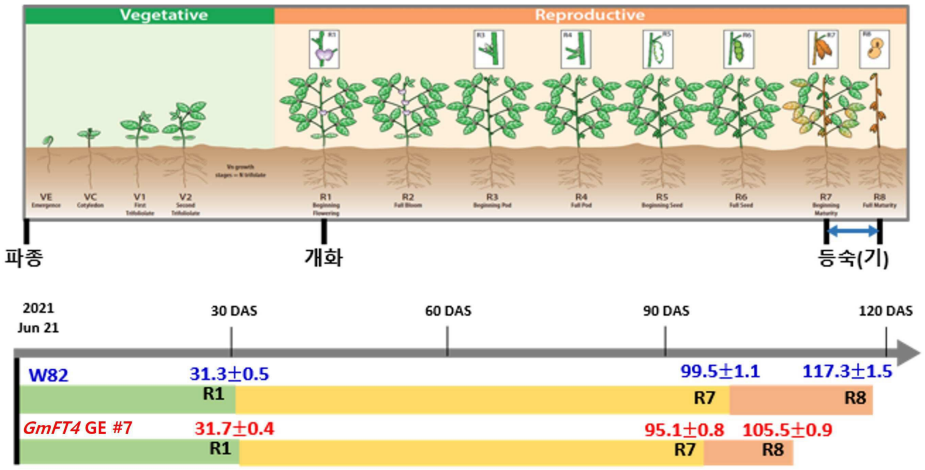
도면6


GmFT4 GE #7 (T2)
W82
#7-2
#7-3
#7-7
#7-9
#7-14
108 DAS (sowing date : 2021.06.21)

도면7


A
Height (cm)
300
250
200
150
100
50
0
209.5
209.5
189.1
130.4
184.4
200.6
W82
2
3
7
9
14
GmFT4 GE #7 (T2)
B
NO. of Nodes/plant
25
20
15
10
5
0
14.5
15.8
15.9
13.3
15.9
17.9
W82
2
3
7
9
14
GmFT4 GE #7 (T2)
C
NO. of Seeds/plant
300
250
200
150
100
50
0
123.3
178.9
151.3
121.0
127.4
175.4
W82
2
3
7
9
14
GmFT4 GE #7 (T2)
D
W82
GmFT4 GE #7 (T3)

도면8


Vegetative
Reproductive
VE
VC
V1
V2
R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
파종
개화
등숙(기)
2021
Jun 21
30 DAS
60 DAS
90 DAS
120 DAS
W82
31.3±0.5
99.5±1.1
117.3±1.5
R1
R7
R8
GmFT4 GE #7
31.7±0.4
95.1±0.8
105.5±0.9
R1
R7
R8

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.