(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2011 년 7 월 28 일 (28.07.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/090272 A9

(51) 국제특허분류:
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2010/009447

(22) 국제출원일: 2010 년 12 월 28 일 (28.12.2010)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2010-0005803 2010 년 1 월 22 일 (22.01.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY)** [KR/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **한창덕 (HAN, Chang Deok)** [KR/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 경상대학교 식물분자생물학 및 유전자조작 연구소, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR). **최양도 (CHOI, Yang Do)** [KR/KR]; 서울특별시 서초구 잠원동 신반포아파트 301 동 907 호, 137-030 Seoul (KR).

(74) 대리인: **최규환 (CHOI, Kyu Whan)**; 대전광역시 서구 둔산동 949 번지 12 층 그린국제특허법률사무소, 302-120 Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

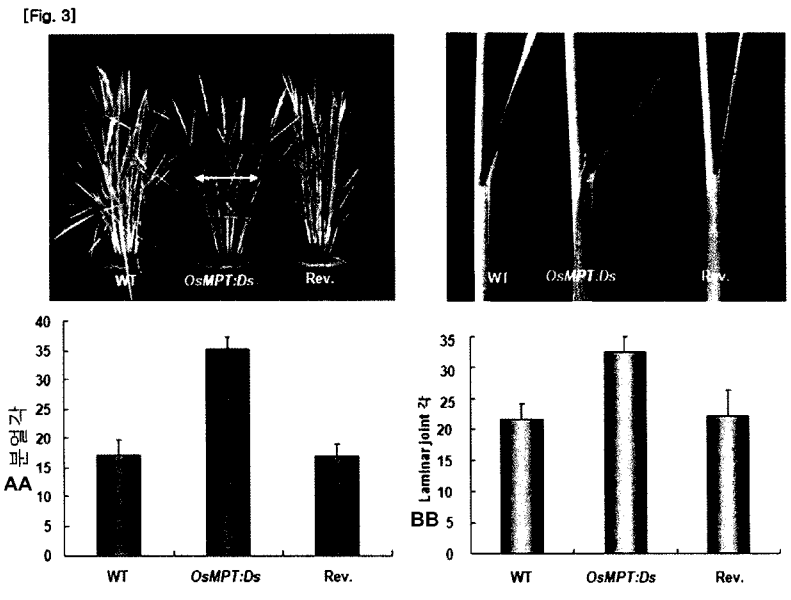
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: OsMPT GENE MODIFYING PLANT ARCHITECTURE (PLANT SHAPE) AND INCREASING YIELD, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭** : 식물의 외형(초형)을 변화시키고 수확량을 증가시키는 OsMPT 유전자 및 이의 용도

[Fig. 3]



AA Tillering angle
BB Laminar joint angle

(57) **Abstract**: The present invention relates to a rice (*Oryza sativa*)-induced *Oryza sativa* modifier of plant type (OsMPT) protein which is involved in adjusting tillering angle or angle of attachment between a leaf and a stem, a gene encoding the protein, a recombinant plant expression vector including the gene, a plant transformed by the recombinant plant expression vector, a method for modifying architectures of plants by adjusting the level of the gene in the cells thereof, to a method for manufacturing an architecturally modified plant transformed by the gene, to a plant with increased yield which is manufactured by the method, and to a composition containing the gene for modifying the architectures of plants and increasing the yield thereof.

(57) **요약서**: 본 발명은 분얼각의 조절 또는 잎의 줄기에 부착되는 각의 조절에 관여하는 벼 (*Oryza sativa*) 유래의 OsMPT (*Oryza sativa* Modifier of Plant Type) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터, 상기 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체, 상기 유전자의 세포 내 수준(level)을 조절하여 식물의 외형(architectures)을 변화시키는 방법, 상기 유전자로 식물을 형질전환하여 외형이 변화된 식물 및 수확량이 증가된 식물의 제조방법, 상기 방법에 의해 제조된 수확량이 증가된 식물, 및 상기 유전자를 포함하는 식물의 외형을 변화시키고 수확량을 증가시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

WO 2011/090272 A9

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(48) 본 정정판 공개일: 2011 년 10 월 20 일

(15) 정정사항에 관한 정보:
2011 년 10 월 20 일 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 식물의 외형(초형)을 변화시키고 수확량을 증가시키는 OsMPT 유전자 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 식물의 외형을 변화시키고 수확량을 증가시키는 벼 (*Oryza sativa*) 유래의 OsMPT 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 OsMPT유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터, 상기 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체, 상기 유전자의 세포 내 수준(level)을 조절하여 식물의 외형(architectures)을 변화시키고 수확량을 증가시키는 방법, 상기 유전자로 식물을 형질전환하여 외형이 변화된 식물 및 수확량이 증가된 식물의 제조방법, 및 상기 유전자를 포함하는 식물의 외형을 변화시키고 수확량을 증가시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 벼 (*Oryza sativa*)는 가장 중요한 식량작물이며 세계 인구의 3분의 1 이상의 일차적인 식량원이다. 벼 소비의 급격한 증가로 인하여 보다 증가된 벼 수확량이 요구되고 있다. 따라서, 보다 증가된 생산 능력 및 안정성을 갖는 벼 품종 생산이 요구된다 [Khush 1997, *Plant Mol. Biol.* 35, 25-34]. 식물의 외형(architectures)이라 하는 식물체 지상부의 구조는 생산성에 중요한 영향을 미친다. 특히, 분얼각은 벼의 외형(architecture)을 결정짓는 중요 특성으로, 보다 넓은 분얼각은 잎으로 인한 그늘을 증가시키며 반면, 보다 좁은 분얼각은 밀식에 유리하다. 따라서, 상대적으로 효과적인 고수확 재배를 가능하게 하는 직립 생장형(좁은 분얼각)이 표적이 되어, 고대인에 의해 지속적으로 선발되어 왔다. 그러나, 오늘날까지, 직립 생장에 관한 분자적 및 유전적 조절 기작은 미지의 상태로 남아있다.

[3] 비록 식물의 외형(architectures)이 환경요인의 영향을 받기는 하지만, 유전적 조절 기작이 식물체 생장형의 조절에 중요한 역할을 한다. 벼 분얼각의 직접적인 조절에 관여하는 유전자들이 알려져 왔다. *PROG1* (*PROSTRATE GROWTH 1*)은 하나의 C2H2 징크 핑거 단백질을 암호화하며, *prog1* 변이체는 *prog1* 기능의 상실로 인해 직립 생장형, 더욱 많은 알곡 수 및 더욱 높은 알곡 수확량의 벼가 되게 한다 [Tan 등 2008, *Nat. Genet.* 40, 1360-1364]. *TAC1* (*Tiller Angle Control1*)의 돌연변이로 인해 극단적으로 직립한 분얼을 갖는, 밀집한 식물체가 된다 [Yu 등 2007,*Plant J.* 52, 891-898]. *LAZY1*, *TAC1* 및 *PROG1*은 엽초 엽침(leaf sheath pulvinus), 분얼 기저부 및 엽신과 엽초의 접합부 (laminar joint)에서 강력하게 발현된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[4] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 *Ds*

트랜스포존 돌연변이체 집단(pool)로부터 OsMPT 돌연변이체의 동정 및 연구와 아울러, OsMPT 과발현체 제조로 OsMPT유전자의 역할을 알아보고, 상기 유전자를 이용하여 식물의 외형을 변화시키는 방법 및 수확량을 증가시키는 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[5] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 벼 (*Oryza sativa*) 유래의 OsMPT (*Oryza sativa* Modifier of Plant Type) 단백질을 제공한다.

[6] 본 발명은 또한, OsMPT 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[7] 또한, 본 발명은 OsMPT유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.

[8] 또한, 본 발명은 상기 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.

[9] 또한, 본 발명은 OsMPT 폴리펩티드의 세포 내 수준(level)을 조절하여 식물의 외형을 변화시키는 방법을 제공한다.

[10] 또한, 본 발명은 OsMPT 유전자로 식물을 형질전환하여 외형이 변화된 식물의 제조방법을 제공한다.

[11] 또한, 본 발명은 OsMPT유전자를 포함하는 식물의 외형을 변화시키기 위한 조성물을 제공한다.

[12] 또한, 본 발명은 OsMPT 유전자로 식물을 형질전환하여 수확량이 증가된 식물의 제조방법을 제공한다.

[13] 또한, 본 발명은 방법에 의해 제조된 수확량이 증가된 식물을 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 OsMPT유전자를 포함하는 식물의 수확량을 증가시키기 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[15] 본 발명에서는, OsMPT 단백질의 세포 내 수준을 조절하거나, OsMPT 유전자로 식물을 형질전환하여 식물의 외형을 변화시키는 방법을 제공하며, 이러한 방법으로 분얼각 또는 잎의 줄기에 부착되는 각이 변형된 이형식물의 제조가 가능하며, 특히 상기 이형식물은 고수확량을 내는 식물이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 OsMPT 및 아라비돕시스 SGR5의 아미노산 서열의 정렬(Alignment)을 보여준다. 동일한 아미노산은 검은 상자로, 유사한 아미노산은 회색 상자로 표시하였다. 핵 위치 신호로 추정되는 서열, 징크 핑거 도메인, 및 coiled coil 도메인에는 밑줄을 쳐서 표시하였다. OsMPT는 아미노산 수준에서 SGR5와 42% 동일성 및 54% 유사성을 가진다. 상기 두 유전자는 첫째와 둘째 징크 핑거 간의 22 개 아미노산을 제외하고 84% 동일성을 가진다.

[17] 도 2는 *Ds* 삽입 대립인자의 게놈 구조 및 *OsMPT::Ds*와 그 복귀 정상체(rev.)의 발현을 보여준다. 복귀 정상체 대립인자는 원래 부위 (*Ori. Ds*)에 *Ds*를 재이동시킴으로써 얻었다. 원래의 삽입 변이체와 그 복귀 정상체에 대해 OsMPT 발현을 조사하였다.

[18] 도 3은 비형질전환 대조계통 (WT: 좌측), *OsMPT::Ds* (가운데), 및 복귀 정상체 (Rev.: 우측)의 분얼 및 laminar joint (엽신과 엽초의 접합부) 각도를 보여준다. 분얼각은 주축으로부터 가장 외측의 분얼까지 측정되었다. Laminar joint 각도는 줄기로부터 엽신의 가장 하부까지 측정되었다.

[19] 도 4는 OsMPT 과발현체(OX)의 직립형 식물체를 보여준다. 과발현체는 분얼 및 laminar joints의 각도를 줄임으로써 직립성의 식물체로 된다. 상기 각의 정도는 OsMPT mRNA의 수준에 의존적이다. 하부의 노던 블럿(Northern blot) 분석은 각 OsMPT 과발현체(OX) 라인의 발현 수준을 보여준다.

[20] 도 5는 BR 돌연변이체(*d11-1, d61-1*) 및 OsMPT 과발현체(OX)를 보여준다. BR 돌연변이체 및 OsMPT 과발현체는 비슷한 직립형 식물체를 보인다. CYP724B1 또는 DWARF4L로 명명된 *d11*은 BR 합성 경로에서 (6-deoxo) 3-dehydroteasterone) → (6-deoxo) typhasterol 단계를 촉매한다. *d61-1*은 BR-수용체 키나아제인 벼 *bri1* 상동체의 약한 대립인자이다.

[21] 도 6은 OsMPT 및 BR 신호 (*d61-1*) 또는 합성 (*d11-1*) 돌연변이체 간의 이중 돌연변이체의 표현형을 비교한 것이다. 성숙한 식물체는 OsMPT및 *d61-1* 또는 *d11-1*간의 교배로부터 분리한 것이다.

[22] 도 7은 OsMPT를 사용한 직립형 식물체를 보여준다. OsMPT 과발현 라인(OX)들 중에서, 밀식 시에 잠재적인 고수확 잠재성을 가질 수 있는 식물체가 선발되었다. 동진은 우량 야포니카(Japonica) 벼 변종이다.

[23] 도 8은 포장에서의 OsMPT 과발현 계통 (재식 후 약 2개월)을 보여준다. (a) 및 (c)는 표준 재식거리 (30x15cm)로 재배한 동진벼(WT: 비형질전환 대조계통)와 OsMPT 과발현 계통(OX 19)을 나란히 보여준다. (c)의 붉은 수직 점선은 WT와 OX 19 간의 경계를 표시한다. (b) 및 (d)는 밀식 재배 (15x15cm)한 동진벼와 OsMPT 과발현 계통(OX 14)을 보여준다. (a) 및 (b)는 작물보다 높은 위치에서 찍은 사진이며 (c) 및 (d)는 작물과 비슷한 위치에서 찍은 사진이다.

[24] 도 9는 형질전환 식물의 표현형 평가의 결과를 보여준다. 과발현체 라인의 모든 데이터를 비형질전환 대조계통(WT)으로 나누어, 표 1에 제시된 백분율로 전환하였다. 선 (100%) 상부는 비형질전환 대조계통(WT)보다 높은 값을, 하부는 비형질전환 대조계통(WT)보다 낮은 값을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[25] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 벼 (*Oryza sativa*) 유래의 OsMPT (*Oryza sativa* Modifier of Plant Type) 단백질을 제공한다.

[26] 본 발명에 따른 OsMPT 단백질의 범위는 벼 (*Oryza sativa*)로부터 분리된 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상,

바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

[27] 또한, 본 발명은 상기 OsMPT 단백질을 암호화하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 유전자는 OsMPT 단백질을 코딩하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 2로 표시되는 cDNA 염기서열 및 서열번호 3으로 표시되는 게놈 DNA 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.
폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[28] 본 발명의 OsMPT 유전자는 엽침(pulvinus) 특이적으로 발현된다.

[29] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 OsMPT 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다. 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터에서, 상기 OsMPT유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어질 수 있다.

[30] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[31] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[32] 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을

전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에서 바람직한 바이너리 벡터는 pGA1611일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[33] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[34] 본 발명의 재조합 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다. 더욱 바람직하게는, Ubiquitin 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[35] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[36] 본 발명은 또한, 본 발명의 식물 발현 재조합 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다. 본 발명의 벡터를 원핵세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E.*

coli X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다. 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모 (*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이며, 더욱 바람직하게는 벼 (*Oryza sativa*)이며, 가장 바람직하게는 동진벼일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[37] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[38] 본 발명은 또한, OsMPT 폴리펩티드의 세포 내 수준(level)을 조절하여 식물의 외형(architectures)을 변화시키는 방법을 제공한다.

[39] 본 발명의 OsMPT 폴리펩티드는 식물의 엽침(pulvinus) 조직에 특이적으로 발현되며, 분얼각의 조절 또는 잎의 줄기에 부착되는 각의 조절에 관여하는 것으로, 상기 OsMPT의 기능은 본 발명자들에 의해 최초로 밝혀진 것이다. OsMPT는 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다. 한편, 상기 폴리펩티드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에 대해 기능적 동등물일 수 있다. 상기 "기능적 동등물"에 대해서는 상기에 언급된 바와 같은 것으로, 본 발명의 OsMPT와 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 폴리펩티드를 말한다. 여기서, 실질적으로 동질의 활성'이란 식물의 외형의 결정에 관여하는 것을 의미한다. 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 중 일부가 치환되거나, 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산 (Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산 (Asp, Glu), 염기성 아미노산 (His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산 (Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 본 발명의 OsMPT의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

[40] 또한, 상기 기능적 동등물의 범위에는 OsMPT의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 폴리펩티드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩티드 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경 및 생리활성을 유지하면서 다른 단백질과 융합으로 만들어진 융합단백질 등이 이에 포함된다.

[41] 본 발명에서 식물의 외형이란 식물의 외부 구조 또는 모양을 나타내며, 잎, 줄기, 뿌리, 꽃 등 식물의 조직 또는 기관이 가지고 있는 각각의 모양 및 이들이

조합되어 가지는 전체적인 모양을 나타내며, 바람직하게는, 분얼각, laminar joint의 각 또는 잎의 줄기에 부착되는 각을 나타내나, 이에 제한되지 않는다.

[42] 본 발명에서는 서열번호 1 또는 이의 기능적 동등물의 세포 내 수준(level)에 따라 주로 상기 조직 및 기관의 일부분 또는 전체의 길이 및 폭이 변화되므로, 본 발명에서의 식물 외형의 변화는 주로 엽침(pulvinus) 조직의 부분 또는 전체의 변화에 따른 것을 나타낸다.

[43] 상기 세포 내 수준이란 세포 내에 존재하는 양을 말하는 것으로, 이는 당업자에게 공지된 여러 방법으로 조절될 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나, 세포 내 수준은 전사 단계에서의 조절 또는 전사 후 단계에서의 조절을 통해 조절될 수 있다. 전사 단계에서의 조절은 당업자에게 공지된 유전자의 발현을 증진시키기 위한 방법, 예를 들면, 프로모터에 서열번호 1 또는 서열번호 1에 대한 기능적 동등물을 암호화하는 유전자를 연결한 재조합 발현벡터를 제조하여 상기 유전자의 발현을 증진시키는 방법 또는 서열번호 1 또는 서열번호 1에 대한 기능적 동등물을 암호화하는 유전자의 주변에 상기 유전자의 발현이 증진되도록 하는 발현조절서열을 삽입하는 방법, 또는 유전자의 발현을 억제하기 위한 방법, 예를 들면 프로모터 또는 유전자 부위의 돌연변이를 유도하여 프로모터 활성 또는 단백질의 기능을 저해하는 방법, 안티센스(antisense) 유전자를 발현시키는 방법, RNAi 또는마이크로RNA(microRNA) 방법 등에 의해 수행될 수 있다.

[44] 전사 후 단계에서의 조절은 당업자에게 공지된 단백질 발현을 증진 또는 저해시키기 위한 방법, 예를 들면, 서열번호 1 또는 서열번호 1에 대한 기능적 동등물을 암호화하는 유전자를 주형으로 전사된 mRNA의 안정성을 증진 또는 저해하는 방법, 단백질 또는 폴리펩티드의 안정성을 증진 또는 저해하는 방법 또는 단백질 또는 폴리펩티드의 활성을 증진 또는 저해하는 방법에 의해 수행될 수 있다.

[45] 상기 방법의 보다 구체적인 예로 1군 인트론 타입, M1 RNA 타입, 망치머리(hammerhead) 형, 또는 머리핀(hairpin) 형 또는 마이크로 RNA 형 등의 전사된 mRNA에 작용하는 RNA를 암호화하는 DNA 서열로 형질전환하거나, 표적 유전자 서열과 동일 또는 유사한 서열을 가지는 DNA의 형질전환을 통한 동시억제(cosuppression)를 유도할 수 있다.

[46] 바람직하게는, 본 발명에서 서열번호 1의 폴리펩티드 또는 이와 동등물의 세포 내 수준을 조절하는 것은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가 또는 감소시키는 방법에 의해 수행될 수 있으며, 바람직하게는 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가시키는 것이다. 이러한 증가 또는 감소시키는 방법은 각각 당업자에게 공지된 방법을 사용할 수 있으나, 예를 들면, 프로모터에 서열번호 1의 폴리펩티드 또는 이와 동등물을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 연결한 재조합 발현벡터를 제조하여 그 발현을 증진시키거나, 프로모터에 상기 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스

폴리뉴클레오티드를 연결한 재조합 발현벡터를 제조하여 그 발현을 감소시킬 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.

[47] 상기 식물은 벼, 밀, 보리, 귀리, 호밀, 잔디, 죽순, 옥수수, 사탕수수, 기장, 토란, 아스파라거스, 양파, 마늘, 파, 부추, 달래, 마, 생강, 콩, 또는 유채와 같은 피자식물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 벼이며, 더욱 바람직하게는 동진벼이다. 상기 식물에서 OsMPT 단백질의 발현이 변화되어 영향을 받는 조직은 엽침일 수 있다.

[48] 본 발명은 또한, OsMPT 또는 이와 기능적 동등물을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 식물을 형질전환하는 단계를 포함하는 외형(architectures)이 변화된 식물의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 외형이 변화된 식물을 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다. 식물의 형질전환은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있으며, 바람직하게는 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법, 미세사출법(microprojectile bombardment), 일렉트로포레이션(electroporation), PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포좀 매개법(liposome-mediated method), 인-플란타 형질전환법(In planta transformation), 진공 침윤법(Vacuum infiltration method), 화아침지법(floral meristem dipping method), 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method)를 이용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법을 이용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 아그로박테리움 균주 'LBA4404'를 이용한 형질전환방법을 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[49] 이때 상기 폴리뉴클레오티드는 형질전환된 식물에서 발현될 수 있도록 프로모터에 작동가능하게 연결된 상태, 예를 들면 프로모터와 작동가능하게 연결된 재조합 식물 발현벡터의 형태일 수 있다.'작동 가능하게 연결된다(operably linked)'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말하며, 상기 프로모터 및 재조합 발현벡터는 상기 언급된 바와 같다.

[50] 형질전환된 식물세포는 액체 배양물, 캘러스, 원형질 배양물이 될 수 있으며, 분화되어 식물의 조직 또는 식물이 될 수 있다. 식물세포의 배양은 식물의 일부를 모체로부터 분리하여 적당한 조건 아래에서 무균적으로 배양하여 생육시키는 것으로 조직 절편의 액체 배양, 조직 절편의 캘러스 배양, 원형질체 배양 등 당업자에게 공지된 어떠한 방식의 것에 의할 수 있으며, 그 배양 조건 및 방법은 당업자에게 공지된 조건 및 방법에 의해 수행될 수 있다. 상기 배양된 식물세포를 식물로 분화시키는 것은 캘러스, 원형질체 형태의 배양된 식물세포를 적당한 조건에서 분화를 유도하여 식물의 조직 또는 식물로 분화시키는 것으로 그 분화 조건 및 방법은 당업자에게 공지된 조건 및 방법에

의해 수행될 수 있다.

[51] 상기 식물은 벼, 밀, 보리, 귀리, 호밀, 잔디, 죽순, 옥수수, 사탕수수, 기장, 토란, 아스파라거스, 양파, 마늘, 파, 부추, 달래, 마, 생강, 콩 또는 유채와 같은 피자식물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 벼이며, 더욱 바람직하게는 동진벼이다.

[52] 본 발명은 또한, 엽침에 특이적으로 발현되어 분얼각의 조절, laminar joint의 각의 조절 또는 잎의 줄기에 부착되는 각의 조절에 관여하는 OsMPT 유전자를 포함하는 식물의 외형을 변화시키기 위한 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물에서, 상기 OsMPT 유전자는 바람직하게는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어질 수 있다. 본 발명의 조성물에서, 상기 OsMPT 유전자는 OsMPT 유전자 서열에서 특정 염기서열의 삽입, 치환, 결실된 것을 포함할 수 있다.

[53] 본 발명은 또한, OsMPT 유전자로 식물을 형질전환하는 단계를 포함하는 수확량이 증가된 식물의 제조방법을 제공한다.

[54] 상기 용어 "수확량"은 경제적 가치 있는 측정 가능한 생산량을 말하며, 전형적으로 특정 작물, 면적, 및 기간에 관련이 있다. 개개 식물체 부분이 직접적으로 수, 크기 및/또는 중량에 근거한 수확량에 기여하거나, 또는 실제 수확량은 작물 에이커 및 년 당 수확량이고, 이는 총생산량 (수확된 및 평가된 생산량을 포함)을 재배된 에이커로 나눔으로써 결정된다. 식물의 "수확량"은 식물체의 영양조직 생물량 (뿌리 및/또는 어린 줄기 생물량), 생식 기관, 및/또는 번식체 (예를 들면, 종자)에 관련될 수 있다.

[55] 벼를 예로 들면, 수확량 증가는 다음 중의 하나 이상으로 표시된다: 헥타르 또는 에이커 당 식물체의 수 증가; 식물체 당 이삭 (열매) 수의 증가; 낱알 줄의 수, 줄 당 낱알의 수, 낱알 중량, 천립중량, 열매 길이/직경의 증가; 종자 임실율 (충전된 종자 수/전체 종자 수 x100)의 증가.

[56] 상기 용어 "증가"는 "향상" 또는 "강화"와 서로 호환성 있게 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 대조구 식물과 비교하여 적어도 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10%, 바람직하게는 적어도 15% 또는 20%, 더욱 바람직하게는 25%, 30%, 35% 또는 40% 이상의 수확량 및/또는 생장을 의미한다.

[57] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 수확량이 증가된 식물을 제공한다.

[58] 상기 식물은 벼, 밀, 보리, 귀리, 호밀, 잔디, 죽순, 옥수수, 사탕수수, 기장, 토란, 아스파라거스, 양파, 마늘, 파, 부추, 달래, 마, 생강, 콩 또는 유채로 이루어진 피자식물에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 벼이며, 더욱 바람직하게는 동진벼이다.

[59] 본 발명은 또한, OsMPT 유전자를 포함하는 식물의 수확량을 증가시키기 위한 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물에서, 상기 OsMPT 유전자는 바람직하게는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어질 수 있다. 본 발명의 조성물에서, 상기 OsMPT 유전자는 OsMPT 유전자 서열에서 특정 염기서열의

삽입, 치환, 결실된 것을 포함할 수 있다.

[60]

[61] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[62] **실험방법**

[63] **1. 식물 재료 및 생장 조건**

[64] 동진벼가 야생형 대조구로 사용되었다. *Ds* 트랜스포존 돌연변이체 집단(pool)이 OsMPT 돌연변이체 분리에 사용되었다. 본 발명에 사용한 BR 변이체중 *d61-1* 돌연변이체는 일본 나고야 대학교의 마쭈오까(Matsuoka) 교수님으로부터, *d11-1* 및 *d2-2* 돌연변이체는 서울대학교의 고희종 교수님으로부터 얻었다. 식물은 6월부터 10월까지 한국의 논에서 키웠으며, 생장상(growth chamber)에서는 26℃에서, 16 시간 명소/8 시간 암소의 광주기에서 키웠다.

[65]

[66] **2. 돌연변이체 및 복귀 정상체 분리**

[67] 벼 엽침(pulvinus) 특이적 유전자는 OsMPT 유전자의 *Ds* 삽입체로부터 동정되었다. *Ds* 삽입 부위 인접영역의 서열분석은 OsMPT의 두 번째 엑손 내 세 번째 C2H2 징크 핑거 모티프에 트랜스포존이 삽입되었음을 나타낸다 (도 2). 유전자 특이적 프라이머를 사용한 RT-PCR은 전사물이 돌연변이체에서는 발현되지 않음을 나타낸다 (도 2). 다른 돌연변이체 대립인자 및 복귀 정상체 대립인자를 얻기 위해, *Ac*를 포함하는 OsMPT (OsMPT:*Ds*) 세대가 조직배양을 통해 재분화과정에 사용되었다. OsMPT유전자 좌위에 새로운 11 개의 transposed *Ds* 삽입 돌연변이체, 복귀 정상체는 재생된 식물로부터 분리되었다 (도 2).

[68]

[69] **3. OsMPT cDNA 클로닝**

[70] 전장 OsMPT cDNA는 Race PCR 및 RT-PCR에 의해 분리되었다. UTR (비해독 구간)을 포함하는 5' 및 3' 말단은 Race PCR에 의해 클로닝되었으며, 다른 부위는 RT-PCR에 의해 증폭되었다. 사용된 프라이머쌍은 하기와 같다: 5' Race-PCR에 대해 5'-acctgtccgactccagcagcgtcctcg-3' (서열번호 4); 3' Race-PCR에 대해 5'-gtacaacttgtacgttcacgtgtgta-3' (서열번호 5); RT-PCR에 대해 5'-cggcatcaagaagcacttc-3' (서열번호 6) 및 5'-ggatgatggtgatgatgccgca-3' (서열번호 7). Race-PCR cDNA는 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA)를 사용하여 합성되었다. RT-PCR cDNA는 SAM 주변 조직의 RNA로 Superscript II 역전사효소 (Invitrogen, USA)를 사용하여 제조되었다.

[71]

[72] **4. 과발현 형질전환체 생산**

[73] OsMPT 과발현 형질전환체 생산을 위해, 구성적 유비퀴틴(*Ubiquitin*)

프로모터가 바이너리 벡터 pGA1611로 클로닝에 의해 *OsMPT* 전장 cDNA와 융합되었다. 상기 구축물은 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 균주 'LBA4404'로 형질전환되어, 동진벼의 캘러스로 도입되었고, 형질전환체가 생성되었다.

[74]

[75] **5. RNA 정량**

[76] 총 세포 RNA는 TRIZOL reagent (MRC, http://www.mrcgene.com/) 또는 RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, http://www.qiagen.com/)를 사용하여 분리되었다. 정량적 RT-PCR을 위해, 제 1 가닥 cDNA는 MMLV (Moloney murine leukemia virus) 역전사효소 RNaseH (Toyobo, http://www.toyobo.co.jp/e/)를 사용하여 제조사의 지침에 따라, DNase 처리된 RNA 및 Oligo dT 12-18 프라이머 (Invitrogen, http://www.invitr-ogen.com/)를 포함하는 25 ㎕ 반응혼합물 내에서 합성되었다. 상기 반응물 (1 ㎕)이 PCR 증폭에 사용되었다. ACT1 mRNA (actin1)가 cDNA 정량을 위한 표준물질로 사용되었다. 사용된 프라이머쌍은 하기와 같다: ACT1 [McElroy 등 1990, *Plant Mol. Biol.* 14: 163-171]에 대해 5'-CGAGGCGCAGTCCAAGAG-3' (서열번호 8) 및 5'-CCCAGTTGCTGACGATACCA-3' (서열번호 9); OsMPT에 대해 5'-CGGCATCAAGAAGCACTTC-3' (서열번호 10) 및 5'-ggatgatggtgatgatgccgca-3' (서열번호 11). 반응은 95℃에서 5분간의 초기 변성에 이어 94℃에서 15초간, 60℃에서 30초간, 및 72℃에서 40초간으로 구성된다. 각 증폭에 사용된 사이클 횟수는 하기와 같다: ACT1, 25 사이클; OsMPT, 32 또는 35 사이클. 증폭된 PCR 산물은 1.5% 아가로즈 겔 상에서 분리되었다.

[77]

[78] **6. 표현형 분석**

[79] **6-1. 표현형 분석 준비**

[80] OsMPT 과발현체의 야외 포장에서의 성능을 조사하였다. 두 형질전환 라인 (OX14 및 OX19)을 선발하여 증식시켰다. 포장실험을 위해, 두 개의 독립적인 형질전환체 (OX14 및 OX19) 각각의 두 라인을 비형질전환 대조계통 (WT(OX14) 및 WT(OX19))과 나란히 재식하였다. 형질전환 후 다음 세대에서 T-DNA가 있는 것과 없는 것이 분리되어 나오게 되며, T-DNA가 있는 계통은 OX14 또는 OX19, T-DNA를 가지고 있지 않은 계통은 WT(OX14) 또는 WT(OX19)로 표시하였다. 총 6 라인을 두 가지 다른 재식밀도 (30x15 cm (23.3 plants/m^2) 및 15x15 cm (46.7 plants/m^2)로 재식하여 시험하였다. 밀양 소재, 농촌진흥청 GMO 시험포장에서 식물체를 키웠다. 농촌진흥청의 벼 표준재배법에 따라 재배 및 관리하였다. 각 실험구(plot)는 2x1.5 m 크기였으며, 확률화블록 (randomized blocks)으로 2회 반복 실험하였다. 각 실험구에서, 총 70 및 140 개체의 식물을 각각 표준밀도 및 고밀도로 재식하였다. 가장자리 식물체를 제외하고, 이웃해 있는 3 개체를 각 실험구로부터 수확하였다. 표준 재식거리로 재배한 OX19의 비형질전환 대조계통(WT(OX19))은 도복(lodging)으로 인하여 소실되어 배제되었다.

[81]

[82] **6-2. 포장에서 OsMPT 과발현 계통의 생장형 관찰**

[83] 야외 포장의 군락 상태에서 OsMPT 과발현 계통의 생장형 및 표현형 발현을 검증하기 위하여, GMO 포장에서 두 가지의 재식밀도, 즉 표준 재식거리 (30x15 cm) 및 밀식 재식거리 (15x15 cm)에서 재배하여 관찰하였다.

[84]

[85] **6-3. 매개변수 측정**

[86] 표준밀도 포장 및 고밀도 포장 각각으로부터, 이웃한 열에서 약 30 개체 및 60 개체의 식물체를 수확하였다. 그러나, 표준 재식거리로 재배한 OX19의 비형질전환 대조계통(WT(OX19))은 상기 두 포장에서 도복(lodging)으로 인하여 소실되었다. 하기의 수확 관련 인자를 측정하였다: 간장(culm length), 수장(panicle length), 식물체 당 원추화서의 수(number of panicles per plant), 총 소수의 수(total number of spikelets) , 총 임성 종자의 수(total number of fertile seeds), 총 입중(total grain weight).

[87]

[88] **실시예 1. OsMPT는 징크 핑거 모티프를 가진 단백질을 암호화한다**

[89] OsMPT는 4 개의 징크 핑거 (C2H2 C2H2 C2HC C2HC) 모티프를 가진 핵 단백질을 암호화한다. 이 모티프는 이미 발표된 옥수수 화기 조절 유전자 "*Id1* (Indeterminate1)"이 가지고 있는 징크 핑거 모티프와 유사하다 (Colasanti 등 2006, *BMC Genomics* 7, 158).

[90]

[91] **실시예 2. *OsMPT* 는 중력 반응에 관여하는 아라비돕시스(Arabidopsis) *SGR5* 의 기능적인 상동체(orthologue)이다**

[92] 아라비돕시스 *SGR5* (Shoot Gravity Response 5)는 중력 반응에 관여되는 것으로 보고되었다 (Morita 등 2006, *Plant J.* 47, 619-628). OsMPT는 아미노산 수준에서 SGR5와 42%의 동일성 및 54%의 유사성을 갖는다 (도 1). 현재, OsMPT의 중력 반응에 관한 하기 데이터를 보고하기 위해 준비 중이다: OsMPT의 후생목부, 엽침 (화본과의 중력 인지 기관) 및 laminar joints (엽신과 엽초의 접합부)에서의 특이적 발현. 돌연변이체는 굴중성의 극심한 감소를 보였다. OsMPT의 과발현체는 향상된 굴중성 반응을 보인다.

[93]

[94] **실시예 3. OsMPT 돌연변이체 및 과발현체는 분얼 및 laminar joint 각도에 반대 효과를 미친다**

[95] OsMPT는 분얼 및 laminar joints (엽신과 엽초의 접합부)의 각도를 조절한다. 돌연변이체는 분얼 및 laminar joints (도 3)의 각도가 넓어진다. 반면 OsMPT를 과다하게 생산하는 개체는 좁은 분얼각 및 직립하는 잎을 발달시킨다 (도 4). OsMPT 과발현체의 표현형은 BR (brassinosteroid) 돌연변이체에 유사하다 (도 5). 유전분석은 OsMPT 돌연변이체가 분얼각 결정에 있어 BR 신호 돌연변이체

d61-1 및 BR 결함 돌연변이체 *d11-1*에 대해 하위에 위치함(epistatic)을 보여준다 (도 6). OsMPT는 BR 작용의 하부에서 작용하는 것으로 보인다.

[96]

[97] **실시예 4. OsMPT의 농업적 유용성**

[98] 벼 수확량은 분얼수, 분얼각, 절간신장, 원추화서 형태, 및 엽각(leaf angle)에 의해 정의되는 식물의 외형(architectures)에 의해 크게 영향을 받는다. 상기 요인들 중, 분얼 및 엽각은 잎의 표면에 태양광 입사의 효율을 결정할 수 있으므로 중요한 요인이다. 현재까지는, 벼에 있어서, BR 결함이 직립형의 식물로 만드는 유일한 기지의 요인이다. BR-결함 돌연변이체를 이용하여, 직립형의 벼 식물체는 벼가 밀식되었을 때 더욱 높은 수확량을 보이는 것이 증명되었다 (Sakamoto 등 2006, *Nat. Biotechnol.* 24, 105-109). OsMPT는 BR 작용의 하부에서 작용하므로, BR 항상성(homeostasis)에 있어서의 변경이 OsMPT 형질전환체에서 기대되지 않는다. 또한, BR 합성 또는 신호 유전자를 억제하는 것보다 OsMPT-과발현 전략이 더욱 용이한 접근이다.

[99]

[100] **실시예 5. 포장에서 OsMPT 과발현 계통의 표현형 분석**

[101] 군락에서의 생장과 표현형 발현을 검증하기 위하여 GMO 포장에서 두 가지 재식 밀도에 재배하여 관찰하였다. 도 8에서 보는 바와 같이, OsMPT 과발현 계통은 표준 재식거리 (30x15 cm)와 밀식 재식거리 (15x15 cm)에서 확연한 직립생장을 보였다. OsMPT 계통은 밀식 재식거리에서도 식물 간의 공간이 확보되어 줄 간격이 뚜렷이 보였다. 밀식 재배의 경우 일반벼(동진벼)는 우기(雨期)를 지나면서 도복하는 현상이 나타났으나, OsMPT는 도복에 대한 저항성을 보여 밀재식배에 대한 적응력이 뛰어난 것으로 판명되었다.

[102] 형질전환 식물의 표현형 평가 결과를 각 지수의 평균값 및 표준편차로 나타내어 표 1에 제시하였다. 값은 표 1의 각 열에 제시된 식물체 수의 평균이다.

[103] 표 1

수확지수(2010년)

Line		OX14						OX19					
Density		Standard Density			High Density			Standard Density			High Density		
Lines		WT	#1	#2	WT	#1	#2	WT	#1	#2	WT	#1	#2
Total plants		29	28	27	60	60	60		23	27	60	51	60
PH (cm)	AVE	113.9	96.18	97.72	114.9	101.7	97.5		120.4	120.2	115.3	127.1	115.4
	%	100%*	84.4%	85.8%	100%	88.5%	84.9%				100%	110.2%	100%
	S.D.	7.04	1.98	1.39	4.21	4.31	2.89		3.81	4.79	2.86	3.00	2.83
PN	AVE	11.83	12.77	11.13	6.92	7.04	6.88		8.43	9.63	7.22	6.67	6.90
	%	100%	108.0%	94.0%	100%	101.7%	97.5%				100%	92.4%	95.6%
	S.D.	2.054	2.43	2.61	1.52	1.31	1.34		1.47	1.80	1.29	1.59	1.68
PL (cm)	AVE	22.1	22.5	23.3	21.2	22.5	22.4		28.3	26.9	21.6	26.3	26.1
	%	100%	101.8%	105.4%	100%	106.1%	105.6%				100%	121.8%	120.8%
	S.D.	1.37	1.17	1.10	1.096	1.09	1.15		1.29	1.2	1.56	1.6	1.5
TNS	AVE	1278.66	1328.57	1227.78	632.77	675.18	673.20		1103.78	1203.89	660.05	822.71	854.28
	%	100%	103.9%	96.0%	100%	106.7%	106.4%				100%	124.6%	129.4%
	S.D.	235.99	251.21	272.04	155.99	162.08	122.01		214.48	218.10	140.60	207.24	212.18
NFG	AVE	1058.24	1084.93	955.19	507.38	547.68	526.64		912.13	973.81	585.43	671.27	692.12
	%	100%	102.5%	90.3%	100%	107.9%	106.4%				100%	114.7%	118.2%
	S.D.	196.50	247.52	181.58	130.88	143.28	99.12		189.28	172.32	131.12	188.26	177.56
TGW (gm)	AVE	25.51	24.04	20.78	11.97	12.63	12.42		17.70	17.94	13.79	13.33	13.91
	%	100%	94.0%	81.5%	100%	105.5%	103.8%				100%	96.7%	100.8%
	S.D.	5.45	6.34	4.46	3.67	3.58	2.51		4.40	3.00	3.56	3.93	4.30

PH, plant height; PN, panicle number; PL, panicle length; TNS; total number of seeds; NFG, total number of fertile grain; TGW, total grain weight
AVE, average; S.D., standard deviation; %, ratios of MPT1 to its wild type sibling

[104] 수장(panicle length)은 OsMPT 라인 중에 OX19 라인이 약 5 - 20% 더 길었다. 비형질전환 대조계통에 비해, OsMPT 라인은 표준밀도 포장에 비해 고밀도 포장에서 총 종자가 증가하였다. 총 종자 수는 비형질전환 대조계통에 비해 OsMPT OX 라인에서 약 6 - 30% 더 높았다. 고밀도 포장의 OsMPT 식물은 표준밀도 포장의 식물에 비해 종자 임실율이 높았다. OsMPT는 비형질전환 대조계통에 비해 6 - 20% 훨씬 많은 임실 종자를 생산하였다. 식물체 당 총 립중(grain weight)은 OsMPT 라인에서 5%까지 증가되었다.

[105] OsMPT OX 라인은 고밀도 재식에서 보다 나은 성능을 나타내었다. OsMPT OX에서는 수장(panicle length), 총 립수(grain number), 임실 종자(filled seeds) 및 총 립중(grain weight)이 증가되었다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 벼 (*Oryza sativa*) 유래의 OsMPT (*Oryza sativa* Modifier of Plant Type) 단백질.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 OsMPT 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열에 70% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것을 특징으로 하는 단백질.

[청구항 3] 제1항의 단백질을 암호화하는 유전자.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

[청구항 5] 제3항의 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터.

[청구항 6] 제5항의 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체.

[청구항 7] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 세포 내 수준(level)을 조절하여 식물의 외형을 변화시키는 방법.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 식물의 외형의 변화는 분얼각의 조절 또는 잎의 줄기에 부착되는 각의 조절인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 세포 내 수준의 조절은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현의 증가 또는 감소에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 식물은 벼, 밀, 보리, 귀리, 호밀, 잔디, 죽순, 옥수수, 사탕수수, 기장, 토란, 아스파라거스, 양파, 마늘, 파, 부추, 달래, 마, 생강, 콩 및 유채로 이루어진 피자식물에서 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 12] 제7항에 있어서, 상기 세포는 엽침(pulvinus) 조직의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 13] 제3항의 유전자로 식물을 형질전환하는 단계를 포함하는 외형이 변화된 식물의 제조방법.

[청구항 14] 제13항의 방법에 의해 제조된 외형이 변화된 식물.

[청구항 15] 제3항의 유전자를 포함하는 식물의 외형을 변화시키기 위한 조성물.

[청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 식물의 외형의 변화는 분얼각의 조절 또는 잎의 줄기에 부착되는 각의 조절인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 17] 제3항의 유전자로 식물을 형질전환하는 단계를 포함하는 수확량이 증가된 식물의 제조방법.

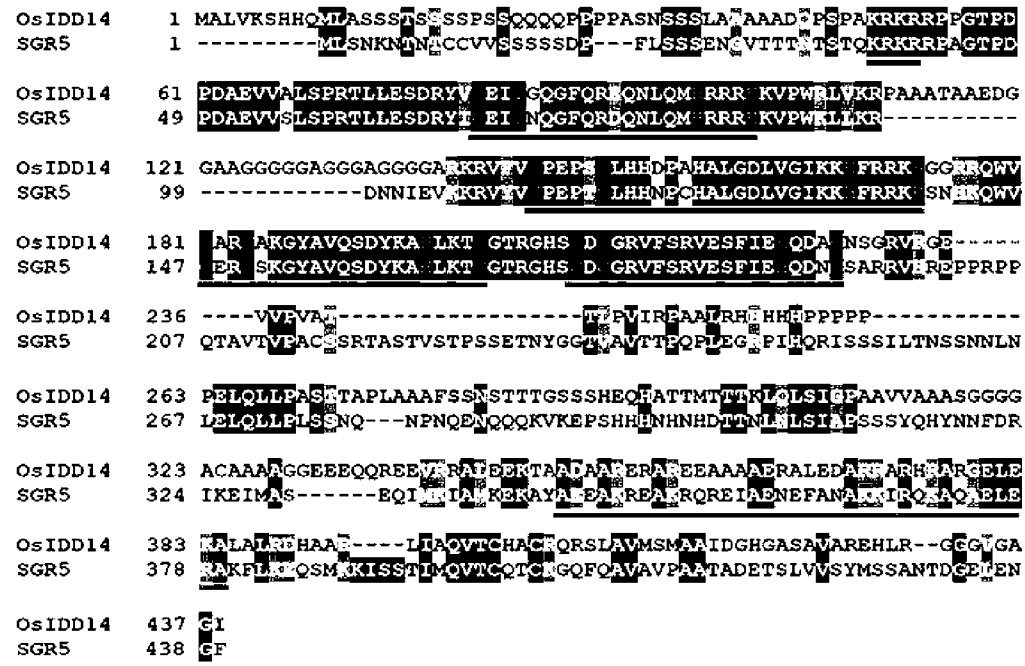
[청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 식물은 벼, 밀, 보리, 귀리, 호밀, 잔디, 죽순, 옥수수, 사탕수수, 기장, 토란, 아스파라거스, 양파, 마늘, 파, 부추,

달래, 마, 생강, 콩 및 유채로 이루어진 피자식물에서 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 19] 제17항의 방법에 의해 제조된 수확량이 증가된 식물.

[청구항 20] 제3항의 유전자를 포함하는 식물의 수확량을 증가시키기 위한 조성물.

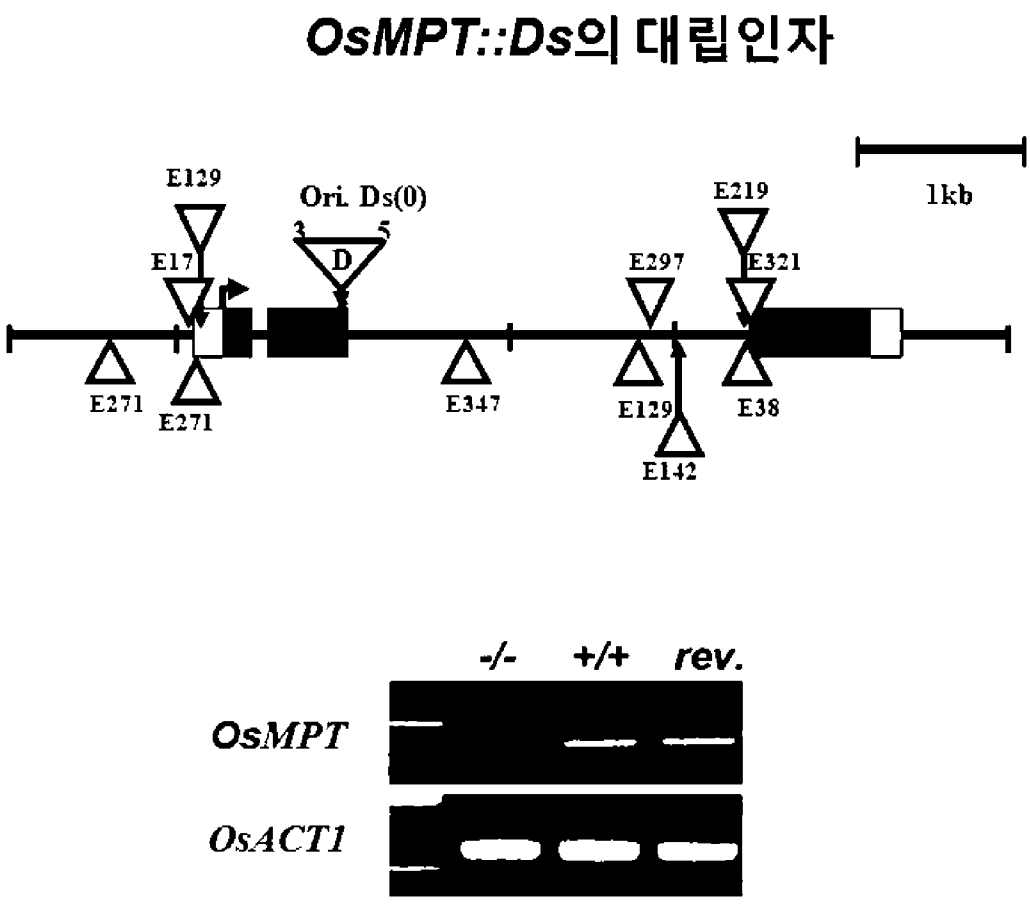
[Fig. 1]



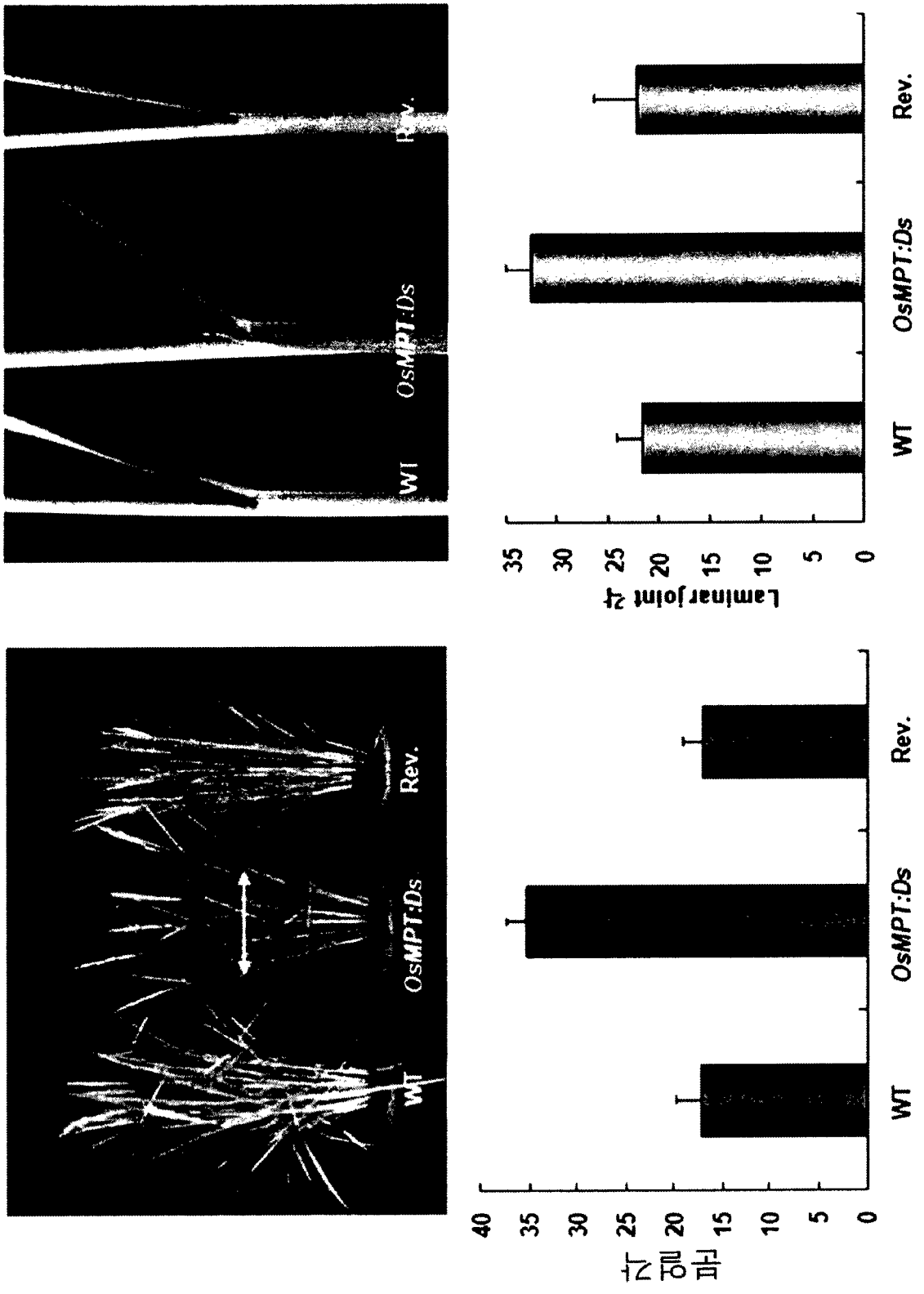
:핵 위치 신호로 추정되는 서열 :징크 핑거 도메인

:coiled coil 도메인

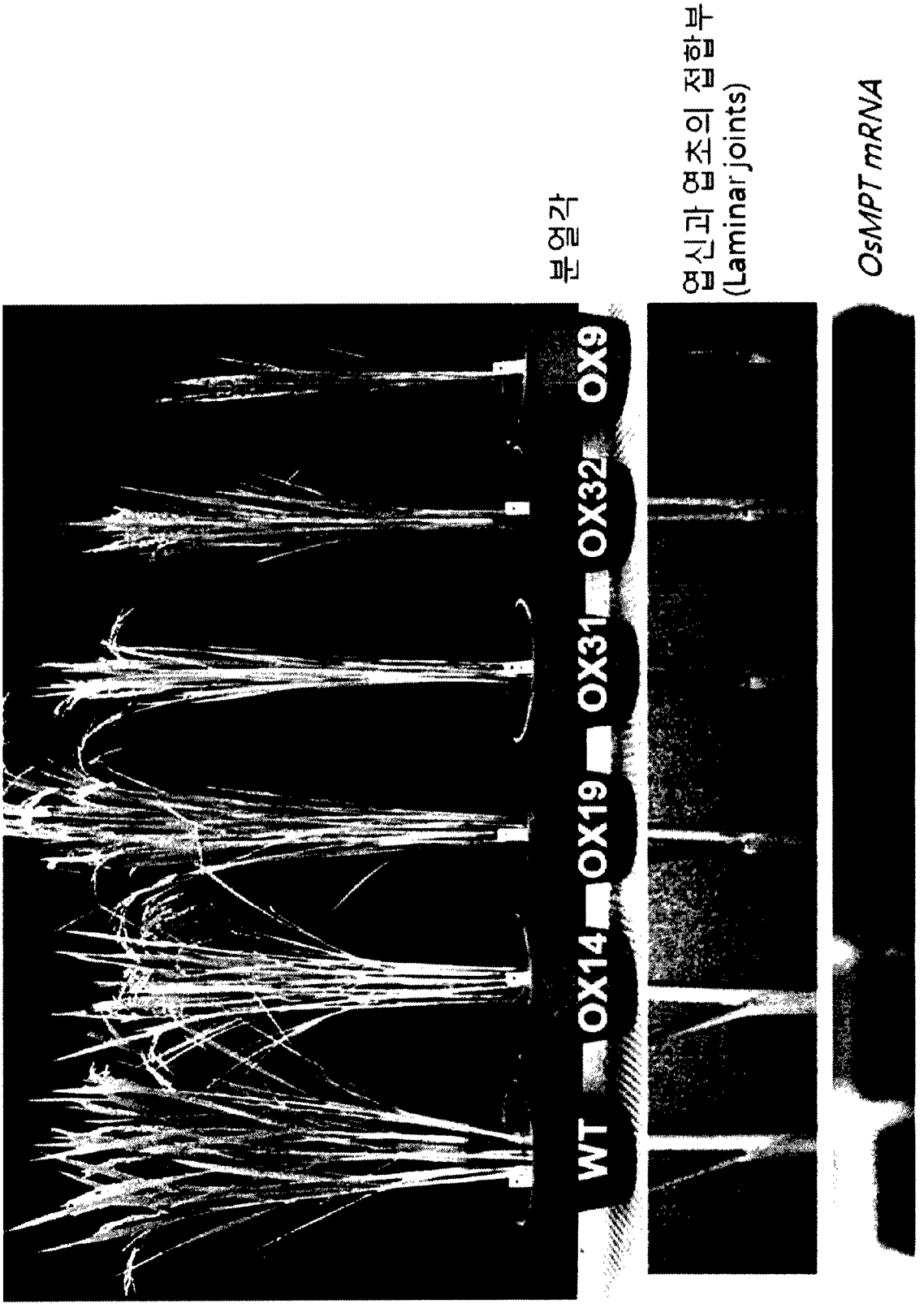
[Fig. 2]



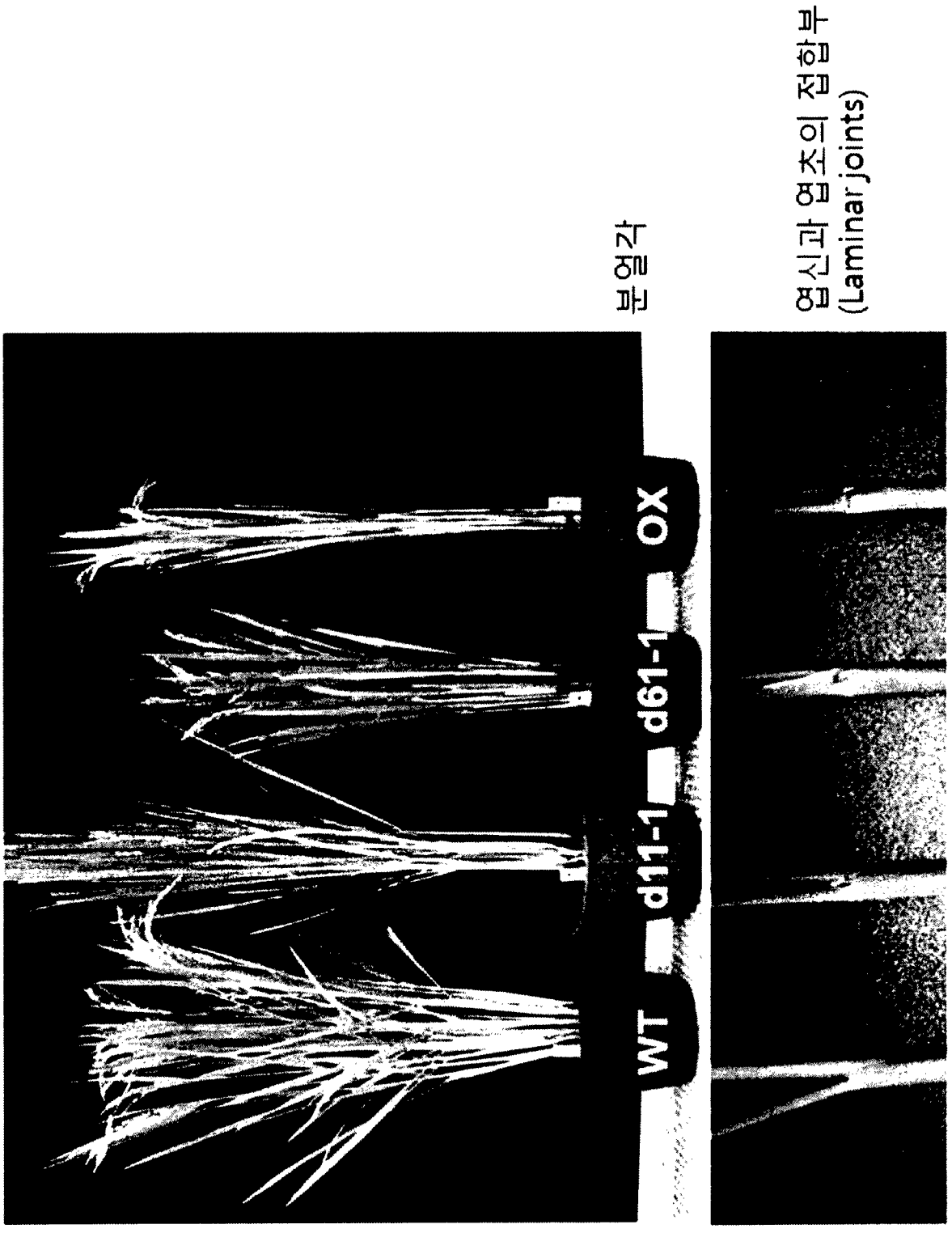
[Fig. 3]


WT
OsMPT:Ds
Rev.
WT
OsMPT:Ds
Rev.
Laminar joint 각
0
5
10
15
20
25
30
35
WT
OsMPT:Ds
Rev.
분얼각
0
5
10
15
20
25
30
35
40

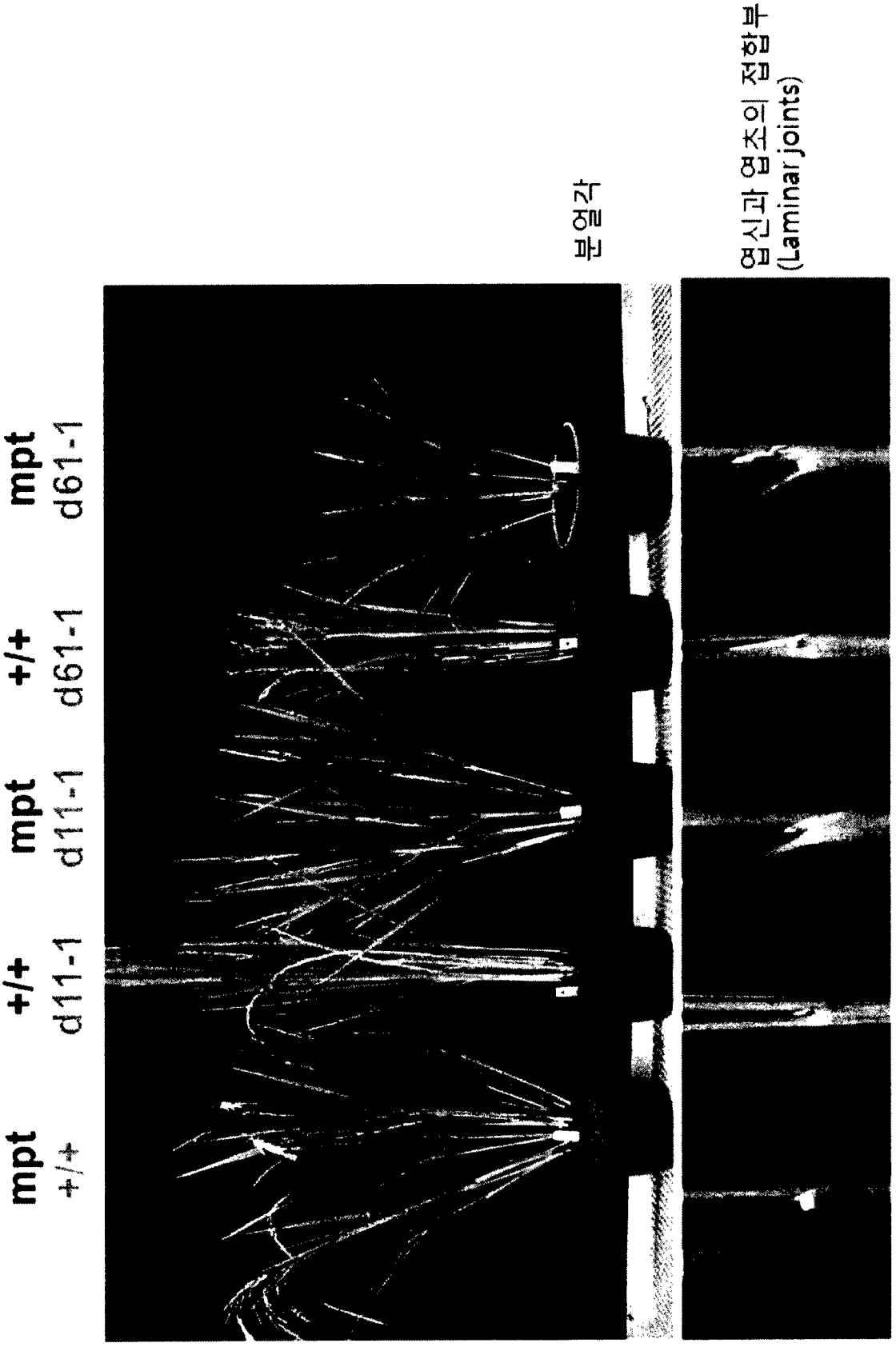
[Fig. 4]


WT
OX14
OX19
OX31
OX32
OX9
분얼각
엽신과 엽초의 접합부
(Laminar joints)
OsMPT mRNA

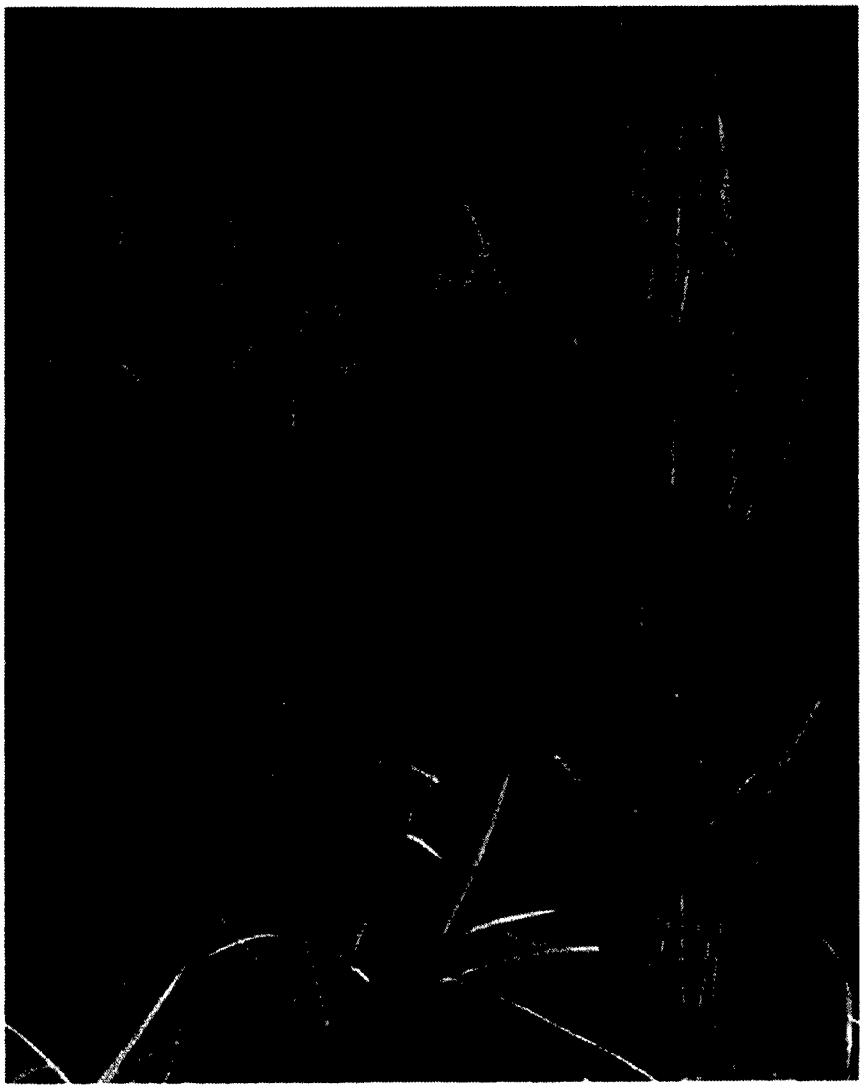
[Fig. 5]



[Fig. 6]

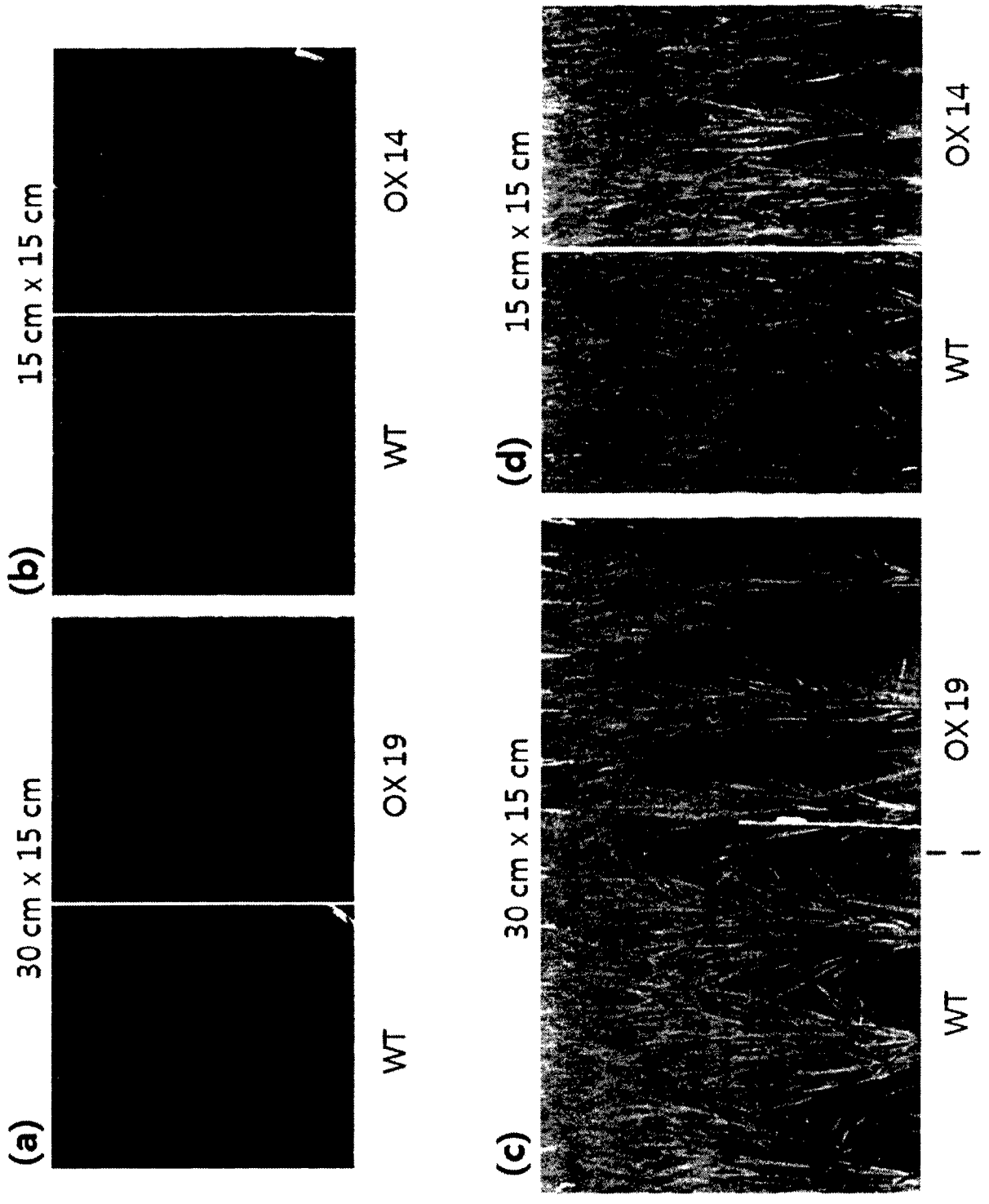

mpt
+/+
+/+
d11-1
mpt
d11-1
+/+
d61-1
mpt
d61-1
분엽각
엽신과 엽초의 접합부
(Laminar joints)

[Fig. 7]

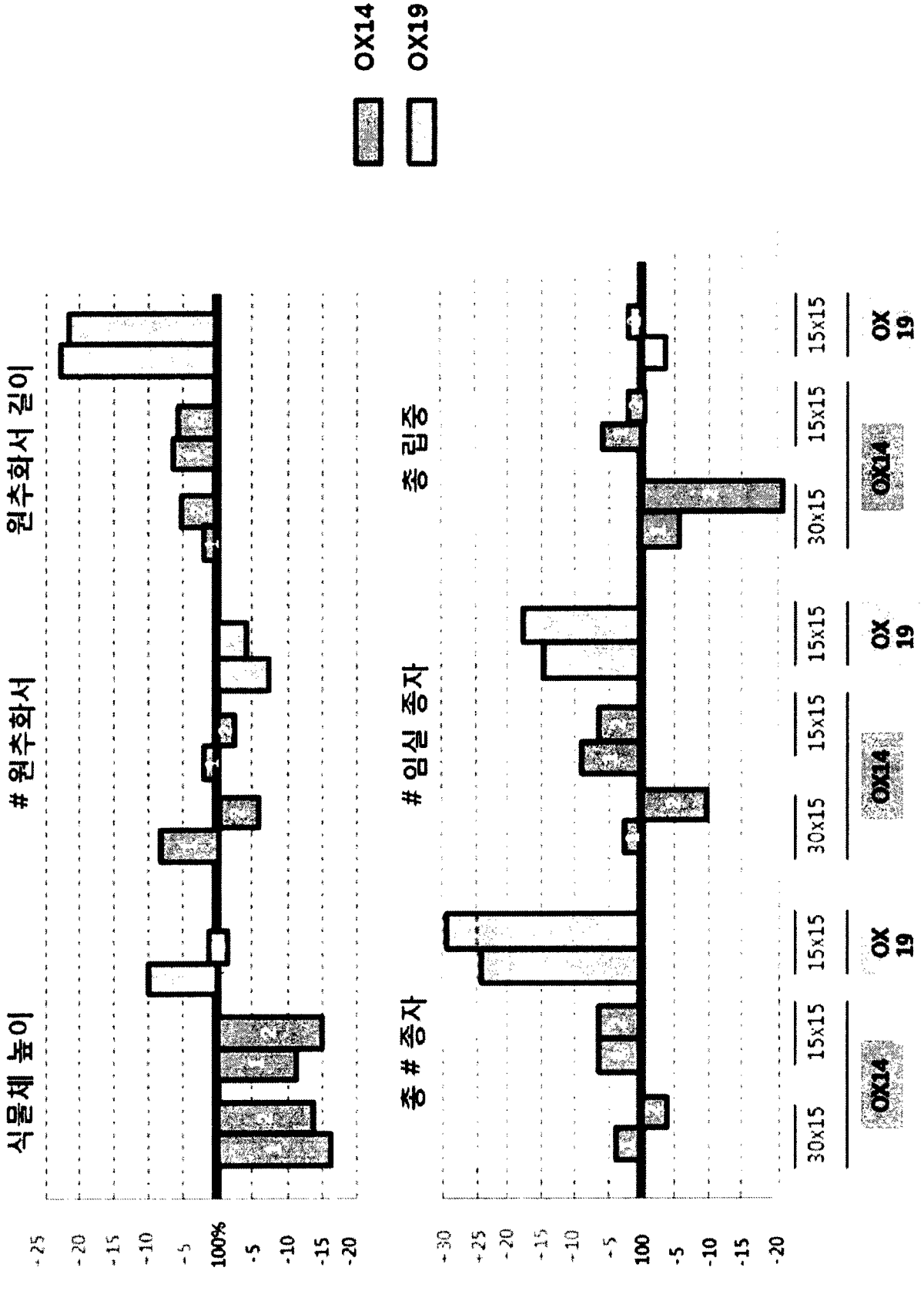


동진 MPT OX

[Fig. 8]


(a)
30 cm x 15 cm
WT
OX 19
(b)
15 cm x 15 cm
WT
OX 14
(c)
30 cm x 15 cm
WT
OX 19
(d)
15 cm x 15 cm
WT
OX 14

[Fig. 9]


OX14
OX19
식물체 높이
원추화서
원추화서 길이
줌 # 줌자
임실 줌자
줌 립줌
30x15
15x15
OX14
OX19
100%
100