



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0098482
(43) 공개일자 2009년09월17일

(51) Int. Cl.

C12N 15/05 (2006.01) *C12N 15/00* (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0023901

(22) 출원일자 2008년03월14일

심사청구일자 2008년03월14일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

김재연

경남 진주시 가좌동 900-1 6동 306호

황리준

경남 진주시 가좌동 900-1 6동 306호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

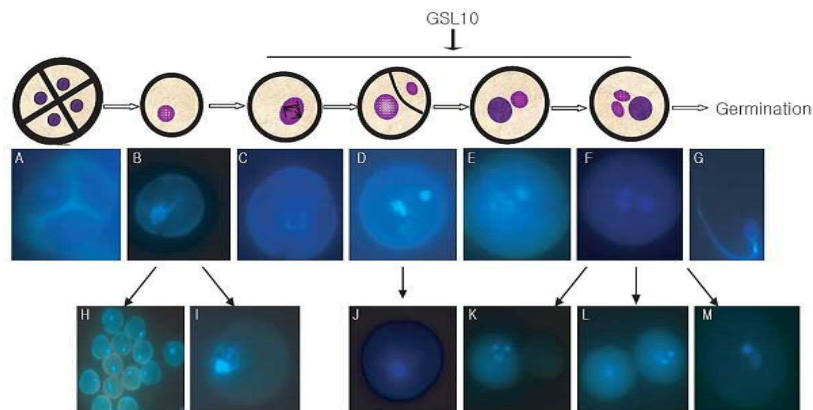
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) *GSL10* 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 음성 배우체형성과정에서 기능을 하는 *GSL10*유전자를 불활성화시키는 방법으로, 불임이 유발되어 수분 능력이 상실된 꽃가루를 생성하는 형질전환 식물을 제조하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 의하면 *GSL10* 단일 유전자의 조작만으로도 꽃가루의 수분능력을 간단하고 효율적으로 조절할 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

진웅연

경남 진주시 가좌동 900-1 6동 306호

임영길

경남 진주시 가좌동 900-1 6동 306호

조원경

경남 진주시 가좌동 900-1 6동 306호

김선원

경남 진주시 가좌동 900-1 6동 306호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M10600000205-06J0000-20510, R15-2003-012-01003-0

부처명 과기부/과학재단, 과기부/과학재단

연구사업명 국가지정연구실사업, 국가핵심연구센터사업

연구과제명 식물세포간 생체물질 이동경로 및 제어기술 개발연구, 식물세포간 물질이동, 환경과 생체신호 상호작용 및응용연구

주관기관 경상대학교

연구기간 2006년 04월 01일 ~ 2008년 03월 30일, 2003년 12월 01일 ~ 2010년 08월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

식물의 *GSL 10* (glucan Synthase-Like 10) 유전자를 불활성화시켜서, 불임이 유발된 꽃가루를 생성하는 형질 전환 식물을 제조하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, *GSL10* 유전자의 불활성화는 *GSL10* 지놈 유전자의 치환, 결실, 역위, 외부 유전자의 삽입 또는 이들의 조합에 의한 변이에 의해 유도된 것인 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, *GSL10* 유전자의 불활성화는 *GSL10* 에 특이적인 안티센스 핵산, 인공 miRNA 또는 siRNA에 의해 유도된 것인 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 식물은 식량작물류, 채소작물류, 특용작물류, 과수류, 화훼류, 사료작물류 및 에너지작물류를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 *GSL10* 유전자를 불활성화시켜서, 불임이 유발되어 수분능력이 상실된 꽃가루를 생성하는 형질전환 식물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 식물세포벽의 중요한 폴리사카라이드인 칼로스는 약간의 베타-1, 6-가지(β -1, 6-branches)와 함께 베타-1, 3-글루칸 폴리머(β -1, 3- glucan polymer)로 이루어져 있다. 칼로스 축적은 식물의 전 수명을 통하여 다른 부위에서 개별적으로 발견되었다. 칼로스는 세포질 분열 동안의 세포판 형성, 세포간 커뮤니케이션 (cell-to-cell communication)을 조절하는 원형질연락사 관, 휴면 체관에서 체판의 밀봉, 기계적 상처에 반응, 병원체 공격 및 금속 독성 자극에 의해 형성된다. 칼로스는 또한 웅성과 자성의 배우체 발생 동안에 다기능을 수행한다.
- <3> 화훼식물에서 꽃가루 발생은 농작물 수확을 조절하여 상당한 상업적 이익을 위한 기본적인 생물학적 관점과 극 성장과 세포 분화를 연구하기 위한 이상적 모델로 제공된다. 발생하는 꽃밥 자실, 감수모세포(meioocyte)는 유사분열 전에 일차세포벽과 원형질막 사이에 합성된 칼로스 층에 의해 일시적으로 채워진다. 2차 유사분열성 세포질 분리 동안에 칼로스는 계속 축적되고 테트라드(tetrads)에서 각각의 소포자를 둘러싸게 된다. 이러한 칼로스 벽은 소포자 분해를 방지하는 물리적 벽을 제공하고 외벽(exine) 형성을 위한 기초가 된다. 소포자는 베타-1, 3- 글루카네이즈(β -1, 3- glucanase)에 의한 칼로스 분해와 함께 배출되고, 칼로스의 세포벽에 의해 일시적으로 분리된 영양세포와 생식세포를 포함하는 2세포성 (bicellular)의 꽃가루 입자를 형성하기 위한 비대칭적 분열(pollen mitosis I)을 시작한다. 영양세포질로 둘러싸인 후에, 생식세포는 2개의 정핵 세포를 생성하기 위한 추가의 유사분열(pollen mitosis II)을 시작하고 성숙한 3세포성 꽃가루 입자로 된다.
- <4> 그러나, 칼로스 합성의 효소적 기작에 대해서는 효모 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 칼로스 합성 유전자를 처음으로 클로닝하기 전까지 오랫동안 논쟁이 있었다(Douglas, C.M. et al., (1994), Proc Natl Acad Sci U S A 91, 12907-1291). 아라비도시스 지놈에서 서열 상동성을 바탕으로 12개의 글루칸 합성효소-유사 (glucan synthase-like: GSL) 유전자가 동정되었고(Hong, Z. et al., (2001), Plant Cell 13, 755-768), 그들 중 일부는 분자적 생화학적 분석에 따른 증거에 통하여 칼로스 합성에 기능적으로 관련되어 있는 것으로 믿어지고 있었다(Hong, Z. et al., (2001), Plant Cell 13, 755-768; Li, Y. et al., (2003), Bioinformatics 19, 1441-1442; Ostergaard, L. et al., (2002), Plant Mol Biol 49, 559-566). 상처과 병원균 처리 후에 칼

로스 축적은 *GSL6* 와 *GSL11* 턱-다운 세포주들과 비교할 때 *GSL5* RNAi 턱-다운 세포주에서 급격하게 감소하였다 (Jacobs, A.K. et al., (2003), Plant Cell 15, 2503-2513). 반면 *GSL6* 유전자를 과발현하는 BY-2 세포는 높은 칼로스 합성능을 보이고 세포판에 더 많은 칼로스가 축적되었다(Hong, Z. et al., (2001), Plant Cell 13, 755-768), Plant Cell 13, 755-768). 흥미롭게도, 미세배우체형성과정 (microgametogenesis) 동안에 *AtGSL* 패밀리 중 3개의 일원만이 중요한 역할을 하는 것으로 보여지고 있다. *GSL1* 및 *GSL5*는 테트라드에서 개별적 소포자의 분해를 방지하기 위한 칼로스 벽 형성에 부과적으로 작용하고, 두 유전자의 결실은 꽃가루 수정에 심각한 영향을 주었다(Enns, L.C. et al., Plant Mol Biol 58, 333-349). *GSL2*는 꽃가루 모세포를 둘러싸는 칼로스 벽의 확립에 필요하고, 따라서, 꽃가루 입자의 외벽 패턴닝(exine wall patterning)을 위하여 필요한 것으로 밝혀졌다(Dong, X. et al., (2005), Plant J 42, 315-328). *GSL2*는 인 비트로에서 발아하는 꽃가루 관의 벽과 플러그(plug)에서 칼로스 축적에도 관여하는 것으로 보여졌다(Nishikawa, S. et al., BMC Plant Biol 5, 22).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <5> *GSL* 10유전자가 식물의 배우체 형성 과정에 미치는 기능과 효과에 대해서는 구체적인 규명이 이루어지지 않았다.

과제 해결수단

- <6> *GSL10* 유전자에 외생 유전자가 삽입된 반접합체 *GSL10/gsl10* 세포주를 제조하고, 배우체형성 과정이 어떻게 영향을 받는지 확인하였다.

효 과

- <7> *GSL10* 기능이 불활성화되면 기능적으로 음성 배우체에서 불임이 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 식물의 *GSL10* 유전자를 불활성화시키는 방법으로, 식물 꽃가루의 수분능력을 손쉽게 효과적으로 차단할 수 있으므로, *GSL10*의 단일 유전자의 조작만으로도 꽃가루에 의한 식물간의 원치 않는 형질교환이나 돌연변이 형성을 효율적으로 방지할 수 있게 되었다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <8> 본 발명은 식물의 *GSL10* 유전자를 불활성화시켜서, 불임이 유발된 꽃가루를 생성하는 형질전환 식물을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- <9> 본 발명의 "유전자 불활성화"란 *GSL10*의 세포내 작용이 영구적 또는 일시적으로 제거, 감소 및 억제된 것을 의미하고, 유전자의 게놈 수준, mRNA수준 및 단백질 수준에서의 조작으로 유전자의 불활성화를 유도할 수 있다. 예를 들어, *GSL10* 지놈에 외부 유전자를 삽입시키거나 *GSL10*에 특이적인 인위적인 miRNA, siRNA 또는 안티센스 핵산을 처리하는 방법으로 불활성화를 유도할 수 있다.
- <10> 하나의 구체적인 방법으로, *GSL10* 지놈 유전자의 1 이상의 엑손 및/또는 1 이상의 인트론 부위에서 치환, 결실, 역위, 외부 유전자의 삽입 또는 이들의 조합에 의한 변이를 유도하는 방법으로 *GSL10* 유전자를 불활성화시킬 수 있다. 이런 유전자 변형은 *GSL10* 유전자의 프로모터의 변형도 포함한다. 예를 들어, 유전자의 결실 및 유전자로의 외부 이형 서열(heterogenous sequence)의 삽입은 유전자의 절단(truncation), 넌센스 돌연변이(nonsense mutation), 프레임쉬프트 돌연변이(frameshift mutation), 미스센스 돌연변이(missense mutation) 등을 초래할 수 있다. 본 발명에서는 외부유전자인, T-DNA를 *GSL10*유전자의 엑손 및/또는 인트론으로 삽입하여 *GSL10*를 불활성화시켰다.
- <11> 이러한 유전자를 불활성화는 당 분야에서 확립된 방법을 통하여 수행할 수 있으며, 재조합 DNA 기술, 화학적 유도, 방사선 유도, 트랜스포존-매개 접근법 또는 유전자 적중법 등을 예로 들 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- <12> 또한, *GSL10*에 특이적인 miRNA, siRNA또는 안티센스 핵산을 도입하는 방법으로 *GSL10* 유전자를 불활성화시킬 수 있다.
- <13> 본 발명에서 용어, "특이적" 또는 "특이적인"은 세포내에서 다른 유전자에 영향을 미치지 않고 *GSL10* 유전자만 억제하는 능력을 의미하고, 당업자라면, 공지된 *GSL10*유전자의 핵산 서열로부터, 표적 유전자내 서열간의

혼성화 정도 등의 변수를 고려하여 *GSL10* 특이적인 siRNA 또는 안티센스 핵산을 디자인할 수 있다.

- <14> 본 발명에서 용어, "siRNA"란 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 표적유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 본 발명의 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분을 포함할 수 있다. 또한, siRNA는 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA 분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다.
- <15> siRNA는 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 뒤, 형질전환(transfection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입시키는 방법과 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-derived siRNA 발현 카세트를 세포안으로 형질전환 또는 감염(infection) 시키는 방법 등으로 제조가능하나, 이로 제한되지 않는다.
- <16> 본 발명에서 용어, "안티센스 핵산"이란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해한다.
- <17> 상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다. 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety) 및 변형된 염기를 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다.
- <18> 안티센스 RNA의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 세포 내로 투여하거나, 세포에서 안티센스 RNA가 합성되도록 안티센스 RNA가 발현되는 벡터 등을 세포내로 도입할 수 있다.
- <19> 상기의 방법으로, *GSL10* 유전자가 불활성화된 식물은 불임이 유발된 꽃가루를 생성하게 된다. 따라서, *GSL10* 단일 유전자의 조작으로 꽃가루의 불임을 유발하고 나아가 식물 꽃가루의 수분능력을 손쉽게 효과적으로 조절 가능하게 되었다.
- <20> 본 발명의 방법으로, 수분 능력이 상실된 꽃가루를 생성에 사용될 수 있는 식물은 *GSL10* 유전자, 또는 이의 기능적 동족체를 가지는 식물이라면 특별히 제한되지 않으며, 식량작물류, 채소작물류, 특용작물류, 과수류, 화훼류 및 사료작물류를 포함하는 그룹으로부터 선택할 수 있다.
- <21> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<22> 실시예 1: 재료 및 방법

<23> 1-1: 식물 재료 및 저장 조건

- <24> 특별한 언급이 없으면 콜롬비아 생태형 아라비도시스(*Arabidopsis* of the *Columbia* ecotype)가 사용되었다. 아라비도시스 종자는 트립톤 X-100 (Triton X-100) 및 방울이 첨가된 20% 염소계 표백제(chlorine bleach)로 5분간 표면-살균되었으며, 증류수로 3번 세척하였다. 살균된 종자는 4℃에서 4일 층적처리(stratification)하였으며 1.0% 설탕(sucrose) 및 0.6% 피토아가(Phytoagar), 또는 형질전환된 식물의 선택을 위한 적절한 항생제가 첨가된 Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962) medium (pH5.8)에서 파종되었다. 식물은 70% ± 5%의 상대 습도, 22℃ ± 2℃의 항온에서 장일조건인 16 시간 빛 / 8 시간 어둠 사이클하에 환경적으로 조절된 성장실에서 재배되었다.

<25> 1-2: T-DNA 삽입주의 확인

- <26> 별개의 3개 T-DNA 삽입주는 *AtGSL10*, *gs110-2* (GABI_038F11) 및 *gs110-3* (SALK_112778), *gs110-4* (SALK_143945)는 NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center, <http://arabidopsis.info>) 및 *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC, <http://arabidopsis.org>)에서 획득하였다. 급속 준비법으로 (Edwards, K. et al., (1991). *Nucleic Acids Research* 19, 1349) 추출된 지놈 DNA (genomic DNA)를 SALK Insertional Mutant Database (Alonso, J.M. et al., (2003). *Science* 301, 653-657)에 기재된 프로토콜로 지노타이핑

PCR(Genotyping PCR)을 수행하였다. 사용된 프라이머들은 프로그램(SiGnAL iSect Tools)을 이용하여 제작하였다.

<27> **1-3: DAPI 및 아닐린 블루 염색 및 현미경**

<28> 야생형과 *GSL10/gsl10* 식물의 각 꽃봉우리에서 다른 단계의 발생적 꽃밥들을 외과적으로 절개하였으며, 소포자는 해부현미경하에서 수술용 집게와 주사바늘로 현미경 슬라이드로 조심스럽게 방출하였다. 샘플은 공개된 프로토콜 (Park, S.K. et al, 1998, Development 125, 3789-3799)에 따라 DAPI (0.1 M sodium phosphate, pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DAPI, Sigma-Aldrich) 또는 아닐린 블루 0.01% aniline blue, in 50 mM potassium, pH8.0, Sigma-Aldrich) 형광 염료로 암조건에서 5분간 염색하였다.

<29> 광학 현미경적 분석은 Axioplan2 (Carl Zeiss) 현미경으로 수행하였다. 이미지는 명시야 및/또는 UV 광 하에 AxioVision 소프트웨어 패키지로 구동된 software package AxioCam 카메라로 촬영되었고 Adobe Photoshop CS (Adobe)에서 처리하였다.

<30> **1-4: 인 비트로 꽃가루 발아 분석 (*In vitro* pollen germination assay)**

<31> 인 비트로에서 꽃가루를 발아시키기 위하여, 야생형과 *GSL10/gsl10* 식물의 꽃가루를 단계 14로 완전히 개화된 꽃 (Smyth, D.R. et al, Plant Cell 2, 755-767) 의 막 열개된 꽃밥에서 꽃가루를 수집하였다. 동시 발아를 위하여 꽃가루를 2시간 공기 건조시키고 현미경 슬라이드에서 발아액 (18% sucrose, 0.01% Boric acid, 1 mM CaCl_2 1 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 mM MgSO_4 , pH 7.0)으로 서서히 침윤시켰다. 이미 알려진 방식에 따라(Li, H. et al., (1999), Plant Cell 11, 1731-17420), 슬라이드는 거꾸로 하여 적어도 23°C, 100% 상대습도의 암조건에서 적어도 6시간 추가로 배양하였다. 커버슬립으로 덮기 전에 꽃가루관 또는 꽃가루입자는 DAPI 또는 아닐린 블루 용액으로 직접 염색하고 발아를 측정하기 위하여 현미경으로 관찰하였다.

<32> **1-5: GFP-GUS 리포터 시스템을 이용한 AtGSL10 프로모터 활성 분석**

<33> AtGSL10 프로모터의 활성을 분석하고자, 서열번호 1 (5'-CACC CCATCGGTATGAGCATAGCCTTGAGG-3')과 서열번호 2 (5'-TTTCTACAAACAAAAACATC-3')의 프라이머를 이용하여 개시코돈으로부터 상부의 1,500-bp 단편을 PCR로 증폭하였다. 프로모터 서열을 제조사의 설명서에 따라서 pENTR™/D-TOPO (Invitrogen) 으로 클로닝하였다. 바이너리 벡터 pHGWFS7(binary vector pHGWFS7)의 AtGSL10pro::GFP-GUS 구조물을 생성하기 위한 융합된 리포터 유전자인 eGFP와 Gus (*uidA*) 전방으로 타겟 단편은 게이트웨이 재조합 시스템(Gateway recombination system)을 이용하여 통합되었다. T-DNA 구조물은 일렉트로포레이션 방법으로 아그로박테리움 투메파시엔스 주 GV3-101 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3-101)로 주입되었다.

<34> 야생형 아라비도시스 식물은 플로랄-디핑법 (floral-dipping procedures) (Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Plant J 16, 735-743)으로 형질전환시켰다. 형질전환된 식물은 하이그로마이신 ((25 $\mu\text{g mL}^{-1}$)을 포함하는 MS 배지에서 선택되었고 이식유전자(transgene)의 존재는 특이적 프라이머를 이용하여 PCR로 확인하였다.

<35> 조직화학적 GUS 염색분석을 하기 위하여, T1 transgenic 식물의 10 일체의 묘목과 꽃 조직을 90% 아세톤에서 일차 고정시키고 1 mg mL^{-1} X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2), 0.1% Triton X-100, 10 mM EDTA, 2 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 2 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 을 포함하는 GUS 염색용액에서 침윤시키고 37°C의 암조건에서 밤새 처리하였다 (Jefferson, R.A. et al., (1987) Embo J 6, 3901-3907). 샘플은 70% 에탄올로 깨끗이 하고 GUS 이미지는 Olympus SZX12 해부용 현미경 또는 Axioplan2 microscope (Carl Zeiss)으로 획득하였다.

<36> **1-6: 기탁번호(accession Number)**

<37> 서열 정보는 *Arabidopsis* Genome Initiative database 에서 기탁번호 At3g07160 (*AtGSL10*)로 입수가능하다.

<38> **실시예 2: *gsl10* 동형접합체 (*gsl10* homozygote)는 배우체 치사(gametophytic lethality)로 인하여 분리되지 않음**

<39> 세가지 타입의 *AtGSL* 패밀리의 3가지 일원(*GSL1*, *GSL2* 및 *GSL5*)은 배우체형성 (gametogenesis) 단계에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 배우체 형성 발생 동안에 아라비도시스 계놈에서 기능이 알려지지 않은, *GSL*

패밀리 일원들의 생물학적 기능을 분석하고자, 대중적 입수가 가능한 T-DNA 삽입 돌연변이 세포주로 역유전적 접근(reverse genetic approach)을 하였다. 분리모형 (segregation analysis)은 *GSL10* 유전자를 제외한, 11 개 유전자에서 동형접합체 돌연변이체 목록을 나타내었다. *AtGSL10* (At3g07160) 글루칸 합성효소-유사 패밀리 일원으로부터 3개의 T-DNA 삽입 세포주 (GABI_038F1(*gs110-1*), SALK_112778(*gs110-3*) 및 SALK_143945 (*gs110-4*))를 분리하였다 (도 1A). T-DNA 세포주 *gs110-3* *GSL10*의 인트론 16에 삽입되었다. T-DNA 세포주 *gs110-1* 와 *gs110-4*은 중심영역에 가까운 *GSL10* 코딩 영역(엑손 24)에 삽입되었다. 동종접합체 삽입 세포주(homozygous insertion lines)를 확인하고자, 자가수분된 후손(selfed progeny)으로부터 분리된 DNA를 이용한 PCR 지노타이핑을 T-DNA left border 프라이머와 gene-specific PCR 프라이머를 이용하여 수행하였다. 카나마이신-저항성(kanamycin-resistance)에 따른 분리비(segregation rate)은 약 1:1 (resistant:sensitive) 이었다(도 1C). 지노타이핑 PCR을 통하여, 테스트를 한 3개의 삽입주의 자손(133개 식물) 중에서 동형접합체 T-DNA 세포주(homozygous T-DNA line)는 발견되지 않았으며, 오직 야생형과 반접합체 T-DNA 세포주(hemizygous T-DNA line)가 1:1로 존재하였다. 또한, 카나마이신 저항성 식물은 모두 반접합체 T-DNA 세포주임을 확인하였다. 야생형과 반접합체 T-DNA 세포주간에 형태학적 차이는 관찰되지 않았다. 동형접합체 T-DNA를 가지는 식물의 분리 실패와 야생형과 반접합체 T-DNA 식물의 분리비가 1:1로 관찰된다는 점은 동형접합체 *gs110* 돌연변이가 배우체의 형성과정에 치명적임을 의미하는 것이다.

<40> **실시예 3: *gs110* T-DNA는 웅성 배우체 불임(male gametophytic sterility)을 유도함**

<41> 배우체 치사(Gametophytic lethality)는 웅성 또는 자성 배우체 형성의 기능장애에서 야기될 수 있다. 자성 배우체 형성이 원인이 되었는지 테스트하고자, T-DNA 반접합체 세포주의 씨앗에 착립된 종자를 관찰하였다. 야생형과 반접합체 T-DNA 식물간에 종자 착립에서는 차이가 관찰되지 않았다. 또한, 반접합체 T-DNA 식물의 배 형태는 모두 정상이었다 (도 1E-H). 이런 관찰들은 *gs110* 돌연변이 에그(egg)가 정상적으로 수정되고 정상적 배와 씨앗을 생성할 수 있음을 시사하는 것이다.

<42> 다음, 반접합체 *gs110* T-DNA 세포주에서 꽃가루 발생을 관찰하였다. 반접합체 *gs110* T-DNA 세포주에서 성숙한 꽃가루를 광학 현미경으로 형태학적인 분석을 한 결과, *gs110-1* 및 *gs110-3* 1세포주에서 변종 꽃가루가 각각 44.7%와 37.4%만 관찰되었다 (표 1). 반대로, *GSL10* 야생형 씨앗의 꽃가루 입자는 약 2.6%만 비정상적 꽃가루이며 대부분은 정상적 형태를 보였다. T-DNA 삽입과 비정상적 꽃가루 빈도간의 명확한 공분리(cosegregation)은 *GSL10* 이 정상적 꽃가루 발생에 필요하다는 것을 의미하는 것이다. 반접합체 T-DNA 삽입 세포주의 꽃가루를 인 비트로 발아 분석한 결과, 비정상적 돌연변이 꽃가루는 발아에 실패하였다. 반대로 야생형 꽃가루는 정상적으로 발생하였으며 성장하는 꽃가루관에서 칼로스 프로그(callose plug)가 관찰되었다. 따라서, *GSL10*은 웅성 배우체 형성에 필수적인 유전자이다. *GSL10* 단일 돌연변이가 치사를 유발한다는 점은, 12 패밀리 일원중에서 적어도 4개의 다른 *GSL* 유전자들 (*GSL1*, *GSL2*, *GSL5*, *GSL8*) 이 꽃가루 발생 중에 발현된다는 점 때문에 놀라운 것이다. *GSL2*는 감소모세포(meicyte), 테트라드(tetrad) 및 소포자(microspore)의 일차 세포 벽에서 칼로스를 합성하는 기능과 꽃가루 외벽 막의 패턴링에 기능을 한다고 보고되었다 (Dong, X. et al, Plant J 42, 315-328). *GSL2*는 또한, 꽃가루 발생의 후기 단계에 작용한다. *GSL2*는 또한 성장하는 꽃가루 관의 벽과 플러그(plug)에서 칼로스 형성에도 관여한다(Nishikawa, S. et al., (2005), BMC Plant Biol 5, 22). 꽃가루 발생에서 부분적으로 작용하는 *GSL1* 과 *GSL5*는 테트라드 단계에서 소포자를 절단하는 칼로스 벽의 형성에 관여한다 (Enns, L.C. et al., (2005), Plant Mol Biol 58, 333-349). 두 유전자 모두가 돌연변이되면 수정에서 심각한 결손이 생긴다. *GSL8*은 *GSL10*과 가장 상동성이 높은 유전자로, 꽃가루 발생 동안에 발현된다. *GSL8*의 기능적 특성은 아직까지 발표되지 않았다.

<43> **실시예 4: *GSL10*은 소포자 발생과 외벽 형성에 필요하지 않음**

<44> *GSL10*이 *GSL2*, *GSL1* 및 *GSL5*의 보충적 기능을 하는지를 확인하기 위하여, 성숙한 꽃가루 입자의 표면을 프로피움 아이오다이드(propium iodide) 염색한 후에 형광현미경으로 확인하였다. 붕괴된 꽃가루에서 꽃가루 입자의 주름진 외형에도 불구하고, 돌연변이 꽃가루의 특징적 망상벽(reticulate exine) 구조는 야생형 꽃가루의 구조와 거의 비슷하였다. 이는 꽃가루 발생동안에 *GSL10*은 *GSL2*와 다른 기능을 한다는 것을 의미하는 것이다

<45> 테트라드 단계의 세포벽은 광범위한 칼로스와 테트라드의 소포자를 분리하는 칼로스 벽을 형성하는 기능을 하는 *GSL* 패밀리의 일원인 *GSL5*과 *GSL1*로 이루어진다(Enns, L.C. et al., 2005, Plant Mol Biol 58, 333-349). 야생형과 반접합체 *GSL10/gsl110*는 단수 소포자 (haploid microspore)의 구조가 비슷하였다. *GSL10/gsl110* T-DNA 삽입 세포주와 야생형의 테트라드에서 칼로스 축적을 살펴보고자 아닐린 블루 염색을 사용하였다. 칼로스 염색 패턴에서는 야생형과 반접합체 *GSL10/gsl110* 사이에 어떤 특이한 차이가 관찰되지 않았다. 테트라드 단계 후에,

핵을 검출하고자 유리 소포자를 DAPI로 염색하였다. 반접합체 *GSL10/gsl10* 세포주의 소포자는 야생형 소포자에서처럼 중앙에 위치한 단일 핵을 가졌다. 이는 *GSL10*이 유리 소포자 단계 이후의 꽃가루 발생의 후기 단계에서 기능을 한다는 점을 시사하는 것이다.

<46> **실시예 5: *GSL10*는 소포자의 유사분열에 작용**

<47> 유리 소포자(free microspore) 단계 이후의 꽃가루 발생의 후기 단계를 관찰하였다. 야생형은 97.4%가 3개의 핵을 가지며 나머지의 꽃가루는 붕괴되었다. *GSL10/gsl10* 반접합체 *gsl10-3*와 *gsl10-1* 세포주에서는 단지 55.3%와 62.6%의 꽃가루만이 3개의 핵을 가졌다. 나머지 꽃가루의 대부분은 DAPI-염색 핵이 없었으며, 표 1에서 "붕괴"로 칭하여 나타내었다. 이들 붕괴된 꽃가루의 표현형은 *gsl10* 돌연변이 소포체에서의 세포사멸 때문인 것으로 보인다. 낮은 비율의 꽃가루는 1개 또는 2개의 핵을 가졌다. 이러한 비정상적 1개 및 2개의 핵을 가지는 꽃가루 표현형을 가지는 부류는 소포자가 1번째 및 2번째 유사분열에 진입하도록 하는데 *GSL10*이 필요하다는 것을 의미하는 것이다. 소포자 발생 동안에 작용하는 칼로스 합성 효소의 새로운 부류인 *GSL10*이 유사분열 진입을 어떻게 조절하는지는 밝혀지지 않았다. *GSL10*이 2-세포 형성 단계의 세포질 분열에 관여되어 있는지 여부는 아직 불명확하다. *GSL6*은 포자체형 조직(sporophytic tissues)에서 세포관 형성에 기능을 한다고 보고되었다(Hong, Z. et al., Delauney, A.J., and Verma, D.P. (2001). Plant Cell 13, 755-768). *GSL6* T-DNA 삽입 세포주는 야생형의 식물과 마찬가지로 건강하였기 때문에, 세포관 형성 동안에 칼로스 합성에 부과적으로 기능하는 유전자가 존재할 것이다.

<48> *GSL10*은 *GSL8*과 상동성이 매우 높다. 높은 상동성과 꽃가루에서의 유전자 발현에도 불구하고, *GSL8*은 *gsl10* 돌연변이를 보완할 수 없었고, 이는 두 유전자가 꽃가루 발생 동안에 독립적으로 기능을 한다는 것을 의미하는 것이다. 그러나, *GSL10* 와 *GSL8* 단백질이 3개의 다른 CESA 단백질과 함께 셀룰로즈 합성 콤플렉스를 형성한 것에서 볼 수 있는 것처럼 *GSL10* 와 *GSL8* 단백질이 콤플렉스로 작용한 가능성을 배제할 수 없다 (Gardiner et al. 2003, Taylor et al. 2000). 이는 칼로스가 일반적으로 트리플 헬릭스로 존재한다는 관찰에 의해 지지될 수 있다.

표 1

<49> *gsl10* 돌연변이에서 꽃가루 표현형의 빈도

	Percentage of Pollen Grains in Each Phenotypic Class				
	tricellular	binucleate	uninucleate	collapsed	$\Sigma(\text{aberrant})^{\text{a}}$
WT	97.4% (636)	-	-	2.6% (17)	2.6% (17)
<i>gsl10-1</i>	55.3% (470)	5.1% (43)	3.6% (31)	36% (306)	44.7% (380)
<i>gsl10-2</i>	62.6% (409)	4.6% (30)	3.2% (21)	29.6% (193)	37.4% (244)

Mature pollen grains were dissected from wide-type or heterozygous *gsl10* mutants at the stage of anthesis/anther dehiscence (anthers at stage 13) and counted under UV after DAPI staining described in Materials and Methods. ^a $\Sigma(\text{aberrant})$, percentage of all aberrant classes. Values were derived from >650 pollen grains as indicated. Pollen grains artificially broken during processing were excluded.

산업이용 가능성

<50> 상기에서 기술한 바와 같이, *GSL10* 단일 유전자 조작으로 식물의 수분을 자유롭게 조절할 수 있으므로, 꽃가루에 의한 식물간의 원치 않는 형질교환이나 돌연변이 유발을 방지할 수 있으므로, 다양한 농업 분야에서의 응용을 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<51> 도 1(A)는 At*GSL10* 유전자(TAIR v7.0)의 개략도를 나타내는 것으로, 검정색 박스는 50개의 엑손을 나타내고, 하살은 개별적인 T-DNA 삽입 부위를 나타낸다. (B-C)는 PCR 지노타이핑(genotyping) 결과로서, 단일 밴드는 야생형을, 이중 밴드는 반접합체를 나타낸다. (D)는 반접합체 *gsl10* 돌연변이의 장과과에서의 종자를 나타내고, (E-F)는 반접합체 *gsl10* 돌연변이의 배를 보여주는 것으로, (E)는 구형 단계(globular stage), (F)는 심장단계(heart stage), (G)는 토페도단계(topedo stage), (H)는 성숙 배(mature embryo)이다.

<52> 도 2는 *GSL10/gsl10* 식물의 꽃가루 발생을 보여준다. (A-C)는 성숙한 꽃가루 입자로, (B)는 야생형의 꽃가루,

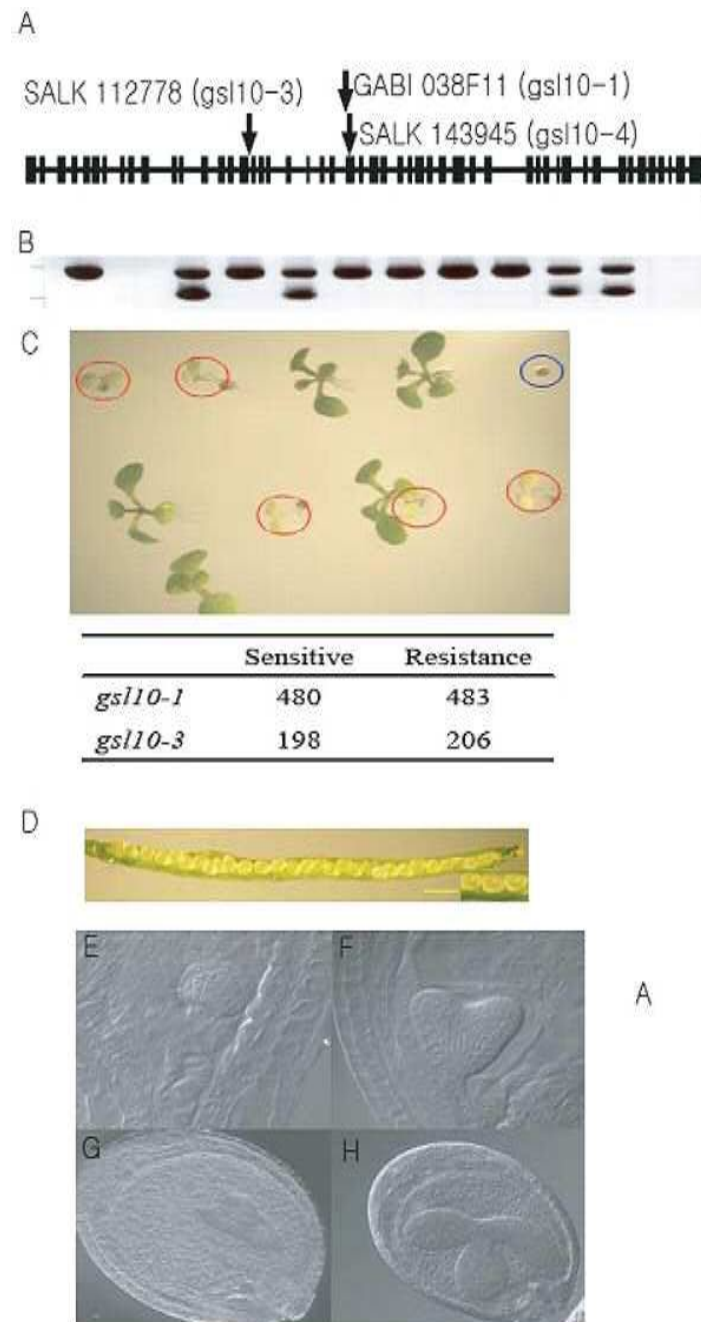
(C)는 붕괴된 꽃가루를 나타낸다. (D-F)는 PI로 염색한 꽃가루 외벽으로, (D 및 E)는 정상 꽃가루를, (F)는 비정상적 꽃가루를, 화살은 꽃가루 벽을 나타낸다. (G-I)는 현미경하에 GSL10 반접합체에서 테트라드를 보여주는 것으로, (G)는 광, (H 및/또는 I)는 아닐린 블루 염색된 칼로스 벽 및/또는 DAPI 염색 핵을 UV로 살펴본 것이다. (J-K)는 꽃가루의 인 비트로 발아를 보여주는 것으로 (J)는 광, (K)는 화살표로 표시된, 아닐린 블루 염색된 칼로스 플러그의 UV 형광을 나타낸다.

<53> 도 3은 *GSL10/gsl10* 식물의 성숙한 꽃가루 화분을 나타낸다. (A-C)는 DAPI 형광없이 붕괴된 꽃가루, (D-E)는 DAPI 형광으로 발산된 1핵 비정상적 꽃가루, (G-I)는 2핵의 비정상적 꽃가루, (J-L)는 일반적 형태를 보여주는 3핵 야생형 꽃가루이다(상부 패널: UV 형광, 중간 패널: 광, 하부 패널: 오버레이(overlay))

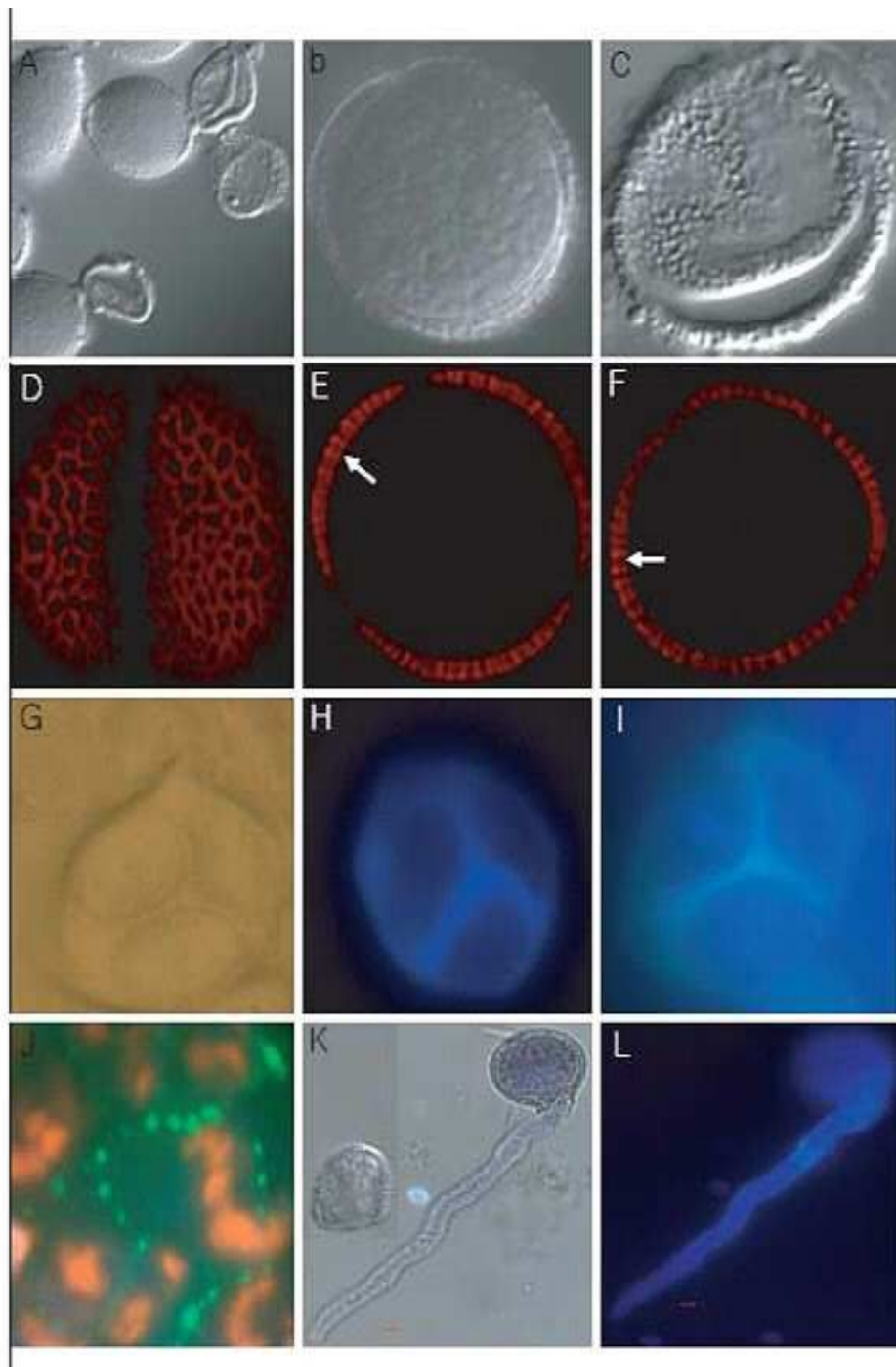
<54> 도 4는 야생형과 *gsl10* 반접합체 식물에서 꽃가루 발생을 보여준다. (A-G)는 야생형으로, (A)는 테트라드 단계, (B)는 유리 소포자 단계, (C)는 1차 유사분열, (D)는 2세포 꽃가루, (E)는 중앙 집중된 생식 세포, (F)는 3세포 꽃가루 및 (G)는 발아된 꽃가루를 보여준다. (H-M)는 *gsl10* 반접합체 꽃가루를 보여주는 것으로, (H-I)야생형과 비슷한 소포체 단계에서 돌연변이 꽃가루를, (J)는 2세포 단계에서 빈번하게 나타내는 단핵을 보여준다. 돌연변이 꽃가루 단계에는 돌연변이 꽃가루 입자는 핵없이 붕괴된 꽃가루, 1세포 또는 2세포 타입의 3가지 타입으로 분류된다.

도면

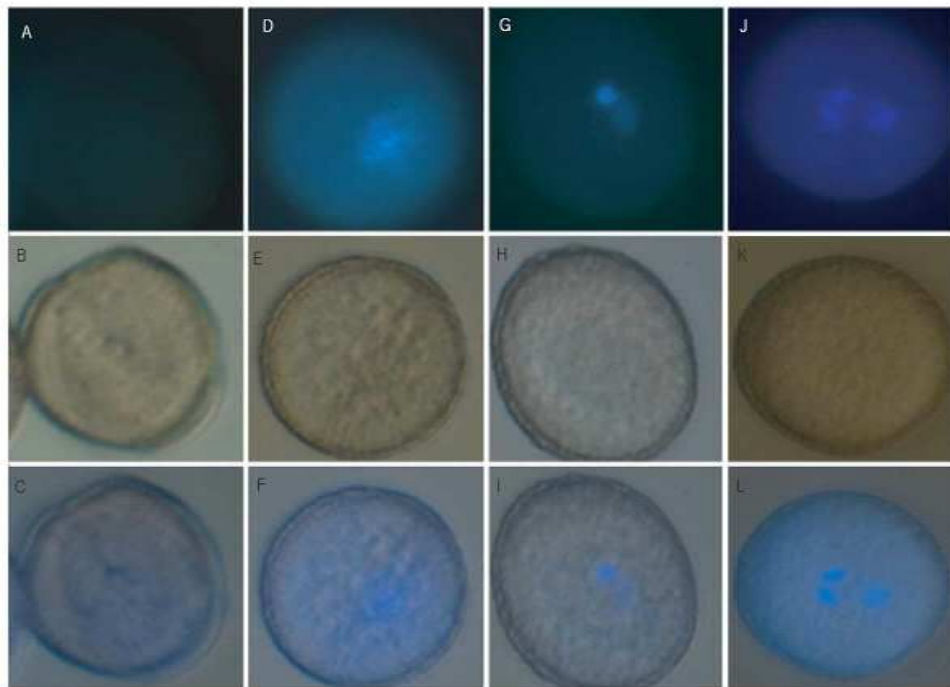
도면1



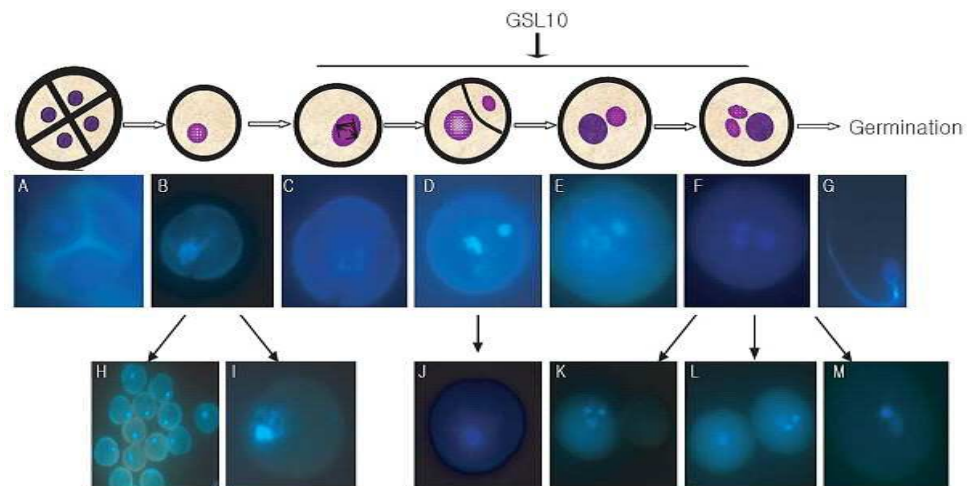
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> Glucan Synthase-Like 10 and its use

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for AtGSL10

<400> 1

caccccatcg gtatgagcat agccttgagg

30

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for AtGSL10

<400> 2

tttctacaaa caaaaaacat c

21