

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 6월 1일 (01.06.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/090944 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/10* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/013399
- (22) 국제출원일: 2016년 11월 21일 (21.11.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0164709 2015년 11월 24일 (24.11.2015) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR];
08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

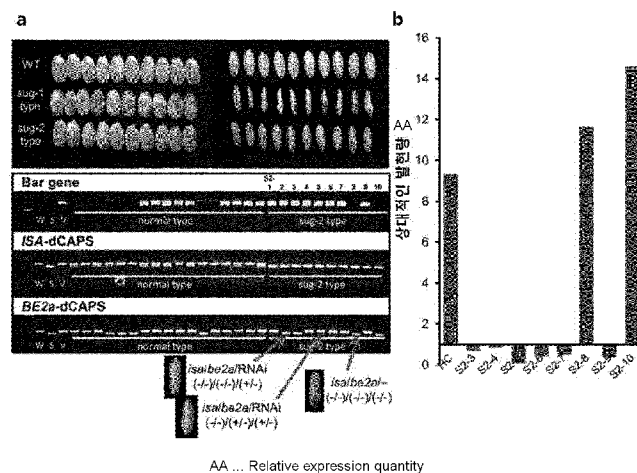
- (72) 발명자: **고희종 (KOH, Hee-Jong)**; 08803 서울시 관악구 남부순환로 260길 50, 301호, Seoul (KR). **이윤주 (LEE, Yunjoo)**; 22156 인천시 남구 한나루로 550번길 50-1, Incheon (KR). **김백기 (KIM, Backki)**; 16384 경기도 수원시 권선구 금곡로 45, 203동 1501호, Gyeonggi-do (KR). **이길웅 (LEE, Gileung)**; 24849 강원도 속초시 만천4길 1, 1동 1106호, Gangwon-do (KR).
- (74) 대리인: **최규환 (CHOI, Kyu Whan)**; 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR ADJUSTING SUGAR CONTENT, STARCH CONTENT, OR SHAPE OF PLANT ENDOSPERM BY USING SUG-1 GENE AND SUG-2 GENE, AND PLANT OBTAINED BY USING SAME

(54) 발명의 명칭 : *s u g*-1 유전자 및 *s u g*-2 유전자를 이용한 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태를 조절하는 방법 및 그에 따른 식물체

[도3]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for adjusting sugar content, starch content, or the shape of a plant endosperm by using a *sug-1* gene and a *sug-2* gene, and to a plant obtained by using the same. The inventors have obtained a sugary-2 mutant generated by inhibiting the expression of a *sug-1* gene and a *sug-2* gene by treating N-methyl-N-nitrosourea (MNU) on Hwacheong rice which is a japonica rice species. It has been confirmed that the sugary-2 mutant has an increased sugar content and a decreased starch content in an endosperm compared to wild-type Hwacheong rice and has an intermediate form of a sugary-1 mutant and a wild-type seed thickness. It can be considered that the sugary-2 mutant has saccharic endosperm properties which are similar to those of a conventionally discovered sugary-1 mutant and also has improved morphological practicability. Accordingly, the present invention can be usefully used in studies related to the breeding and quality of a plant endosperm-related species. In particular, through the improved quality and taste of a rice species, competitiveness of domestic rice is enhanced. Thus, the rice industry can be invigorated, and a possibility of exporting the best quality rice and seeds can be ensured in the future.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/090944 A1



TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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,

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자를 이용한 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태를 조절하는 방법 및 그에 따른 식물체에 관한 것으로, 본 발명자들은 MNU(N-methyl-N-nitrosourea)를 벼 자포니카 품종인 화청벼에 처리하여 *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자의 발현 저해로 발생한 *sugary-2* 돌연변이체를 얻었으며, 상기 *sugary-2*는 야생형인 화청벼에 비해 배유의 당 함량이 증가되고 전분 함량이 감소되며, *sugary-1* 돌연변이체와 야생형 종자 두께의 중간 형태를 보이는 것을 확인하였다. 이는 기존에 이미 밝혀진 *sugary-1* 돌연변이체와 비슷한 당질배유 특성을 가지면서도 형태적 실용성이 높아졌다고 볼 수 있다. 따라서, 본 발명은 식물체 배유 관련 품종 육성 및 품질 관련 연구에 유용하게 활용될 수 있으며, 특히 벼 품종의 향상된 품질 및 식미를 통해 우리 쌀의 경쟁력을 높임으로써 쌀 산업을 활성화하고 장차 최고 품질의 쌀 및 종자의 수출 가능성도 확보할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자를 이용한 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태를 조절하는 방법 및 그에 따른 식물체

기술분야

- [1] 본 발명은 *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자를 이용한 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태를 조절하는 방법 및 그에 따른 식물체에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 곡류 작물은 에너지 비축을 위해 종자의 배유에 전분을 축적하며, 사람 및 가축의 식이에서 일차적인 탄수화물원이다. 더욱이, 전분은 산업적으로 많은 응용이 가능하다. 고등식물에서 현행 전분 생합성의 방식은 전분의 주 구성요소인 아밀로펙틴의 합성으로 개시되며, 아밀로펙틴은 AGPase(ADP glucose pyrophosphorylase), SS(soluble starch synthases), BE(starch-branching enzymes) 및 DBE(starch-debranching enzymes)의 작용으로 생성된다. 또한, 불균형효소(disproportionating enzyme) 및 알파-글루칸 포스포릴라아제(α -glucan phosphorylase)가 상기 과정에 관여된다는 증거가 있다. 쌀에서 전분이 곡물 건량의 90%를 이루며, 칼로리의 80%까지를 제공한다. 특히 식미(eating) 및 조리(cooking)의 질에 관한 쌀 질의 다양한 양상은 전분의 특성에 의해 결정된다.
- [3] 낱알(grain) 등숙 중에 다량의 전분이 침착되는 배유는 발달 초기 단계의 배(embryo)에 양분을 공급한다. 배유 전분은 선상(아밀로오스) 및 분지상(아밀로펙틴)으로 구성된다. 배유의 외양 및 물리화학적 특성에 근거하여, 돌연변이주가 동정되었으며, ae(amylase extender), bt(brittle), du(dull), flo(floury), glu(glutinous), sh(shrunken), su1(sugary 1), 및 wc(white-core) 변종으로 나누어졌다. 상기 돌연변이주들은 낱알(grain) 등숙 중에 전분의 저장에 관련된 대사과정 규명을 위한 소중한 유전 재료를 제공한다. 또한 상기 돌연변이주들은 전분의 생합성 효소를 암호화하는 유전자의 동정을 용이하게 한다. 상기 돌연변이주들 중의 일부는 상기 곡물이 식품산업에 이용되게 하는 형질을 가진다.
- [4] 한편, 한국공개특허 제2014-0135917호에는 벼의 전분합성효소 *SSS4A* 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제 및 이의 용도에 대해 개시하고 있으며, 한국등록특허 제1171347호에는 벼 유래의 전분가지화효소를 코딩하는 유전자로 형질전환된 식미가 향상된 벼 식물체의 제조방법에 대해 개시하고 있다. 하지만 본 발명의 *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자를 이용한 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태를 조절하는 방법 및 그에 따른 식물체에 대해 아직 개시된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 MNU(N-methyl-N-nitrosourea)를 벼 자포니카 품종인 화청벼에 처리하여 *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자의 발현 저해로 발생한 *sugary-2* 돌연변이체를 얻었으며, 상기 *sugary-2*는 야생형인 화청벼에 비해 배유의 당 함량이 증가되고 전분 함량이 감소되며, 두께가 얇아진 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [6] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-2 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태를 조절하는 방법을 제공한다.
- [7] 또한, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-2 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및
- [8] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 당 함량, 전분 함량 또는 형태가 조절된 배유를 가지는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 당 함량, 전분 함량 또는 형태가 조절된 배유를 가지는 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태 조절용 조성물을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자의 발현이 저해되어 야생형에 비해 식물체 배유의 당 함량이 증가되고 전분 함량이 감소되며, 두께가 얇아진 것을 특징으로 하는 돌연변이 벼 식물체를 제공한다.

발명의 효과

- [12] 본 발명자들은 MNU(N-methyl-N-nitrosourea)를 벼 자포니카 품종인 화청벼에 처리하여 *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자의 발현 저해로 발생한 *sugary-2* 돌연변이체를 얻었으며, 상기 *sugary-2*는 야생형인 화청벼에 비해 배유의 당 함량이 증가되고 전분 함량이 감소되며, *sugary-1* 돌연변이체와 야생형 종자 두께의 중간 형태를 보이는 것을 확인하였다. 이는 기존에 이미 밝혀진 *sugary-1* 돌연변이체와 비슷한 당질배유 특성을 가지면서도 형태적 실용성이 높아졌다고 볼 수 있다. 따라서, 본 발명은 식물체 배유 관련 품종 육성 및 품질 관련 연구에 유용하게 활용할 수 있으며, 특히 벼 품종의 향상된 품질 및 식미를 통해 우리 쌀의 경쟁력을 높임으로써 쌀 산업을 활성화하고 장차 최고 품질의 쌀 및 종자의

수출 가능성도 확보할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 야생형인 화청벼 및 돌연변이 식물체(sugary-1 및 sugary-2)의 종자 형태(a) 및 전분 함성 정도(b)를 나타낸 것이다.
- [14] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 돌연변이 식물체(sugary-1 및 sugary-2)의 표현형을 결정하는 *sug-1* 유전자(a) 및 *sug-2* 유전자(b)의 위치를 확인하기 위해 수행한 BSA(bulked segregant analysis) 분석 결과 및 상기 두 유전자의 공분리(co-segregation) 분석 결과(c)를 나타낸 것이다.
- [15] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 *sug-2*(*OsBEIIa*)-RNAi 개체와 sugary-2 개체의 교배집단에서 얻은 F₂ 종자들의 표현형과 F₂ 개체의 유전형간에 공분리 분석 결과(a) 및 상기 F₂ 개체 중 sugary-2의 표현형을 보인 개체들의 상대적인 RNA 발현 정도(b)를 나타낸 것이다.
- [16] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 sugary-2 돌연변이체의 캘러스를 유도해 *sug-2*(*OsBEIIa*) 유전자를 과발현시켜 얻은 T₁ 종자의 표현형 및 RNAi 형질전환으로 인해 표현형에 변화가 생긴 sugary-1 형태의 종자의 유전형을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [17] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-2 단백질 코딩 유전자를 포함하는 제조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태를 조절하는 방법을 제공한다.
- [18] 본 발명에 따른 SUG-1 단백질 및 SUG-2의 범위는 각각 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환, 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 3 및 서열번호 4로 각각 표시된 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 각각의 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.
- [19] 또한, 본 발명은 상기 SUG-1 단백질 및 SUG-2 단백질을 코딩하는 각각의 유전자를 제공한다. 본 발명의 *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자는 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태를 조절하는 특징이 있으며, SUG-1 단백질 및 SUG-2 단백질을 암호화하는 각각의 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 각각의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의

상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자는 서열번호 1 및 서열번호 2의 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 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[20] 본 발명의 상기 "유전자 발현 조절"은 식물체 내의 *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자의 발현을 증가시키거나 또는 감소시키는 것을 말한다.

[21] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해시켜 야생형에 비해 식물체 배유의 당 함량을 증가시키고 전분 함량을 감소시키는 것일 수 있으며, 바람직하게는 식물체 배유의 프럭토스, 글루코오스, 수크로오스, 말토오스 및 라피노오스 함량을 증가시키고 전분 함량을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[22] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해시켜 야생형에 비해 식물체 배유의 두께가 얇아진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[23] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자의 발현 저해는 RNAi 벡터 또는 T-DNA 벡터에 의해 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[24] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 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.

[25] 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 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[26] 식물 발현 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 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.

- [27] 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), 포스피노트리신(phosphinothricin) 및 글루포시네이트(glufosinate)와 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [28] 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [29] "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.
- [30] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및(또는) 조직배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 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),

식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EPA 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 바이너리 벡터 기술을 이용하는 것이다.

- [31] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 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), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [32] 또한, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-2 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및
- [33] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 당 함량, 전분 함량 또는 형태가 조절된 배유를 가지는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [34] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에서, 상기 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해시켜 야생형에 비해 식물체 배유의 당 함량을 증가시키고 전분 함량을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [35] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에서, 상기 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해시켜 야생형에 비해 식물체 배유의 두께가 얇아진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [36] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 당 함량, 전분 함량 또는 형태가 조절된 배유를 가지는 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.
- [37] 또한 본 발명에 따른 방법이 적용될 수 있는 식물체로는 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쪽갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양과 등의 단자엽 식물이 될 수 있으며, 바람직하게는 단자엽 식물이다. 상기 식물체는 바람직하게는 벼 식물체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [38] 또한, 본 발명은 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태 조절용 조성물을 제공한다.
- [39] 본 발명의 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태 조절용은 유효성분으로서 본 발명의 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태를

조절하는 *SUG-1* 단백질 코딩 유전자 및 *SUG-2* 단백질 코딩 유전자를 포함하며, 상기 단백질 각각의 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태를 조절할 수 있는 것이다. 바람직하게는 상기 *sug-1* 유전자 및 *sug-2* 유전자의 발현을 저해시켜 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태를 조절할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[40] 또한, 본 발명은 *SUG-1* 단백질 코딩 유전자 및 *SUG-2* 단백질 코딩 유전자의 발현이 저해되어 야생형에 비해 식물체 배유의 당 함량이 증가되고 전분 함량이 감소되며, 두께가 얇아진 것을 특징으로 하는 돌연변이 벼 식물체를 제공한다.

[41]

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

[43]

[44] 재료 및 방법

[45] 1. 식물 재료

[46] 화학적 돌연변이 약제인 MNU(N-methyl-N-nitrosourea)를 벼 자포니카 품종인 화청벼에 처리하여 *sugary-2* 돌연변이체를 얻었다. *sugary-2*는 당질배유 특성을 가지는 돌연변이체로, 기존에 보고된 *sugary-1* 돌연변이체(Koh et al., 1994., Journal of crop science., 39., 1-6)보다 당질배유 정도가 약간 감소했지만, *sugary-2*는 종자 두께가 더 두껍고 주름진 정도가 비교적 약하여 상업적 이용 가치가 높기 때문에 *sugary-1*과 구별하여 새롭게 이름을 명명하였다. 새로운 유형의 돌연변이체인 *sugary-2*의 유전 분석 및 분리를 위해 *sugary-2* 및 밀양 23호(통일형 인디카)의 교배집단인 F_2 및 F_3 를 이용하였고, 특히 F_3 집단은 F_2 에서 유래한 *sugary* 표현형을 보이는 개체를 선발하여 전개하였다. 분리비 확인과 공분리 분석을 위해 *sugary-2*와 화청벼를 교배하여 전개한 F_2 집단을 사용하였다.

[47]

[48] 2. 표현형 분석

[49] 개체별 표현형 분석을 위해서 F_1 , F_2 및 F_3 종자를 모두 박피하여 현미경으로 관찰하였다. 표현형 분석시 발생할 오류를 방지하기 위해 주 이삭의 종자 전체를 분석의 대상으로 하였으며, 주로 종자의 두께 및 주름진 정도를 중점적으로 관찰하였다. 종자 길이, 두께 등의 크기는 디지털 캘리퍼(digital caliper)로 측정하였으며, SPSS(Statistical Package for the Social Sciences)로 통계 분석하였다.

[50]

[51] 3. 유전자 지도(genetic mapping)

[52] *sugary-2*/밀양 23호의 F_2 및 F_3 집단을 이용하여 BSA(bulked segregant analysis)를 수행하였다. 목적에 따라 2회의 독립적인 BSA를 진행하였으며, 첫 번째는 전체적인 *sugary* 타입의 종자 표현형을 결정하는 유전자의 위치를 파악하기 위해 수행하였고, 두 번째는 *sugary* 타입의 개체들 중 특히나 그 두께가 더 두꺼운

sugary-2 타입의 표현형을 결정하는 유전자의 위치를 예측하기 위해 수행하였다. 표현형에 근거하여, 첫 번째 BSA에 사용할 벌크(bulk)는 F₂ 집단에서 sugary 개체 10개 및 정상 종자 개체 10개를 선발하여 같은 농도로 혼합하였고, 두 번째 BSA에 사용할 벌크(bulk)는 F₃ 집단에서 sugary-1 개체 10개(아주 납작한 종자 형태), sugary-2 개체 12개(조금 두꺼운 종자 형태) 및 정상 종자 개체 12개를 선발하여 역시 같은 농도로 혼합한 후 하기 실시예를 진행하였다. BSA에는 염색체에 고루 분포하는 STS(Sequence Tagged Sites) 마커를 이용하였다.

- [53] sugary-2/밀양 23호의 F₃ 집단은 F₂에서 표현형에 의해 선발하여 계통별로 전개하였다. 그 중에 *sug-1* 유전자는 고정되어 있고, *sug-2* 유전자는 분리하는 개체의 전개 집단을 이용하여 sugary-2 돌연변이체의 표현형을 결정하는 유전자의 구체적인 위치를 파악하였으며, STS 및 dCAPS 마커를 추가 제작하여 사용하였다.

[54]

[55] **4. 형질전환체 제작**

- [56] *sug-2* 유전자의 기능을 분석하기 위해, RNAi 및 과발현 형질전환체를 제작하였다. RNAi 벡터 구축은 *sug-1*의 291bp 부분 및 *sug-2*의 206bp 부분의 염기서열을 합성하여 pH7GWIWG(II) RNAi 벡터에 삽입하였고, 만들어진 최종 벡터를 야생형(wild-type, 동진벼)의 캘러스에 형질전환하였다. 과발현 벡터 구축은 *sug-2* 유전자 전체의 cDNA를 합성하여 과발현 벡터인 pMDC32에 삽입하였고, 최종 벡터를 sugary-2 돌연변이체에 형질전환하였다.

[57]

[58] **실시예 1. sugary-2 돌연변이체의 당질배유 특성**

- [59] 벼 자포니카 품종인 화청벼에서 유래한 당질배유 돌연변이체는 주름지고 반투명하며 유리당 함량이 높은 종자 특징을 가진다. 특히, sugary-2는 당질배유의 특징을 보이면서도 sugary-1보다 덜 주름지며 종자의 두께가 좀 더 두꺼워 도정이 가능하기 때문에 이미 알려진 sugary-1 돌연변이체에 비해 실용성이 우수하다. 요오드-요오드화 칼륨 용액으로 각 종자를 염색해 관찰한 결과, 화청벼의 경우 종자 단면의 전 영역이 염색된 반면, sugary-1 돌연변이체의 종자는 전혀 염색이 되지 않은 것을 볼 수 있었고, sugary-2 돌연변이체는 종자 바깥층에만 한정적으로 염색이 된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 전분 합성 정도에 있어서 sugary-2는 화청벼와 sugary-1의 중간 형태임을 알 수 있었다(도 1 및 표 1). 또한, 유리당 함량은 지타완 등(Jittawan Kubola et al., 2011., Food chemistry., 126., 972-981)의 방법을 약간 변형하여 분석하였다. 그 결과, 하기 표 2에 개시된 바와 같이 본 발명의 sugary-2 돌연변이체에서 야생형인 화청벼에 비해 약 2배 이상의 수크로오스 함량을 나타내었으며, 화청벼에 없는 프럭토스 및 라피노오스를 미량으로 함유하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[60] [표1]

화청벼 및 돌연변이체(sugary-1 및 sugary-2) 현미의 길이, 너비 및 두께 비교

식물 시료	길이(mm)	너비(mm)	두께(mm)	길이/너비 비율
화청벼	4.82b*	2.75a	1.98a	1.75c
sugary-1	4.91ab	2.29c	1.42c	2.15a
sugary-2	4.99a	2.52b	1.51b	1.98b

[61] *다른 알파벳은 유의한 차이가 있음을 의미하며, 각 시료는 10번씩 측정되었음.

[62] [표2]

화청벼 및 sugary-2 돌연변이체 현미의 당 함량 비교

식물 시료	프럭토스	글루코오스	수크로오스	말토오스	라피노오스	총 유리당
화청벼	ND ¹⁾	TR ²⁾	330.9±5.1 (1.6)	TR	ND	330.9
sugary-2*	TR	TR	705.3±0.5 (0.1)	TR	TR	705.3

[63] ¹⁾ ND : 검출되지 않음.[64] ²⁾ TR : 미량 검출됨(기기 상 LOQ 이하의 양이 검출되었음).

[65]

[66] 실시예 2. *sug-2(OsBEIIa)* 유전자에 관한 유전분석

[67] *sugary-2* 돌연변이체의 형질에 관여하는 유전자를 분석하기 위해 *sugary-2*와 밀양 23호(M.23)를 교배하여 만든 집단의 유전분석을 실시하였다. *sugary-2*/M.23 집단의 F₁ 종자는 모두 정상이었기 때문에 *sugary-2*의 당질배유 표현형은 열성 유전자라고 예측할 수 있었다. 그 후 F₁ 식물체에서 얻은 F₂ 종자를 전량 수확하여 표현형에 따라 구분해 본 결과, 전체 334개의 종자 중 271개가 정상 표현형을, 81개가 *sugary* 표현형을 보였고 이는 3:1 분리비에 부합하였다. 따라서 *sugary* 표현형은 한 개의 열성 유전자에 의해 결정된다고 예상할 수 있었다. 그런데 81개의 *sugary* 표현형 종자를 *sugary-1*의 종자(매우 납작한 종자 형태)와 *sugary-2*의 종자(조금 두꺼운 종자 형태)로 구분했을 때, *sugary-1* 타입은 57개, *sugary-2* 타입은 24개로, *sugary-2*의 분리 양상이 12:3:1을 나타내었다. 이는 유전자 상위효과(epistatic interaction)에 의한 것으로, 결국 *sugary-2* 돌연변이체의 회복된 당질배유 표현형은 상위작용을 하는 두 개의 유전자인 *sug-1* 및 *sug-2*에 의해 결정된다고 사료된다.

[68] [표3]

화청벼 및 sugary-2 돌연변이체의 교배집단에서 F₂ 종자의 표현형 분리

교배 집단	종자 수				$\chi^2_{0.05}(12: 3:1)$	P value
	정상 타입	sugary-1 타입	sugary-2 타입	총		
화청벼/sugary-2	271	57	24	352	1.595	0.451
sugary-2/화청벼	152	28	11	191	2.312	0.315

[69]

[70] 실시예 3. 당질배유 형질을 결정하는 상위 유전자 탐색

[71] 벼 종자의 당질배유 형질에 관여하는 상위 유전자를 탐색하기 위해, sugary-2/밀양 23호(M.23)의 F₂ 집단을 사용하였다. 첫 번째 수행한 BSA(bulked segregant analysis)에서, 벌크(bulk)의 표현형을 sugary 타입 및 정상(normal) 타입으로만 나누어 진행하였으며, 그 결과 도 2a에 개시된 바와 같이, 염색체 8번(Chr.8)에서 마커 유전형과 당질배유 표현형이 공분리하는 것을 확인하였다. 정확한 위치는 S08105와 S08107 마커 사이였으며, 내로우 다운(narrow down)을 수행한 후 염기서열을 분석해본 결과, Os08g40930(*isoamylase1*, *OsISA1*)이 후보 유전자임을 알 수 있었고, 이 유전자는 2005년에 코보 등(Kubo A et al., 2005., Plant physiology., 137., 43-56)에 의해 보고가 되었다. 결론적으로, *sug-1*(*OsISA1*) 유전자에 의해 전반적인 sugary 표현형이 결정된다고 할 수 있고, 상기 *sug-1*(*OsISA1*) 유전자는 우선적으로 당질배유 표현형을 결정하는 상위 유전자로 작용한다는 것을 확인할 수 있었다.

[72]

[73] 실시예 4. 당질배유 중에 종자 두께가 회복된 형질을 결정하는 하위 유전자 탐색

[74] 상기 실시예 3에서의 분리비 분석 결과, F₂ 집단의 sugary 종자가 sugary-1 종자(매우 납작한 종자 형태) 및 sugary-2 종자(조금 두꺼운 종자 형태)로 구분되었고, *sug-1*(*OsISA1*) 유전자가 우선적으로 작용한 후 분리되는 표현형이다. 종자 두께를 회복시키는 유전자를 추가로 탐색하기 위해, sugary-2/밀양 23호(M.23)의 F₃ 집단으로 벌크(bulk)를 만들어 두 번째 BSA를 수행한 결과, 도 2b에 개시된 바와 같이 염색체 4번(Chr.4)에서 sugary-2(두께가 회복된 당질배유 형질) 표현형과 마커 유전형이 공분리하는 것을 확인하였다. 추가적으로 내로우 다운(narrow down)을 수행한 결과, 자체 제작한 dCAPS 마커인 AL731A 및 AL731B 사이에 후보 유전자가 있을 것으로 예상하였고, 염기서열을 분석한 후 Os04g33460(*rice starch branching enzyme 4* 또는 *starch branching enzyme IIa*; *OsBEIIa*)이 sugary-2 형질과 연관된 후보 유전자라 결론지었다. 즉, *sug-2*(*OsBEIIa*) 유전자는 상기 실시예 3의 결과와 같이 상위

유전자 *sug-1(OsISA1)*가 작용할 때 그 효과가 나타나는 하위 유전자이고, *sug-2(OsBEIIa)* 유전자의 돌연변이는 납작한 당질배유를 약간 회복시키는 역할을 하는 것으로 사료된다. 또한, dCAPS 마커를 이용하여 공분리 분석을 수행하였는데, 두 개의 후보 유전자가 *sugary-2*/화청벼의 F₂ 개체들에서 표현형과 유전형이 공분리하는 것을 확인하였고, 이는 두 개 유전자의 돌연변이가 *sugary-2* 돌연변이체의 표현형을 결정한다는 것을 간접적으로 증명한 결과이다.

[75]

[76] 실시예 5. 형질전환 기법을 통한 후보 유전자의 기능 확인

[77] *sugary-2* 돌연변이체의 표현형은 두 개의 유전자(*sug-1* 및 *sug-2*)에 의해 결정이 되므로, 후보 유전자의 기능을 확인하기 위해 두 개의 유전자 모두를 이용하여 형질전환을 시도하였다. 야생형인 동진벼 종자에서 캘러스를 유도하여 RNAi 기법을 이용해 두 유전자를 각각 불활성화하였고, *sug-1(OsISA1)* 및 *sug-2(OsBEIIa)* 유전자가 독립적으로 불활성화된 RNAi 개체를 얻을 수 있었다. *OsISA1*-RNAi 개체의 T₁ 종자 표현형을 확인한 결과, *sugary-1* 돌연변이체의 종자와 같은 납작한 당질배유 형태를 보였고, 첫 번째 후보 유전자인 *OsISA1*의 효과를 입증할 수 있었다(도 3). 그러나 *sug-2(OsBEIIa)* 유전자는 독립적으로 작용하지 않기 때문에 육안으로 보는 표현형에서는 별다른 차이를 보이지 않았다. *sug-2(OsBEIIa)* 유전자의 기능을 간접적으로 확인하기 위해, 형질전환체를 인공교배의 재료로 사용해서 교배 종자의 분리 양상을 관찰하였다. *OsBEIIa*-RNAi 선발 개체와 *sugary-2* 돌연변이체를 교배하였고, *OsBEIIa*-RNAi/*sugary-2*에서 얻은 F₂ 종자들의 표현형과 F₂ 개체의 유전형이 서로 공분리함을 확인하였다(도 3).

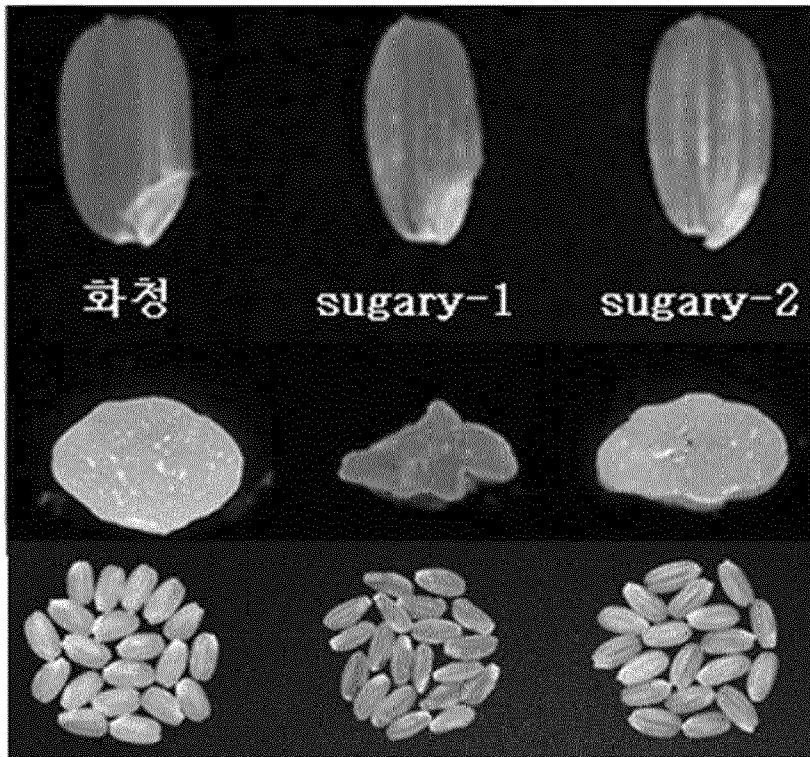
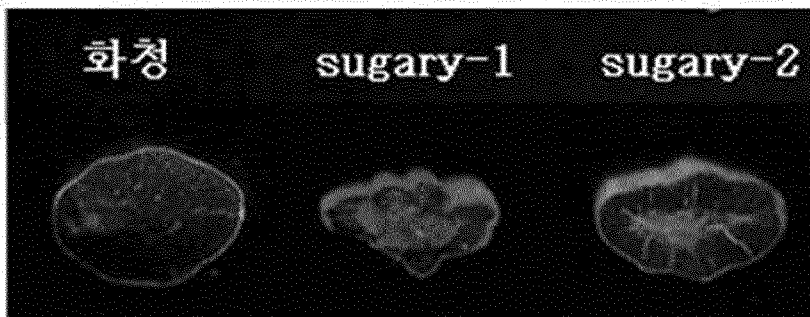
[78]

또한, *sugary-2* 돌연변이체의 캘러스를 유도해 *sug-2(OsBEIIa)* 유전자를 과발현시켰을 때, *sugary-2* 형질을 결정하는 유전자 두 개 중 하위 유전자 하나만 발현이 회복될 것이다. 따라서 예상할 수 있는 결과는, 상위 유전자 *sug-1(OsISA1)* 하나만 문제가 생겨 나타나는 표현형인 아주 납작한 종자가 과발현 형질전환체에서 발견될 것이고, 그 납작한 표현형을 지니는 종자의 유전형은 모두 과발현 벡터 DNA를 보유하고 있을 것이다. 실제 과발현 개체를 획득한 결과, 위에서 예상한 결과와 일치하는 개체를 얻을 수 있었고, 이는 상기 유전자 *sug-1(OsISA1)* 및 *sug-2(OsBEIIa)*를 어떤 조합으로 조절하는가에 따라 당질배유의 정도를 조절할 수 있다는 가능성을 보여준 결과이다(도 4).

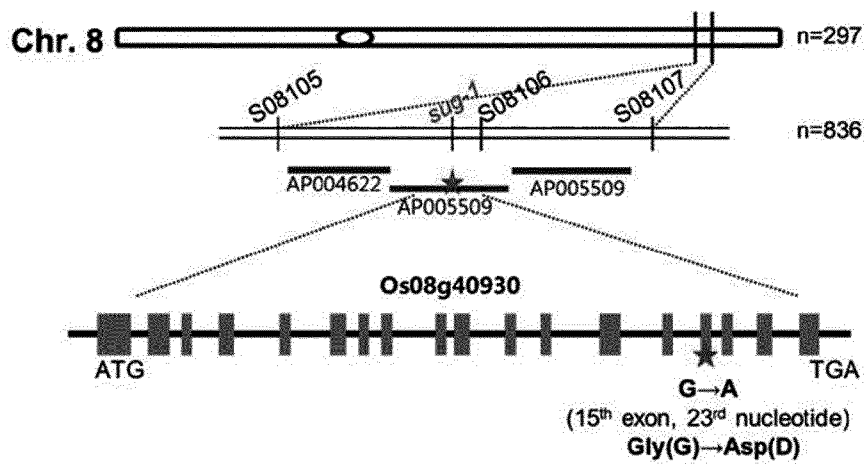
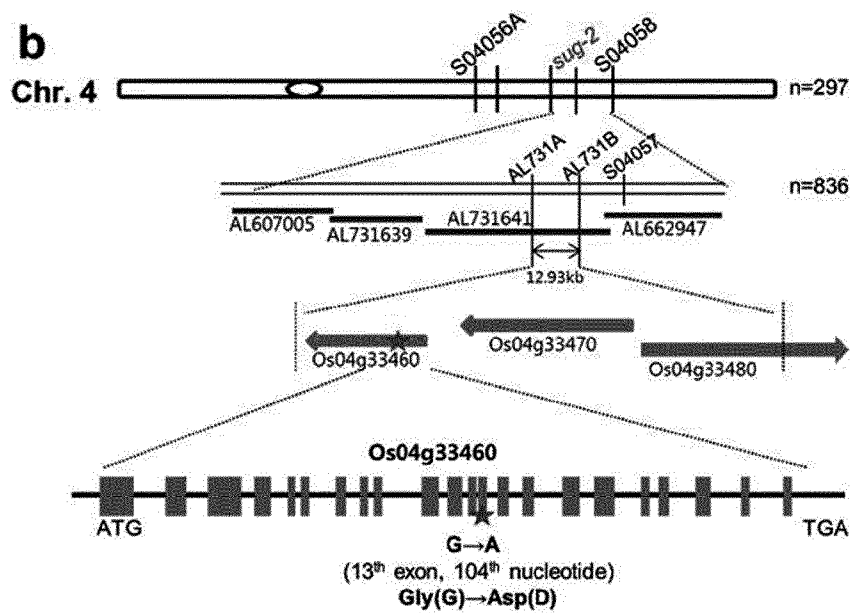
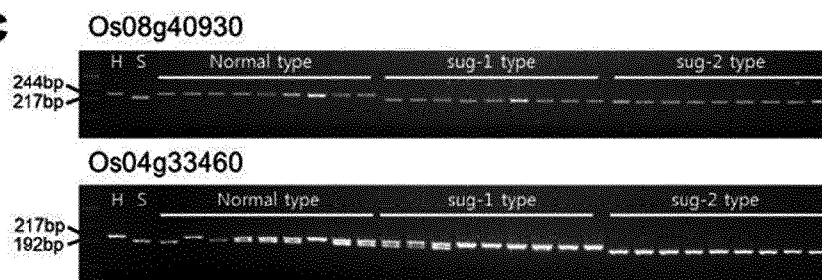
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-2 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 당 함량, 전분 함량 또는 형태가 조절된 배유를 가지는 형질전환 식물체의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해시켜 야생형에 비해 당 함량이 증가되고 전분 함량이 감소된 배유를 가지는 형질전환 식물체의 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 SUG-2 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해시켜 야생형에 비해 식물체 배유의 두께가 얇아진 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체의 제조방법.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 당 함량, 전분 함량 또는 형태가 조절된 배유를 가지는 형질전환 식물체.
- [청구항 5] 제4항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.
- [청구항 6] 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-2 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체 배유의 당 함량, 전분 함량 또는 형태 조절용 조성물.
- [청구항 7] 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-1 단백질 코딩 유전자 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 SUG-2 단백질 코딩 유전자의 발현이 저해되어 야생형에 비해 식물체 배유의 당 함량이 증가되고 전분 함량이 감소되며, 두께가 얇아진 것을 특징으로 하는 돌연변이 벼 식물체.

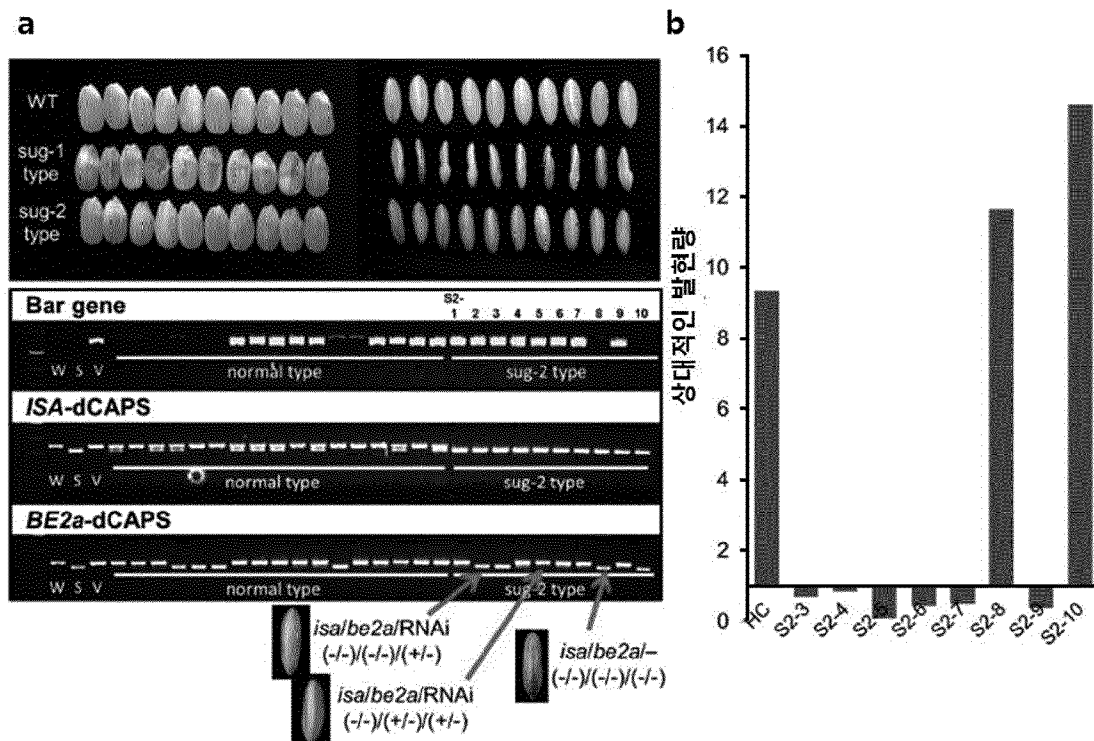
[도1]

a**b**

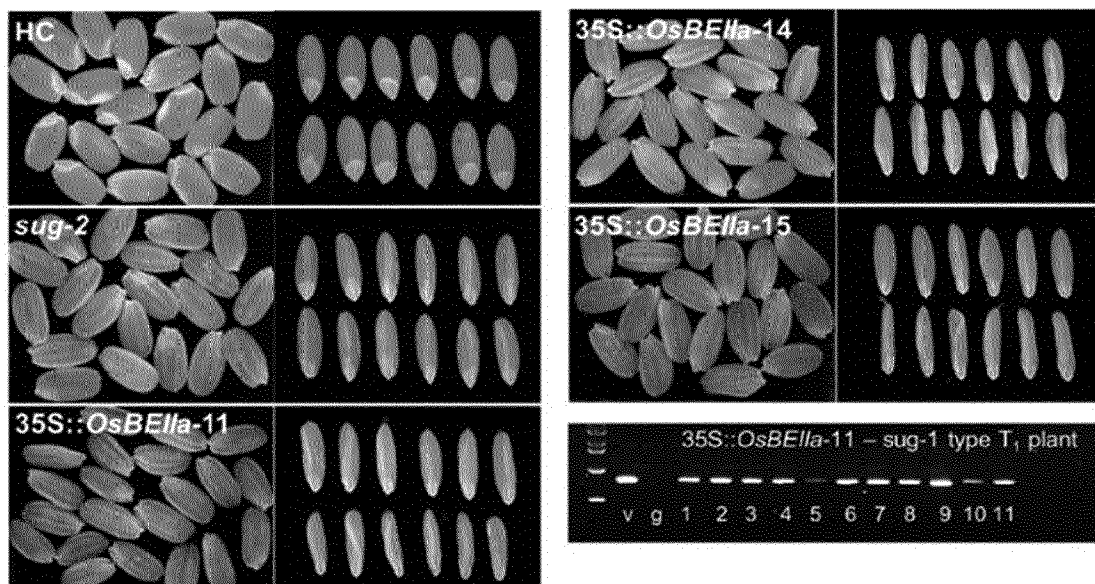
[도2]

a**b****c**

[도3]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/013399**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12N 15/82(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i, A01H 5/10(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/82; A01H 1/04; A23L 7/196; A23L 1/10; A01H 5/00; C12N 15/113; A01H 5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: SUG-1, SUG-2, sugar, starch, form, albumen, transgenic plant

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2012-0089869 A (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 14 August 2012 See abstract; claims 1-31.	1-7
A	UTSUMI et al., "Functional Diversity of Isoamylase Oligomers: the ISA1 Homo-oligomer is Essential for Amylopectin in Biosynthesis in Rice Endosperm", Plant Physiology, vol. 156, pages 61-77 (2011) See the entire document.	1-7
A	SONNEWALD et al., "Starches-from Current Models to Genetic Engineering", Plant Biotechnology Journal, vol. 11, pages 223-232 (2013) See the entire document.	1-7
A	US 2011-0045127 A1 (RAL et al.) 24 February 2011 See the entire document.	1-7
A	WO 2011-019331 A1 (ABBOTT & COBB, INC.) 17 February 2011 See the entire document.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 MARCH 2017 (06.03.2017)

Date of mailing of the international search report

06 MARCH 2017 (06.03.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

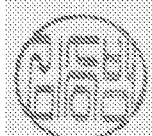
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/013399

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0089869 A	14/08/2012	AU 2004-284112 A1	06/05/2005
		AU 2004-284112 B2	08/07/2010
		CN 1886507 A	27/12/2006
		CN 1886507 B	29/12/2010
		EP 1692289 A1	23/08/2006
		EP 1692289 B1	25/01/2012
		JP 2007-511207 A	10/05/2007
		JP 2012-179055 A	20/09/2012
		JP 5567062 B2	06/08/2014
		KR 10-2007-0001057 A	03/01/2007
		US 2007-0300319 A1	27/12/2007
		US 2011-0059225 A1	10/03/2011
		US 7790955 B2	07/09/2010
		US 8188336 B2	29/05/2012
		WO 2005-040381 A1	06/05/2005
US 2011-0045127 A1	24/02/2011	AU 2008-329557 A1	04/06/2009
		AU 2008-329557 B2	14/08/2014
		CA 2706805 A1	04/06/2009
		CN 101970668 A	09/02/2011
		CN 101970668 B	07/05/2014
		EP 2222855 A1	01/09/2010
		EP 2222855 A4	24/08/2011
		JP 2011-504728 A	17/02/2011
		JP 5695422 B2	08/04/2015
		WO 2009-067751 A1	04/06/2009
WO 2011-019331 A1	17/02/2011	AU 2009-351092 A1	09/02/2012
		AU 2009-351092 B2	04/06/2015
		AU 2010-282964 A1	17/02/2011
		AU 2010-282964 B2	30/04/2015
		CA 2769182 A1	17/02/2011
		CA 2769183 A1	17/02/2011
		EP 2464213 A1	20/06/2012
		EP 2464215 A1	20/06/2012
		EP 2464215 A4	19/12/2012
		JP 2012-514471 A	28/06/2012
		JP 2012-516136 A	19/07/2012
		JP 2015-077130 A	23/04/2015
		JP 5727384 B2	03/06/2015
		JP 5875661 B2	02/03/2016
		US 2011-0041204 A1	17/02/2011
		US 8822756 B2	02/09/2014
		WO 2011-019391 A1	17/02/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/82(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i, A01H 5/10(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/82; A01H 1/04; A23L 7/196; A23L 1/10; A01H 5/00; C12N 15/113; A01H 5/10 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: SUG-1, SUG-2, 당, 전분, 형태, 배유, 형질전환 식물체																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2012-0089869 A (코몬웰스 싸이언티픽 엔드 인더스트리얼 리서치 오가니제이션) 2012.08.14 요약; 청구항 1-31 참조.</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>UTSUMI 등, 'Functional diversity of isoamylase oligomers: the ISA1 homo-oligomer is essential for amylopectin biosynthesis in rice endosperm' Plant Physiology, Vol.156, pages 61-77 (2011) 전체 문헌 참조.</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SONNEWALD 등, 'Starches-from current models to genetic engineering' Plant Biotechnology Journal, Vol.11, pages 223-232 (2013) 전체 문헌 참조.</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2011-0045127 A1 (RAL 등) 2011.02.24 전체 문헌 참조.</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2011-019331 A1 (ABBOTT & COBB, INC.) 2011.02.17 전체 문헌 참조.</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	KR 10-2012-0089869 A (코몬웰스 싸이언티픽 엔드 인더스트리얼 리서치 오가니제이션) 2012.08.14 요약; 청구항 1-31 참조.	1-7	A	UTSUMI 등, 'Functional diversity of isoamylase oligomers: the ISA1 homo-oligomer is essential for amylopectin biosynthesis in rice endosperm' Plant Physiology, Vol.156, pages 61-77 (2011) 전체 문헌 참조.	1-7	A	SONNEWALD 등, 'Starches-from current models to genetic engineering' Plant Biotechnology Journal, Vol.11, pages 223-232 (2013) 전체 문헌 참조.	1-7	A	US 2011-0045127 A1 (RAL 등) 2011.02.24 전체 문헌 참조.	1-7	A	WO 2011-019331 A1 (ABBOTT & COBB, INC.) 2011.02.17 전체 문헌 참조.	1-7
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
A	KR 10-2012-0089869 A (코몬웰스 싸이언티픽 엔드 인더스트리얼 리서치 오가니제이션) 2012.08.14 요약; 청구항 1-31 참조.	1-7																		
A	UTSUMI 등, 'Functional diversity of isoamylase oligomers: the ISA1 homo-oligomer is essential for amylopectin biosynthesis in rice endosperm' Plant Physiology, Vol.156, pages 61-77 (2011) 전체 문헌 참조.	1-7																		
A	SONNEWALD 등, 'Starches-from current models to genetic engineering' Plant Biotechnology Journal, Vol.11, pages 223-232 (2013) 전체 문헌 참조.	1-7																		
A	US 2011-0045127 A1 (RAL 등) 2011.02.24 전체 문헌 참조.	1-7																		
A	WO 2011-019331 A1 (ABBOTT & COBB, INC.) 2011.02.17 전체 문헌 참조.	1-7																		
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2017년 03월 06일 (06.03.2017)		국제조사보고서 발송일 2017년 03월 06일 (06.03.2017)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 																		

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0089869 A	2012/08/14	AU 2004-284112 A1 AU 2004-284112 B2 CN 1886507 A CN 1886507 B EP 1692289 A1 EP 1692289 B1 JP 2007-511207 A JP 2012-179055 A JP 5567062 B2 KR 10-2007-0001057 A US 2007-0300319 A1 US 2011-0059225 A1 US 7790955 B2 US 8188336 B2 WO 2005-040381 A1	2005/05/06 2010/07/08 2006/12/27 2010/12/29 2006/08/23 2012/01/25 2007/05/10 2012/09/20 2014/08/06 2007/01/03 2007/12/27 2011/03/10 2010/09/07 2012/05/29 2005/05/06
US 2011-0045127 A1	2011/02/24	AU 2008-329557 A1 AU 2008-329557 B2 CA 2706805 A1 CN 101970668 A CN 101970668 B EP 2222855 A1 EP 2222855 A4 JP 2011-504728 A JP 5695422 B2 WO 2009-067751 A1	2009/06/04 2014/08/14 2009/06/04 2011/02/09 2014/05/07 2010/09/01 2011/08/24 2011/02/17 2015/04/08 2009/06/04
WO 2011-019331 A1	2011/02/17	AU 2009-351092 A1 AU 2009-351092 B2 AU 2010-282964 A1 AU 2010-282964 B2 CA 2769182 A1 CA 2769183 A1 EP 2464213 A1 EP 2464215 A1 EP 2464215 A4 JP 2012-514471 A JP 2012-516136 A JP 2015-077130 A JP 5727384 B2 JP 5875661 B2 US 2011-0041204 A1 US 8822756 B2 WO 2011-019391 A1	2012/02/09 2015/06/04 2011/02/17 2015/04/30 2011/02/17 2011/02/17 2012/06/20 2012/06/20 2012/12/19 2012/06/28 2012/07/19 2015/04/23 2015/06/03 2016/03/02 2011/02/17 2014/09/02 2011/02/17