



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월09일
(11) 등록번호 10-2286809
(24) 등록일자 2021년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/11 (2013.01)
A01H 1/06 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2020-0017985
(22) 출원일자 2020년02월13일
심사청구일자 2020년02월13일
(56) 선행기술조사문헌
GenBank Accession Number AP014957.1
(2015.10.10.)*
GenBank Accession Number XM_015773000.2
(2018.08.07.)*
GenBank Accession Number XP_015628486.1
(2018.08.07.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
전종성
경기도 안양시 동안구 동안로 101, 103동 1302호 (호계동, 목련선경아파트)
이상규
경기도 용인시 기흥구 서천동로 60, 408동 1103호(서천동, 서천마을4단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 9 항

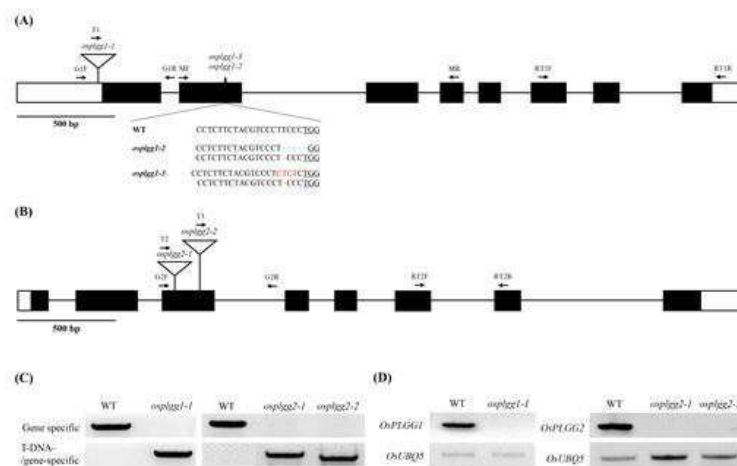
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 벼 광호흡 대사체 수송을 위한 OsPLGG1 유전자 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 벼 광호흡 대사체 수송을 위한 OsPLGG1 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 식물체의 성장을 조절하는 OsPLGG1(Oryza sativa plastidic glycolate/glycerate translocator 1) 유전자를 제공한다. 본 발명에 따른 이러한 형질전환 식물체를 공급함으로써 생산성 향상 및 원활한 농산물 공급이 가능하게 될 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/8201 (2013.01)

(72) 발명자

이대우

경기도 수원시 영통구 덕영대로1555번길 20, 944동
1401호(영통동, 벽적골롯데아파트)

심수현

경기도 용인시 기흥구 서천서로20번길 8-4, 수인빌
201호(서천동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ013172012019

부처명 농림축산식품부

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)

연구과제명 벼 생산성 증대 최적화 Sucrose Flux 조절 기작의 확립

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경희대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 표시되는 OsPLGG1(Oryza sativa plastidic glycolate/glycerate translocator 1) 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는, 성장이 조절된 OsPLGG1 형질전환 식물체 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 수수, 옥수수 및 기장으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 성장이 조절된 OsPLGG1 형질전환 식물체 제조방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계는 프로모터에 상기 유전자를 작동 가능하게 연결한 재조합 발현 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 것을 특징으로 하는, 성장이 조절된 OsPLGG1 형질전환 식물체 제조방법.

청구항 6

제1항의 방법에 의해 제조된 성장이 조절된 형질전환 식물체.

청구항 7

제6항의 성장이 조절된 형질전환 식물체의 종자.

청구항 8

서열번호 1의 염기서열로 표시되는 벼 유래의 OsPLGG1 (Oryza sativa plastidic glycolate/glycerate translocator 1) 유전자를 포함하는, 식물체의 성장 조절용 재조합 벡터.

청구항 9

제8항의 재조합 벡터로 형질전환된 식물체의 성장을 증진시키는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 수수, 옥수수 및 기장으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인 식물체의 성장을 증진시키는 방법.

청구항 11

서열번호 1의 염기서열로 표시되는 벼 유래의 OsPLGG1 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 함유하는 식물체의 성장 증진용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벼 광호흡 대사체 수송을 위한 OsPLGG1 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 리불로스-1,5-비스포스페이트 카르복실라제/옥시게나제 (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)(Rubisco)는 광합성 동안 이산화탄소에서 carboxylate ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP)로 탄소를 고정시킨다. 시아노박테리아, 조류 및 식물에 의한 산소 광합성의 결과 대기 중의 산소 함량이 증가하면서, 증가한 O_2 는 CO_2 와 O_2 모두에 결합 친화성을 갖는 Rubisco에 결합하기 위해 CO_2 와 경쟁하기 시작했다. Rubisco에 의해 O_2 가 고정되면, 독성 화합물 2-포스포글리콜레이트 (2-phosphoglycolate)(2-PG)가 생성되는데 (Anderson, 1971), 이것을 3-포스포글리콜레이트 (3-phosphoglycerate)(3-PGA)로 해독하고 Calvin-Benson-Bassham cycle로 재순환시키는 과정이 광호흡이다. 따라서 광호흡은 소모적인 경로로 간주되기도 하지만, 자연계에서 광합성에 이어 두 번째로 큰 탄소 흐름을 차지한다 (Sharkey, 1988).

[0003] 광호흡 경로는 여러 소기관 즉 엽록체, 퍼옥시좀, 미토콘드리아 및 시토솔 (세포기질)에 걸쳐 분획되어있다. 엽록체, 특히 스트로마에서 2-PG 포스파타제 (2-PG phosphatase)(PGP)는 2-PG를 글리콜레이트로 가수분해하여 퍼옥시좀으로 내보낸다. 퍼옥시좀에서 글리콜레이트는 글리콜레이트 옥시다제 (Glycolate oxidase)(GOX)에 의해 글리옥살레이트로 비가역적으로 산화되며, 부산물인 H_2O_2 는 카탈라제 (CAT)에 의해 분해된다.

[0004] 이어서, 세린:글리옥살레이트 아미노트랜스퍼라제 (serine:glyoxylate aminotransferase)(SGT) 및 글루타메이트:글리옥살레이트 아미노트랜스퍼라제 (glutamate:glyoxylate aminotransferase)(GGT)의 두 효소는 각각 독립적으로 글리옥살레이트로부터 글리신으로 아미노기 전이를 일으킨다. 아미노기 공여체로서, SGT는 세린을 사용하고 GGT는 글루타메이트를 사용한다. 글리신은 미토콘드리아로 이동하여 세린 히드록시메틸트랜스퍼라제 (serine hydroxymethyltransferase)(SHMT)의 탈아미노화와 글리신 디카복실라제 (glycine decarboxylase)(GDC)의 탈카르복실화의 연속적 반응에 의해 세린, CO_2 및 암모니아로 전환된다. 세린은 퍼옥시좀으로 다시 수송되어 SGT의 글리옥살레이트에서 글리신으로의 아미노기 전이에 이용되며, 이 때 생성된 히드록시피루베이트는 히드록시피루베이트 환원효소 (hydroxypyruvate reductase)(HPR)에 의해 글리세레이트로 환원된다. 글리세레이트는 다시 엽록체로 돌아가 글리세레이트 키나제 (glycerate kinase)(GLYK)에 의해 인산화되어 3-PGA를 생성하며, 이는 최종적으로 RuBP로 재순환된다. 이 경로에서, 2 분자의 2-PG로부터 1 개의 CO_2 분자가 방출되고 3 개의 탄소가 Calvin-Benson-Bassham cycle로 재순환된다 (Ogren, 1984; Bauwe et al., 2010; Eisenhut et al., 2019).

[0005] 광호흡은 서로 다른 여러 세포 소기관에 걸쳐 진행되기 때문에, 정상적인 기능을 하기 위해서는 수많은 막 수송 단계가 필요하다 (Reumann and Weber, 2006; Peterhansel et al., 2010). 광호흡 경로 자체 및 그에 필요한 효소는 잘 규명되어 있지만, 각 세포 소기관들 사이의 대사 흐름을 촉매하는 수송 단백질에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 예를 들어, 애기장대에서 엽록체의(plastidic) DiT1 및 DiT2는 각각 광호흡 과정 동안 질소 재순환에 관여하는 2-옥소글루타레이트/말레이트 수송체와 글루타메이트/말레이트 수송체임이 처음으로 밝혀졌으며 (Somerville and Ogren, 1983; Somerville and Somerville, 1985; Renné et al., 2003; Schneidereit et

al., 2006), 미토콘드리아의 수송 단백질인 A BOUT DE SOUFFLE (BOU)은 적절한 글리신 탈카르복실라제 활성에 필요한 글루타메이트를 수송하는 것으로 밝혀졌다 (Eisenhut et al., 2013; Porcelli et al., 2018). 최근 포유류 탈공여 단백질 1 (homologs of the mammalian uncoupling protein 1)의 상동 유전자인 애기장대 UCP1 및 UCP2가 미토콘드리아막에서 아스파라테이트/글루타메이트 교환을 촉매하여 광호흡에서 미토콘드리아의 환원 당량 감소에 기여한다는 것이 규명되었다 (Monn^É et al., 2018). 이전에 발표된 논문에서, 애기장대 엽록체 글리콜레이트/글리세레이트 트랜스포터 1 (plastidic glycolate/glycerate transporter 1)(PLGG1)의 돌연변이 식물에서 엽록체 파괴로 인해 잎이 백화되는 표현형이 관찰되면서 이 유전자가 엽록체 발달에 관여하거나 세포 사멸에 관련된 기능을 할 것으로 예상했으나 (Yamaguchi et al., 2012; Yang et al. 2012), 이후 발표된 논문에서 PLGG1이 2 개의 글리콜레이트 분자와 1 개의 글리세레이트 분자를 각각 엽록체에서 퍼옥시좀, 그리고 퍼옥시좀에서 엽록체로 옮기는 것이 입증되었다 (Pick et al., 2013). 따라서, 애기장대 PLGG1의 기능상실 돌연변이인 *plgg1* 돌연변이체에서 보이는 증상은 독성을 가지는 글리콜레이트 및 글리세레이트의 축적 때문이다. 또한, *Arabidopsis bile acid sodium symporter* (BASS6)는 엽록체에서 글리콜레이트를 수송하는 것으로 밝혀졌으며, PLGG1 및 BASS6의 이중 기능상실 돌연변이체는 단일 돌연변이체와 비교하여 추가적인 성장결함, 글리콜레이트 축적 증가 및 광합성 속도 감소를 나타냈다 (South et al., 2017).

[0006] 이와 더불어 광호흡을 감소시켜 식물 성장 및 바이오매스 생산을 증대시키기 위해, 식물 형질전환을 통해 기존의 광호흡 경로를 우회하는 합성 경로를 발현시킨 여러 시도들이 있었다 (Kebeish et al., 2007; Maier et al., 2012; Shen et al., 2019; South et al. 2019). 예를 들어, 애기장대에서는 대장균 (*Escherichia coli*)에서 글리콜레이트 디하이드로게나제 (glycolate dehydrogenase), 글리옥살레이트 카볼리가제 (glyoxylate carboligase) 및 타르토닉 세미알데히드 리덕타제 (tartonic semialdehyde reductase)의 세 단백질을 암호화하는 5 개 유전자를 도입하여 바이오매스 생산이 증가됨이 확인되었다 (Kebeish et al., 2007). 벼의 경우, 글리콜레이트 옥시다제, 옥살레이트 옥시다제 및 카탈라제를 각각 인코딩하는 OsGL03, OsOX03 및 OsCATC 유전자에 엽록체 수송 펩티드를 도입하여 형질전환한 식물에서 식물 성장 및 바이오매스 생산이 크게 증가하는 것으로 나타났다 (Shen et al., 2019). 또한, PLGG1 안티센스 RNA를 이용하여 PLGG1의 발현을 낮춘 담배 식물에서 엽록체로 표적시킨 호박 유래 말레이트 합성효소 (malate synthase) 및 클라미도모나스 유래 글리콜레이트 디하이드로게나제 (glycolate dehydrogenase)를 도입하였을 때, 야생형에 비해 바이오매스 생산이 40 % 가량 증가되는 것이 입증되었다 (South et al., 2019).

[0007] 광합성율의 향상은 작물 생산성 향상을 위해 고려되는 주요 수단 중 하나이다. 이와 관련하여, 광호흡 대사의 우회를 위한 합성 경로는 더 많은 바이오매스를 생산하고 작물 수확량을 증가시킨다 (Kebeish et al., 2007; Shen et al., 2019). 흥미롭게도, 합성 글리콜레이트 이화 경로가 야생형 담배의 엽록체와 PLGG1의 발현이 감소된 담배의 엽록체에 각각 도입되었을 때, 후자는 식물 성장이 크게 향상되는 것으로 나타났다 (South et al., 2019). 따라서, 증가하는 세계 인구에 충분한 식량을 공급하기 위하여 벼를 포함한 작물의 획기적인 수확량 증가가 요구되며, 이를 위한 광호흡 우회 대사 경로의 발현의 효과를 극대화하기 위해서는 광호흡 대사에 관여하는 막 수송 단백질의 규명이 필수적이다.

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 벼 OsPLGG1를 동정하고, 세포 내 위치를 확인하였으며, OsPLGG1 돌연변이의 형태적, 생리학적, 생화학적 특성을 확인하였다. 따라서, 벼의 엽록체 글리콜레이트/글리세레이트 수송체인 OsPLGG1 (*Oryza sativa* plastidic glycolate/glycerate translocator 1)의 기능을 규명하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2019-0117806호

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) 1. PLGG1, a plastidic glycolate glycerate transporter, is required for photorespiration and defines a unique class of metabolite transporters, February 19, 2013.
(비특허문헌 0002) 2. Photorespiratory glycolate-glyoxylate metabolism, 10, May 2016.

(비특허문헌 0003) 3. Engineering a New Chloroplastic Photorespiratory Bypass to Increase, FEBRUARY 04, 2019.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 따라서, 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 본 발명의 목적은, 벼 OsPLGG1 (Oryza sativa Plastidic glycolate/glycerate transportelocator 1) 유전자를 동정하고 벼 광호흡 대사체 수송을 위한 OsPLGG1 유전자 및 이를 이용한 식물체를 제공한다.
- [0012] 이상에서의 본 발명에서 해결하고자 하는 다양한 과제들은 이에 한정하는 것이 아니라, 후술할 실시예 및 청구 범위에 기재된 사항을 통하여 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 분명하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 전술한 목적을 달성하기 위해 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 식물체 성장 조절용 OsPLGG1 유전자를 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 수수, 옥수수 및 기장으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 OsPLGG1 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명의 일실시예에 있어서, 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 OsPLGG1 (Oryza sativa plastidic glycolate/glycerate translocator 1) 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는, OsPLGG1 형질전환 식물체 제조방법을 제공한다.
- [0017] 여기서, 상기 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계는 프로모터에 상기 유전자를 작동 가능하게 연결한 재조합 발현 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 것일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 일실시예에 있어서, 제4항의 방법에 의해 제조된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0019] 또한, 상기 형질전환 식물체의 종자를 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명의 일실시예에 있어서, 서열번호 1로 표시되는 벼 유래의 OsPLGG1 (Oryza sativa plastidic glycolate/glycerate translocator 1) 유전자를 포함하는, 식물체의 성장 조절용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 식물체의 성장을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0022] 여기서 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 수수, 옥수수 및 기장으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명의 일실시예에 있어서, 서열번호 1로 표시되는 벼 유래의 OsPLGG1 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 함유하는 식물체의 성장 증진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0024] 전술한 바와 같이 광호흡은 그 중요성에도 불구하고 이와 관련된 수송 단백질의 연구는 미흡하다. 이러한 광호흡 대사체 수송단백질은 그 자체로 식물의 광호흡을 직접적으로 조절하고 광합성과 기타 대사들에 간접적으로 영향을 준다는 점과 더불어, 광호흡 대사를 우회하는 새로운 대사 경로의 발현을 통한 식물 생장 증진 방법에서 원래 광호흡 대사 경로를 차단시키는 데 중요한 역할을 할 수 있다는 점에 본 발명의 의의가 있다. 담배의 경우, 야생형에 광호흡 우회 대사 경로를 활성화 시키고 PLGG1 유전자의 RNAi 간섭 돌연변이를 통해 광호흡 과정을 억제한 후 광호흡 우회 대사 경로를 발현시킨 것의 비교를 통해 PLGG1 돌연변이를 이용한 식물이 생장 및 종자 수율의 증가 폭이 더 크다는 사실이 밝혀졌다. 벼에서는 광호흡 관련 수송단백질이 규명된 바가 없으나 광호흡 대사를 유지한 채로 우회 대사 경로를 활성화하여 종자 수율을 높인 보고가 있다. 이를 토대로 본 OsPLGG1

유전자의 발견은 벼 광호흡 우회 대사 관련 연구와 식물 생장 및 종자 수율 증대의 중요한 요소가 될 수 있다.

[0025]

이상에서의 본 발명에 따른 효과는 상기에 한정되는 것은 아니며, 기타 본 발명의 효과들은 후술할 실시예 및 청구범위에 기재된 사항을 통하여 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 분명하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026]

도 1은 본 발명의 OsPLGG1 돌연변이의 특성을 나타낸 것이다.

(A) 동진벼에서 T-DNA 삽입 기능상실 돌연변이 (*osplgg1-1*) 및 CRISPR/Cas9 유래 Indel 돌연변이 (*osplgg1-2* 및 *osplgg1-3*)의 위치를 갖는 OsPLGG1 유전자 구조의 도식적 표현. (B) 동진벼에서 T-DNA 삽입 기능상실 돌연변이 (*osplgg2-1* 및 *osplgg2-2*)의 위치를 갖는 OsPLGG2 유전자계놈 구조의 개략도. OsPLGG1과 OsPLGG2는 모두 8 개의 엑손 (블랙 박스)과 7 개의 인트론 (블랙 박스 사이의 선)으로 구성되며 5' 및 3' UTR 부위는 흰색박스로 표시된다. 화살표는 유전형 확인을 위한 계놈 DNA PCR 및 발현 확인을 위한 RT-PCR의 프라이머 위치를 나타낸다. 삼각형 도형은 T-DNA 삽입 위치를, 점은 CRISPR/Cas9의 표적 위치를, 기술된 서열 및 밑줄 친 서열은 각각 표적서열에 따른 변이 서열 및 PAM 서열을 나타낸다. (C) *osplgg1-1* (왼쪽) 및 *osplgg2-1* 및 *osplgg2-2* (오른쪽)의 계놈 DNA PCR 분석. 유전자 특이적 프라이머 (상단)는 WT 유전자를, T-DNA/유전자 특이적 프라이머 (하단)는 T-DNA 삽입 대립 유전자를 증폭시킨다. (D) *osplgg1-1* (왼쪽) 및 *osplgg2-1* 및 *osplgg2-2* (오른쪽)의 RT-PCR 분석. OsUBQ5는 내부 컨트롤로 사용되었다.

도 2는 본 발명의 *osplgg1* 돌연변이체의 표현형 분석을 나타낸 것이다. (A) 논에서 2 개월 동안 성장한 WT, *osplgg1-1*, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3* 돌연변이체의 성숙한 식물. 바 = 10cm. (B, C) WT, *osplgg1-1*, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3* 식물의 분얼 수 (B) 및 1000립 중량 (C). 실험은 각 라인 당 5 개의 독립적인 식물로 진행되었다. 오차 막대는 평균의 표준 오차 (SEM)를 나타낸다. **** $P < 0.0001$. 스튜던트 t-테스트는 통계적 차이를 보여주기 위해 사용되었다. (D) 논에서 자란 1 개월 된 WT 및 *osplgg1* 돌연변이 식물의 잎에서 WT, *osplgg1-1*, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3*의 광합성 탄소 감소율. 라인 당 4 개의 서로 다른 식물체를 이용하여 3 회 반복실험하였다. 오류 막대는 SEM을 나타낸다. **** $P < 0.0001$. (E) 식물 성장 챔버의 높은 높은 CO₂ 조건 하에서 1 개월 동안 자란 *osplgg1-1*, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3* 돌연변이 식물의 표현형 회복 관찰. 바 = 10cm. (F) 환경 성장 챔버에서 3 주 동안 각각 일반 대기 조건 (위)과 높은 CO₂ 조건(아래)에서 성장한 WT, *osplgg1-1*, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3* 식물의 잎.

도 3은 본 발명의 *osplgg1* 돌연변이체, *osplgg1-1*, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3*의 PS II 및 PS I 활성 분석을 나타낸 것이다. (A) PS II의 실제 광화학 양자 수율, Y(II). (B) PS II의 조절된 에너지 소실 양자 수율, Y(NPQ). (C) PS II의 비조절 에너지 소실 양자 수율, Y(NO). 분리된 잎은 화학선 조명 ($550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 280 초 처리 후 암처리 280 초로 회복시켰고, 포화 펄스는 20 초마다 적용하였다. (D) PS I의 광화학 에너지 변환 양자 수율, Y(I). (E) 공여체 제한으로 인한 PS I의 비광화학적 에너지 소실 양자 수율, Y(ND). (F) 수용체 제한으로 인한 PS I의 비광화학적 에너지 소실 양자 수율, Y(NA). 분리된 잎은 최대 P700 신호를 측정하기 전에 Calvin-Benson-Bassham 회로의 활성화를 위해 화학선 조명 ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)을 5 분 간 처리하였다. 라인 당 3 개의 서로 다른 식물체를 이용하여 4 회 반복실험하였다. 오류 막대는 SEM을 나타낸다. 스튜던트 t-테스트는 통계적 유의성을 보여주기 위해 사용되었다. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

도 4는 본 발명의 옥수수 원형질체에서 OsPLGG1-GFP의 세포 내 위치를 나타낸 것이다. (A) OsPLGG1-GFP 융합 작제물의 개략도. P35S, CaMV35S 프로모터; T35S, CaMV35S종결인자; Pnos, 노팔린 신타제 프로모터; Tnos, 노팔린 신타제 종결인자. HygR, 하이그로마이신 포스포트랜스라제 유전자. (B) 옥수수 원형질체에서의 GFP 위치. 왼쪽부터 형광 GFP 신호, 엽록소 자가 형광, 명시야상 및 병합된 이미지를 나타낸다.

도 5는 본 발명의 논에서 자란 지 1 개월 된 야생형 및 *osplgg1* 돌연변이 식물의 잎에서 대표적인 광호흡 대사체인 글리세레이트, 글리신, 글리콜레이트 및 세린의 축적량을 나타낸 것이다. 대사체의 상대적 수준은 샘플의 내부 표준인 리비톨 및 생중량을 고려하여 정규화하였다. 라인 당 3 개의 서로 다른 식물체를 이용하여 3 회의 반복실험을 수행하였다. 오류 막대는 SEM을 나타내며, 통계적 유의성을 판별하기 위해 스튜던트 t-테스트를 사용하였다. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.
- [0028] 본 발명은 벼 광호흡 대사체 수송을 위한 OsPLGG1 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.
- [0029] 광합성 탄소 고정의 주요 효소인 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (리불로스-1,5-비스포스페이트 카르복실라제/옥시게나제)는 기질로서 O_2 및 CO_2 를 모두 이용할 수 있다. O_2 를 고정시키면 독성 물질인 2-phosphoglycolate (2-포스포글리콜레이트)가 생성되는데, 이는 광호흡에 의해 해독되어 Calvin-Benson-Bassham cycle로 재순환된다. 광호흡을 완료하기 위해서는 막 횡단 수송체를 통해 3 개의 세포 소기관인 엽록체 (chloroplast), 퍼옥시좀 (peroxisome) 및 미토콘드리아 (mitochondria) 간의 대사산물 수송이 필요하다. 벼 (*Oryza sativa*)의 경우 광호흡 막 횡단 수송체에 대해서는 거의 알려져있지 않았다. 본 발명자들은, 벼 엽록체 글리콜레이트/글리세레이트 트랜스로케이터 1 (*Oryza sativa* plastidic glycolate/glycerate translocator1)(OsPLGG1) 유전자를 동정하였다. OsPLGG1 기능상실 돌연변이 라인인 *osplgg1-1*, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3*은 연한 녹색 잎, 분얼 수 감소 및 종자 중량 감소와 같은 광호흡 저해 생장 지연 표현형을 보였으며, 광계 I 및 II의 낮은 활성으로 인한 광합성 탄소 감소율을 나타냈다.
- [0030] 생물정보학적으로 예측된 N-말단 막 횡단 도메인과 함께, 엽록체 막에서 신호를 보인 OsPLGG1-GFP 융합 단백질의 세포 내 위치에 따라 OsPLGG1이 엽록체 막 횡단 단백질임을 확인하였다. 대사체 분석에서는 애기장대 PLGG1에 의해 수송되는 것으로 나타난 광호흡 대사체, 특히 글리콜레이트 및 글리세레이트가 벼 *osplgg1* 돌연변이체에서도 상당히 축적되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 OsPLGG1이 엽록체 글리콜레이트/글리세레이트 수송체로서 기능하며, 이 단백질이 벼의 광호흡 및 성장에 필요하다는 것을 의미한다.
- [0031] 본 발명에서는 벼 엽록체의 글리콜레이트/글리세레이트 수송체 (plastidic glycolate/glycerate translocator)로 기능하는 OsPLGG1 단백질 및 이의 유전자에 대하여 제시한다. 공개적으로 이용 가능한 데이터의 *in silico* 분석에서, 애기장대 엽록체 글리콜레이트/글리세레이트 수송체 (plastidic glycolate/glycerate translocator 1)의 벼 상동유전자인 OsPLGG1 및 OsPLGG2의 2 개의 후보 유전자가 제시된다. 두 유전자에 대한 돌연변이 식물 중 *osplgg1* 돌연변이는 연한 초록색 잎, 분얼 수와 종자 무게 감소 및 광합성을 감소와 함께 심각한 생장 지연을 나타냈으며 (도 2, 3), 이는 애기장대 *plgg1* 돌연변이체의 잎층상의 표백된 변형 및 생장 지연 표현형과도 일치하였다 (Pick et al., 2013). *osplgg1* 돌연변이체에서의 식물 생장 지연은 높은 (0.3 %) CO_2 조건 하에서 회복되었으며 (도 2), 이들 결과는 AtPLGG1의 기능적 상동체로서 OsPLGG1을 제시하였다. 대조적으로, OsPLGG2 돌연변이체인 *osplgg2-1* 및 *osplgg2-2*는 특별한 표현형을 보이지 않았다. OsPLGG1의 세포 내 위치는 옥수수 원형질체에서 OsPLGG1-GFP의 발현에 의해 엽록체 막으로 확인되었다 (도 4). *osplgg1* 돌연변이체에서의 대사체 분석에서는 애기장대 PLGG1에 의해 운반되는 것으로 밝혀진 글리콜레이트 및 글리세레이트를 포함하는 광호흡 대사체의 상당한 축적을 나타냈다 (Pick et al., 2013) (도 5). 따라서, 비활성화된 OsPLGG1 수송체로 인해 축적된 글리콜레이트 및 글리세레이트는 OsPLGG1이 엽록체 막을 가로지르는 글리콜레이트/글리세레이트 수송체로 기능할 수 있음을 시사한다. 본 발명자들은 *osplgg1* 돌연변이 체에서 2-PG의 환원량 감소가 식물에 유해한 영향을 미치고 결국 2-PG에서 3-PGA로의 전환이 제한되어 광합성 속도를 감소시킨다고 확인하였다. 이와 관련하여, 돌연변이체에서 수송체 제한으로 인한 PS I의 비광화학적 에너지 소실 양자 수율의 유의한 증가는 관찰할 수 없었으나, 돌연변이체에서 PS II 및 PS I의 유효 광화학 양자 수율의 현저한 감소가 나타남을 확인하였다 (도 3). PS II의 유효 광화학 양자 수율 또는 Fv/Fm의 변화는 돌연변이체의 PS II가 광억제 조명에 민감하다는 것을 보여 주었다. 따라서 본 발명에서 제시되는 OsPLGG1은 벼의 생산성을 향상시키고 벼의 광호흡을 이해하는데 좋은 기회를 제공할 수 있다.
- [0032] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 OsPLGG1 (*Oryza sativa* plastidic glycolate/glycerate translocator 1) 유전자를 제공한다.
- [0033] 본 발명에서 용어, “OsPLGG1” 는 서열번호 1로 표시되는 유전자를 의미할 수 있으나, 이와 실질적인 동일성 (substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 상기 실질적인 동일성은 서열번호 1의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인 (align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 또는 상기 유전자는 서열번호 1의 유전자가 코딩하는 단백질 OsPLGG1과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 의미할 수 있다.
- [0034] 상기 OsPLGG1 유전자는 벼 (*Oryza sativa* L.)에서 분리한 것일 수 있다.

- [0035] 본 발명에서 용어 “벼”는 학명이 *Oryza sativa* L이며, 일년생 초본식물이고, 본 발명에서의 벼에는 자포니카 (Japonica)형, 인디카 (Indica)형 및 자바니카 (Javanica)형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 상기 성장 조절은 식물체의 줄기 및 분얼 성장을 촉진시키고 종자 생산량을 증가시키는 것을 의미할 수 있다. 또한 식물체는 벼, 밀, 보리, 수수, 옥수수 및 기장으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0037] 상기 서열번호 1의 염기서열은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 OsPLGG1 단백질을 암호화한다.
- [0038] 상기 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 OsPLGG1 단백질은 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 cDNA로부터 생산될 수 있다.
- [0039] 상기 벡터는 OsPLGG1 유전자를 과발현시키기 위한 재조합 벡터인 것이 바람직하다. 본 명세서에서 사용된 용어, "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호화된 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.
- [0040] 본 명세서에서 사용된 용어, "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "발현 벡터"는 흔히 "재조합 벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "재조합 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.
- [0041] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 재조합 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pL₄ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다.
- [0042] 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), 글루포시네이트암모늄 (glufosinate ammonium) 또는 포스포노트리신 (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.
- [0043] 본 발명의 재조합 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 한정되지 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. "항시발현 (constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화 하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 항시발현 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 항시발현 프로모터는 선택 가능성을 한정하지 않는다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0045] 상기 식물체는 단자엽 식물일 수 있고, 구체적으로 벼, 밀, 보리, 수수, 옥수수 및 기장으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있고, 벼인 것이 가장 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 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, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체

의 전기천공법 (Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법 (Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법 (Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개 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 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.

[0047] 본 발명의 벡터가 도입되는 식물 세포는 세포가 식물로 재생될 수 있는 한 특정한 형태로 특별히 제한되는 것은 아니다. 이들 세포는, 예를 들면, 배양된 세포 부유물, 원형질체(protoplast), 잎 절편(leaf section) 및 캘러스(callus)를 포함한다.

[0048] 본 발명에서 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 OsPLGG1 (*Oryza sativa* plastidic glycolate/glycerate translocator 1) 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는, OsPLGG1 형질전환 식물체 제조방법을 제공할 수 있다.

[0049] 여기서 상기 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계는 프로모터에 상기 유전자를 작동 가능하게 연결한 재조합 발현 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 또한, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 OsPLGG1 단백질을 암호화하는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 유전자를 식물체에 발현시킴으로써 식물체의 성장 조절할 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조되고 조직 배양을 통해 성장이 촉진된 식물체 및 그 식물체의 종자를 제공한다.

[0052] 상기 식물체는 단자엽 식물일 수 있고, 구체적으로 벼, 밀, 보리, 수수, 옥수수 및 기장으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있고, 벼인 것이 가장 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 벼 유래의 OsPLGG1 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 함유하는 식물체의 성장 증진용 조성물을 제공한다.

[0054] 상기 본 발명의 조성물은 유효 성분으로서 OsPLGG1 유전자를 포함하며, 상기 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 성장을 조절하여 종자 생산을 증진할 수 있다.

[0056] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

[0057] <실시예 1> 실험 방법

[0058] 1-1 식물 재료

[0059] 자포니카 야생형 벼 (Japonica WT [Cultivar (cv.) Dongjin]) 및 모든 돌연변이 종자를 1/2 Murashige and Skoog (MS) 배지에서 발아시켜 10일 동안 재배한 후 토양으로 옮겼다. 벼 식물은 14/10 시간 (30/20℃)의 명/암 주기의 온실에서 또는 여름의 자연 환경 조건 하에서 LMO 실험용 논에서 재배되었다 (Eom et al., 2011). 높은 CO₂ 조건 하에서 돌연변이체의 표현형을 관찰하기 위해, WT 및 *osplgg1* 돌연변이체를 인공 환경 챔버에서 일반 대기과 0.3 % CO₂ 조건 하에서 14/10 시간 (30/25℃)의 명/암 주기로 성장시켰다.

[0061] 1-2 생물 정보학 분석

[0062] 애기장대 정보 자원 (TAIR, <https://www.arabidopsis.org/>)을 사용하여 AtPLGG1 (At1g32080)의 게놈 및 아미노산 서열을 획득하였다. 벼의 후보 유전자를 결정하기 위해 NCBI의 BLAST 도구 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 사용하였다. cDNA를 예측하기 위해 NCBI 및 MSU Rice Genome Annotation Project 버전 7에서 사용 가능한 모든 EST 및 cDNA 데이터가 사용되었다. 본 실시예에서 확인된 OsPLGG1의 염기서열은 서열번호 1로 나타내었다.

[0064] 1-3 T-DNA 삽입 돌연변이 라인의 분자적 분석

[0065] OsPLGG1 및 OsPLGG2에 대한 T-DNA 돌연변이체는 T-DNA 삽입 돌연변이체 풀 (Rice Functional Genomic Express Database; <http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE>)에서 동정되었다. *osplgg1-1*, *osplgg2-1* 및 *osplgg2-2* 동진 품종 기반 돌연변이체에 대해 1A-22337, 2D-21473 및 3A-12105 라인을 각각 선택하였다 (Jon et al., 2000;

Jeong et al., 2002; Jeong et al., 2006). OsPLGG1 및 OsPLGG2에 대한 동형접합 T-DNA 돌연변이 라인을 분리하기 위해, 프라이머 DNA G1F, G1R, G2F, G2R, T1, T2 및 T3을 사용하여 게놈 DNA PCR 분석을 수행하였다. 프라이머 쌍 G1F/G1R 및 G2F/G2R을 사용하여 각각 야생형의 OsPLGG1 및 OsPLGG2 유전자를 검출하였다. 프라이머 쌍 T1/G1R, T2/G2R 및 T3/G2R을 각각 *osplgg1-1*, *osplgg2-1* 및 *osplgg2-2*의 T-DNA 삽입 돌연변이체 대립 유전자 검출에 사용하였다. 야생형과 T-DNA 삽입 돌연변이체의 OsPLGG1 및 OsPLGG2 전사체 존재비는 프라이머 쌍 RT1F/RT1R 및 RT2F/RT2R을 각각 사용하여 정량적 RT-PCR을 통해 각각의 돌연변이체에서 측정되었다. 대조군으로 벼 유비퀴틴 5 (OsUBQ5; LOC_Os01g22490)를 프라이머 UBQ5F/UBQ5R로 검출하여 사용하였다 (표 1).

표 1

프라이머	염기서열
G1F	5' -ACCGGTTCTGACTTGATATTACCTTTGT-3' (서열번호 6)
G1R	5' -CGAGCTATAAAATCCATACATAGCTCAG-3' (서열번호 7)
G2F	5' -GTATGATTGAAATAATAGATGGCGCATG-3' (서열번호 8)
G2R	5' -TTAGAGTTGATGTGAAGTTTCTCAAGT-3' (서열번호 9)
T1	5' -GTGGTGCAGATGAATTCAGGGTC-3' (서열번호 10)
T2	5' -CTAGAGTCGAGAATTCAGTA-3' (서열번호 11)
T3	5' -ATCCAGACTGAATGCCACAGG-3' (서열번호 12)
RT1F	5' -CAACATTCTCGTTATACTCAACTG-3' (서열번호 13)
RT1R	5' -ACAAACAAAAACAAACTGATGTA-3' (서열번호 14)
RT2F	5' -CTGTGGCATCAACATTCTCGTTAT-3' (서열번호 15)
RT2R	5' -GAAGCTTGTCATCACTGCTTG-3' (서열번호 16)
UBQ5 F	5' -GACTACAACATCCAGAAGGAGTC-3' (서열번호 17)
UBQ5 R	5' -TCATCTAATAACCAGTTCGATTTC-3' (서열번호 18)
MF	5' -ATGTATGGATTTTATAGCTCGTCGG-3' (서열번호 19)
MR	5' -TGCACAACAAATGATTGGGTGAA-3' (서열번호 20)
FLCF	5'-AGAAGGAGAAGAAGAGAAGAGAAG-3' (서열번호 21)
FLCR	5'-TATTACAACGGAGACATAATCACA-3' (서열번호 22)

1-4 옥수수 원형질체에서 GFP 융합 단백질의 발현

OsPLGG1의 세포 내 위치를 결정하기 위해, 정지 코돈을 제거한 OsPLGG1 전장 cDNA를 프라이머 쌍 FLCF/FLCR로 증폭시켰다 (표 1). OsPLGG1 전장 cDNA는 서열번호 2에 나타내었고, OsPLGG1 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 3에 나타내었다. 생성된 정지 코돈이 없는 cDNA를 바이너리 벡터 pH7FWG2의 CaMV35S 프로모터와 GFP (Green Fluorescence Protein) 사이에 삽입하여 GFP 유전자에 인프렘 융합 (inframe fusion)시켰다 (Karimi et al., 2005). 제조된 벡터의 OsPLGG1-GFP 융합 단백질의 염기 서열은 서열번호 4에 나타내었다. 이후 제조된 벡터를 옥수수 원형질체로 형질전환시켰다 (Cho et al., 2009). 레이저 주사 공초점 현미경 (LSM 510 META; Carl Jeniss, Jena, Germany)을 이용하여 아르곤 레이저의 488 nm 라인 및 522 nm에서 GFP를 가시화하였다.

1-5 CRISPR / Cas9 돌연변이 라인 생성

효과적인 프로토스페이스 인접 모티프 (protospacer adjacent motif, PAM)를 결정하고 CRISPR-Cas9에 대한 오프타겟을 피할 수 있도록, CRIPRdirect 프로그램 (<https://crispr.dbcls.jp/>; Naito et al., 2015) 및 Centroidfold (<http://rtools.cbrc.jp/centroidfold/>) 프로그램을 이용하였다. *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3*에 대한 가이드 RNA (5'- CCTCTTCTACGTCCCTTCCC-3' (서열번호 23))를 pOs-sgRNA 벡터에 클로닝 하였다 (Miao et al., 2013). 제조된 벡터를 GatewayTM 시스템 (Miao et al., 2013)을 사용하여 pH-Ubi-cas9-7 목적 벡터로 클로닝 한 다음, Agrobacterium-mediated transformation (Jeon et al., 2000)을 사용하여 야생형 동진 벼에 도입하였다. 제작된 형질전환체의 게놈 DNA를 프라이머 쌍 MF/MR로 PCR 하여 생성물을 시퀀싱함으로써 표적 부위의 돌연변이를 검출하였다 (표 1). 본 실시예에서 사용된 sgRNA는 서열번호 5에 나타내었다.

1-6 광합성을 분석

광합성 탄소 환원 활성은 논에서 자란 1 개월 된 벼의 위에서 두 번째 잎을 이용하여 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 광자 플럭스 밀도, 잎 온도 25 °C 및, 350 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 의 CO₂에서 휴대용 가스 교환 시스템 (Li-6400; Li-Cor, Lincoln, NE)을 사용하여 측정되었다. 이 분석을 위해 라인 당 4 개의 서로 다른 식물체를 이용하여 3 회의 반

복실험을 수행하였다. 통계적으로 유의미한 차이를 나타내기 위해 Student' s t-test를 수행하였다.

[0077]

1-7 엽록소 형광 분석

[0078]

생체 내 엽록소 형광 동역학은 IMAGING-PAM M-Series 엽록소 형광 측정기 (Walz, Effeltrich, Germany)를 사용하여 논에서 자란 1 개월 된 식물의 암적응 시킨 잎을 사용하여 측정하였다. 최소 형광을 나타내는 F_0 는 측정광을 켜 후에 측정되었고, 최대 형광을 나타내는 F_m 은 암적응된 잎을 사용하여 0.8 초의 포화 펄스로 조명하면서 측정되었다. 최대 형광을 나타내는 F_m' 은 잎을 화학선으로 조명하여 측정하였고, 형광 수준을 나타내는 F 는 F_m' 의 결정 직전에 측정되었다. 광계 (PS) II의 광화학 효율 또는 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$; PS II의 유효 양자 수율 $Y(II) = (F_m' - F)/F_m'$; 비조절 에너지 소실 양자 수율, $Y(NO) = F/F_m$; 조절된 에너지 소실 양자 수율, $Y(NPQ) = (F/F_m') - (F/F_m)$; 이들 방정식이 분석에 사용되었다 (Klughammer and Schreiber, 2008a). 높은 광 스트레스를 위해, 잎 분절을 $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 20 분 동안 또는 $1,800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 3 시간 동안 조명하였다. F_v/F_m 은 15 분 동안 암적응 후 측정되었다.

[0080]

1-8 P700 흡수 분석

[0081]

펄스 진폭 변조 형광 측정기 (PAM101/102/103, Walz, Effeltrich, Germany)를 사용하여 Klughammer 및 Schreiber(2008)에 의해 기술된 자료를 약간 수정하여 P700을 측정하였다. PS I의 광화학 에너지 전환 양자 수율, $Y(I) = (P_m - P)/(P_m - P_0)$; PS I의 공여체 제한으로 인한 비 광화학 에너지 소실 양자 수율, $Y(ND) = (P - P_0)/(P_m - P_0)$; 및 PS I의 수용체 제한으로 인한 비 광화학 에너지 소실 양자 수율, $Y(NA) = (P_m - P_m')/(P_m - P_0)$; 이들 방정식이 분석에 이용되었다. 이들 방정식에서, P_0 는 제로 P700 신호 레벨이고, P 는 5 분 동안 화학광 ($120 \mu\text{mol 광자 m}^{-2} \text{s}^{-1}$)을 조명한 후 중간 P700 신호이고, P_m' 은 화학광 조명 동안 측정 된 최대 P700 신호이다. 0.8초 포화 펄스 및 P_m 은 원적색광을 조명함으로써 P700의 완전 산화 후 다시 측정된 최대 P700 신호이다.

[0083]

1-9 가스 크로마토그래피-질량 분석법 (GC-MS)을 이용한 대사산물 분석

[0084]

논에서 자란 1 개월 된 야생형 및 *osp1gg1* 돌연변이체 식물의 완전 성숙한 최상부 잎을 한낮에 수집하고, 액체 질소에서 즉시 냉동시켜 -80°C 에서 보관하였다. Lisec (2006) 및 Gu (2012)로부터 개발된 방법을 사용하여

[0085]

기체 크로마토그래피-질량 분석 (GC-MS)을 통해 대사체를 분석하였다. 내부 표준물질로 $5 \mu\text{M}$ 리비톨 (ribitol)을 포함하여 1.5 ml 의 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ ($1:2.5:1$, v/v) 혼합물을 사용하여 $40\text{--}70 \text{ mg}$ 생중량의 잎 시료로부터 대사체를 추출하여 -20°C 로 사전 냉각시킨 후, 10 분 동안 로테이터에서 혼합시키고, 4°C 에서 2 분 동안 $20,000 \text{ g}$ 에서 원심분리하였다. 총 $50 \mu\text{l}$ 의 상층액을 감압 농축기에서 완전히 건조시키고, MPS-Dual-head autosampler (Gerstel)를 통해 2 단계로 유도체화하였다 : (1) $10 \mu\text{l}$ 의 methoxyamine hydrochloride (Acros organics; freshly prepared at 20 mg ml^{-1} in pure pyridine (Sigma-Aldrich))로 37°C 에서 90 분 동안 현탁시키고, (2) $90 \mu\text{l}$ N-Methyl-N- (trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA; Macherey-Nagel)를 첨가하고 37°C 에서 30 분 동안 진탕시킨다. 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션 한 후, $1 \mu\text{l}$ 의 유도체화 된 화합물을 자동 라이너 교환 시스템의 스플릿리스 모드 (콜드 주입 시스템 (Gerstel)와 함께 스플릿리스 모드 (초당 12°C 간격으로 50°C 에서 250°C 로 램핑)를 이용하여 1 ml min^{-1} 의 유량으로 GC에 주입하였다. 5 % 페닐 메틸 실록산 필름 (Agilent 19091S-433, 30 m 길이, 0.25 mm 내부 직경, $0.25 \mu\text{m}$ 필름)과 HP-5MS 컬럼을 갖춘 7890B GC 시스템 (Agilent Technologies)을 사용하여 크로마토그래피를 수행하였다. 오븐 온도를 70°C 에서 2 분 동안 일정하게 유지한 다음, 분당 12.5°C 씩 320°C 로 상승시킨 후 5 분 동안 일정하게 유지시켰다; 총 실행 시간은 27 분이었다. 대사 물질을 70V 및 200°C 소스 온도에서 전자 충격 소스로 이온화하고 7200 GC-QTOF (Agilent Technologies)를 사용하여 초당 20 스캔에서 m/z 60 내지 m/z 800의 질량 범위로 기록하였다. 스펙트럼을 NIST14 질량 스펙트럼 라이브러리 (<https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-la-v14>)와 비교하면서 MassHunter Qualitative (v b06, Agilent Technologies)를 통해 대사 물질을 확인하였다. $50 \mu\text{M}$ 의 농도로 모든 표적 화합물을 함유하는 표준 혼합물을 반응 확인 및 보유 시간 기준과 병행 확인하며 처리하였다. MassHunter Quantitative (v b06, Agilent Technologies)를 사용하여 피크를 정량하였다. 상대 정량을 위해, 모든 대사체의 피크 면적을 추출한 잎의 생중량 및 내부 표준 리비톨 (Sigma-Aldrich)의 피크 면적으로 정규화하였다. 라인 당 3 개의 서로 다른 식물체를 이용하여 3 회의 반복실험을 수행하였다. 통계적으로 유의미한 차이를 나타내기 위해 Student' s t-test를 수행하였다.

- [0087] <실시예 2> 실험 결과
- [0088] 2-1 벼에서 AtPLGG1 상동체의 확인
- [0089] 벼 게놈에서 PLGG1 후보 유전자를 확인하기 위해, 애기장대 (*Arabidopsis*)에서 AtPLGG1 (Atlg32080)에 대해 이전에 보고된 아미노산 서열을 사용하여 BLAST 검색을 수행했다. NCBI 데이터베이스에서 OsPLGG1 (LOC_Os01g32830) 및 OsPLGG2 (LOC_Os10g42780)라는 두 후보를 선택하였다. 중국 그룹에서 기발표한 cDNA 서열 (EEE54674.1)은 야생형 (cv. Dongjin)의 서열과 정확하게 일치하고 많은 식물종 (Yu et al., 2005; Wang and Bayles, 2013; Kang et al., 2016)의 상동체와 잘 일치하는 것으로 나타났다. 이 두 단백질은 각각 AtPLGG1 단백질에 대해 76 % 및 69 %의 상동성을 가지고 있다. 공개적으로 이용 가능한 Affymetrix 벼 마이크로어레이 데이터의 히트맵 발현 분석의 기관/조직별 발현 분석 자료를 통해 이 두 유전자들이 잎과 슈트 특이적으로 발현함을 확인하였다.
- [0090] SMART 검색 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)을 통해 N-말단 엽록체 표적 펩티드와 12개의 막 횡단 도메인을 가지고 있는 AtPLGG1과 유사하게, OsPLGG1 및 OsPLGG2 또한 각각 10 및 11 개의 막 횡단 헬릭스를 보유하고 있음을 확인하였다. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes search (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>)를 통해 OsPLGG1과 OsPLGG2 모두 AtPLGG1과 마찬가지로 LrgA 및 LrgB 도메인, 박테리아의 예정 세포 사멸 및 세포 용해를 조절하는 박테리아성 cid/lrgAB 오페론 성분을 가지고 있음이 나타났다 (Brunskill and Bayles, 1996; Rice and Bayles, 2008). 이는 OsPLGG1 및 OsPLGG2가 막단백질일 수 있음을 시사한다. 또한, TargetP 프로그램 (Emanuelsson et al., 2000; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>)을 이용한 분석에서 두 단백질 중 OsPLGG1만이 77 개의 아미노산으로 구성된 N-말단 엽록체 표적 펩타이드 신호를 가짐을 확인하였고, 따라서, OsPLGG1은 AtPLGG1의 벼 상동체인 반면, OsPLGG2는 별개의 기능을 가질 것으로 예측되었다. 본 실시예에서 사용된 OsPLGG1의 염기서열을 서열번호 1로 나타내었다.
- [0092] 2-2 OsPLGG1 및 OsPLGG2 돌연변이체의 특성
- [0093] OsPLGG1 또는 OsPLGG2, 또는 두 유전자 모두가 광호흡에서 결정적인 역할을 수행하는지 확인하기 위해, T-DNA 돌연변이체 집단으로부터 OsPLGG1 및 OsPLGG2에 대한 T-DNA 삽입 기능상실 돌연변이를 동정하였다 (Jeon et al., 2000; Jeong et al., 2002; Jeong et al., 2006). 결과적으로, OsPLGG1의 돌연변이, *osplgg1-1*은 5'-UTR 부위에 T-DNA가 삽입되어 있었고 (도 1A), OsPLGG2의 돌연변이인 *osplgg2-1* 및 *osplgg2-2*는 세 번째 엑손의 서로 다른 위치에 T-DNA가 삽입되어 있었다 (도 1B). 모든 돌연변이 라인에 대하여 동형접합 돌연변이체를 분리하기 위하여 유전자 -및 T-DNA -특이적 프라이머를 이용하여 게놈 DNA PCR을 수행하였으며, 유전형 분석에 따라 동형접합 돌연변이를 각각 분리하였다 (도 1C). 이와 더불어 각 돌연변이 라인의 동형접합 돌연변이체에서 RT-PCR을 수행하여 OsPLGG1 또는 OsPLGG2의 비발현을 확인하였다 (도 1D).
- [0094] 세 개의 돌연변이 라인 중 *osplgg1-1* 식물만이 초기 발달 단계에서 엽은 녹색 잎을 보였고 나중에 성장이 심하게 지연되어 성숙 과정에서 적은 분얼(tillers) 수를 보였다 (도 2A, B). *osplgg1-1*에서, 분얼(tillers)의 평균 개수는 야생형 (11.8)의 약 절반 (6.6)이었으며 (도 2B), 1000-종자 무게는 WT 23.37g에 비하여 평균 19.32g으로 감소하였다 (도 2C). 엽은 녹색 잎 표현형과 연관되게, 광합성 탄소 환원율은 *osplgg1-1*에서 WT의 20 % 수준으로 상당히 감소되었다 (도 2D). *osplgg1-1*의 이러한 성장 지연은 일반 대기 조건 하에서 자란 *atplgg1*의 성장 지연 표현형과 유사하였다 (Pick et al., 2013). *osplgg1-1*의 지연 성장 표현형은 도 2E 및 F 하단에서와 같이 높은 CO₂ (0.3 %) 조건의 환경 성장 챔버에서 WT에 상응하는 수준으로 회복되었지만, 일반 대기 조건에서는 엽은 녹색 잎과 성장 지연 표현형이 도 2F의 상단에서와 같이 변하지 않고 유지되었다. 이에 반해, OsPLGG2 돌연변이 라인 *osplgg2-1* 및 *osplgg2-2*는 눈에 띄는 표현형을 나타내지 않았다.
- [0095] *osplgg1-1*의 성장 지연을 추가로 확인하기 위해, CRISPR/Cas9 시스템을 통해 2 개의 추가적인 OsPLGG1 돌연변이체를 생성했다. 두 번째 엑손의 20개 뉴클레오타이드가 표적서열로 선택되었다. 30 개 이상의 OsPLGG1에 대한 CRISPR/Cas9 유래 동형접합 돌연변이체 중에서, 대부분의 돌연변이체 식물의 초기 성장이 매우 열악했기 때문에 10 개 개체만이 생존하였다. 추가 실험을 위해 이 중 2 개의 이대립인자성 돌연변이 식물을 무작위로 선택하여 각각 *osplgg1-2* (WT에 대한 T 결실 및 TCCCT 결실) 및 *osplgg1-3* (T 결실 및 TCC를 CTCT 치환)으로 명명하였다 (도 1A). *osplgg1-2*에서 T 결실 및 TCCCT 결실은 180 번째 아미노산 이후의 심각한 아미노산 서열 변화와 더불어 각각 221 번 및 232 번 아미노산에서 조기 종결 코돈이 나타날 것으로 예측되었다. *osplgg1-3* 또한, T 결실 및 TCC에서 CTCT 로의 치환은 180 번째 아미노산 이후의 심각한 아미노산 서열 변화와 더불어 각각 221 번째 및 233 번째 아미노산에서 조기 종결 코돈이 나타날 것으로 예측되었다.

[0096] 표현형 관찰에서, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3*은 모두 *osplgg1-1*과 동일한 형태학적 표현형을 나타냈다. 그들은 열은 녹색 잎과 성장 지연을 보였으며 분얼 수도 적었다 (도 2A, B). *osplgg1-1*과 유사하게, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3*은 야생형에 비해 훨씬 줄어든 분얼 수 (도 2B)와 감소된 1000 종자 무게를 보였다 (도 2C). 또한, *osplgg1-2*와 *osplgg1-3*에서도 광합성 탄소 환원율이 크게 감소함을 확인하였다 (그림 2D). *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3*은 또한 높은 CO₂ (0.3 %) 농도의 환경 성장 챔버에서 WT과 비슷한 수준으로 식물 성장을 회복한 반면, 일반 대기 조건 하에서는 열은 녹색 잎과 성장 지연 표현형이 변하지 않은 채로 남아있었다 (도 2E, F). 이 결과는 OsPLGG1 결핍이 벼에서 식물 성장 지연을 야기한다는 것을 보여준다.

[0097] OsPLGG1 돌연변이체에서 잎 면적당 광합성 탄소 고정율의 큰 감소 (도 2D)는 PS I 및/또는 PS II의 불활성화에 의해 부분적으로 설명될 수 있다. 두 개의 서로 다른 광역제 조명 조건 (20 분 간 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 또는 3 시간 동안 1,800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 실험한 결과, OsPLGG1 돌연변이체인 *osplgg1-1*, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3*의 PS II가 높은 광 스트레스에 매우 민감하였고, 돌연변이체의 PS II는 밤새 암적응 시킨 후에도 부분적으로 손상되었다 (표 2).

표 2

	Dark	900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1,800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
WT	0.779 $\pm$ 0.001	0.724 $\pm$ 0.017	0.451 $\pm$ 0.067
<i>osplgg 1-1</i>	0.701 $\pm$ 0.013	0.583 $\pm$ 0.042***	0.300 $\pm$ 0.058*
<i>osplgg 1-2</i>	0.704 $\pm$ 0.032	0.610 $\pm$ 0.009**	0.274 $\pm$ 0.039*
<i>osplgg 1-3</i>	0.617 $\pm$ 0.046***	0.573 $\pm$ 0.023***	0.231 $\pm$ 0.038**

[0099] 돌연변이체의 화학광 조명 하에서, PS II의 유효 광화학 양자 수율, Y (II)은 낮게 나타났으며, 암적응에서의 회복 또한 느린 것으로 나타났다 (도 3A). *osplgg1* 돌연변이체는 광조건에서 빠른 Y(NPQ) 성장 동역학을 보였고, 암조건에서 느린 붕괴 동역학을 보였으며 (도 3B), 이 세 가지 파라미터의 합이 0과 같기 때문에 이러한 차이는 Y(NO)로 보상되었다 (도 3C). PS I의 유효 광화학 양자 수율, Y(I) 또한 돌연변이체에서 낮았으며 (도 3D), PS II와 PS I의 낮은 활성은 더 높은 공여체 제한, Y(ND)를 야기하였다 (도 3E). 그러나, WT와 돌연변이체 사이의 수용체 제한 정도 (Y(NA))에는 큰 차이가 없었다 (도 3F).

[0101] 2-3 OsPLGG1의 세포 내 위치

[0102] 세포 내 위치 예측에 따르면, OsPLGG1만이 N-말단 엽록체 표적 펩타이드를 보유하고 이의 돌연변이체는 *atplgg1*의 표현형과 유사하였다. 세포 내 위치를 결정하기 위해, 정지 코돈이 없는 전장 OsPLGG1 cDNA를 식물 발현 벡터의 CamV35S 프로모터의 제어하에 GFP 유전자에 인-프럼 융합시켰다 (도 4A). 생성된 제작물을 옥수수 원형질체에서 발현시켰다. 현미경에 의해 관찰된 녹색 형광 신호는 엽록소 자가 형광의 외부 층과 명확하게 겹쳤다. 이 결과는 OsPLGG1이 엽록체 막에 위치함을 보여준다 (도 4B).

[0104] 2-3 *osplgg1* 돌연변이체에서 광호흡 대사산물의 변화

[0105] 광호흡에서 OsPLGG1의 역할을 확인하기 위해, WT와 세 *osplgg1* 돌연변이(*osplgg1-1*, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3*)의 광호흡 대사산물을 분석했다. 광호흡은 낮 동안만 발생하기 때문에 모든 잎 샘플은 한낮에 수확되었다. 결과적으로, *osplgg1* 돌연변이체에서 글리세레이트 및 글리콜레이트를 포함한 대부분의 광호흡 대사체가 고도로 축적되었으며, 이는 *atplgg1*에서의 결과와도 잘 일치한다 (도 5). 돌연변이체 *osplgg1-1*, *osplgg1-2* 및 *osplgg1-3*에서, 광호흡 대사 산물인 글리세레이트는 각각 야생형의 2.6-, 3.41- 및 3.69- 배, 글리콜레이트는 각각 25.87-, 32.43- 및 35.74- 배, 글리신은 각각 2.5-, 1.2- 및 1.88- 배, 그리고 세린은 각각 14.73-, 6.19- 및 15.14- 배로 측정되었다 (도 5).

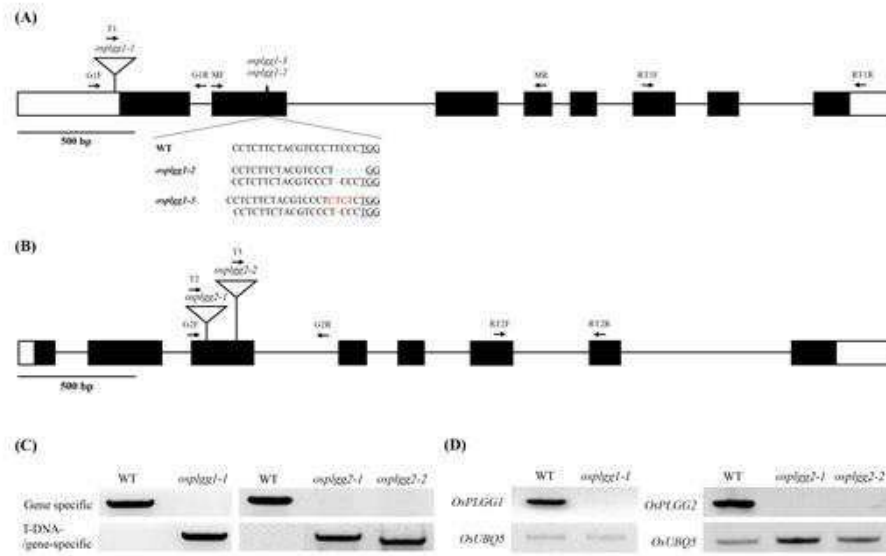
[0107] 2-4 *osplgg1* 돌연변이체에서 유도된 추가 대사산물의 차별적인 변화

[0108] *osplgg1* 돌연변이체의 잎에서 다수의 추가 대사산물을 추가로 분석한 결과, 광호흡 대사체가 아닌 일부 대사산물에 대한 유의한 변화를 확인했다. GABA (gamma-aminobutyric acid), maltose, methionine, quinate, raffinose, shikimate, succinate 및 tyrosine의 축적량은 3 가지 *osplgg1* 돌연변이체에서 야생형에 비해 유의하게 감소한 반면, hydroxyglutarate, mannitol 및 xylose의 수준은 높게 상승했다. hydroxyglutarate, mannitol 및 xylose는 *osplgg1* 돌연변이체에서 각각 평균 8.6, 2.5, 및 2.2 배로 증가되었다. 대조적으로,

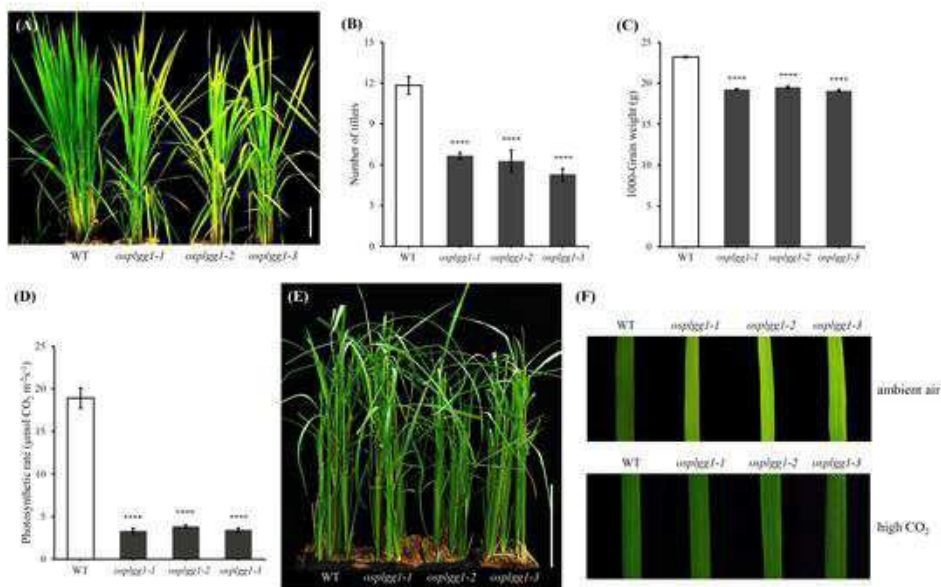
GABA, maltose, methionine, quinate, raffinose, shikimate, succinate 및 tyrosine의 경우 *osplgg1* 돌연변이체에서 WT에 비해 각각 3.7-, 2.8-, 4.4-, 8.2-, 6.8-, 2.3-, 2.5- 및 12.8- 배의 감소를 나타냈다.

도면

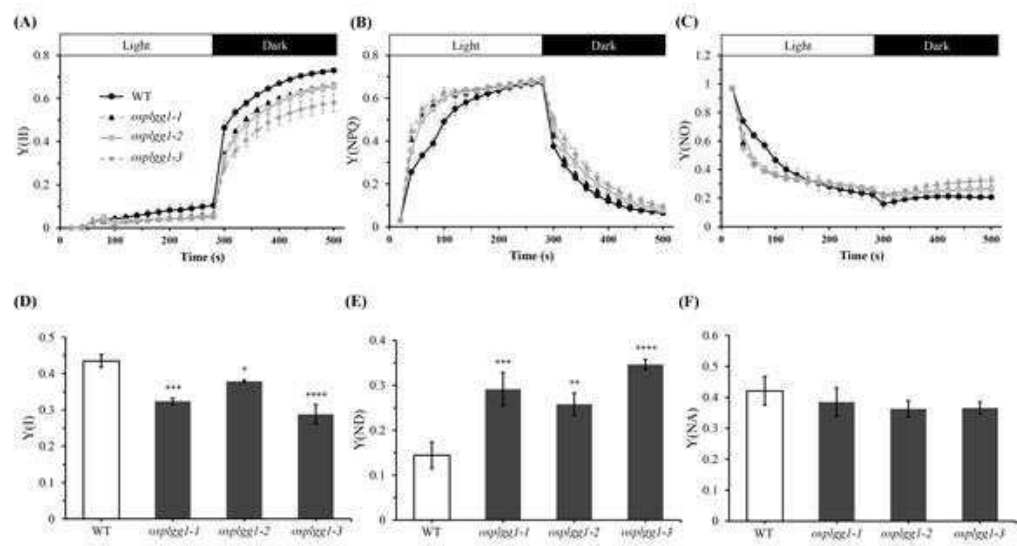
도면1



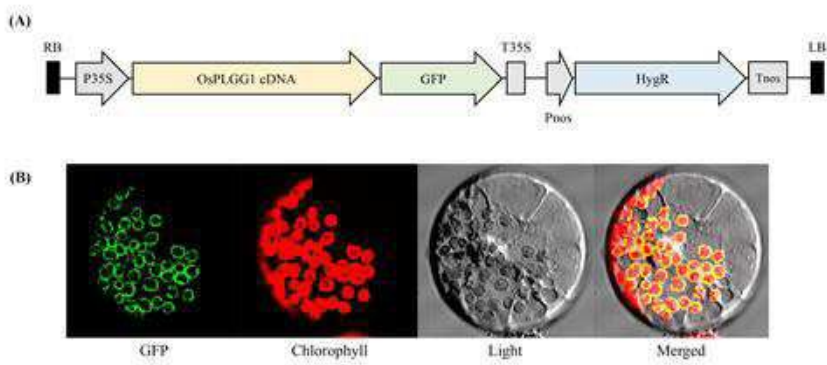
도면2



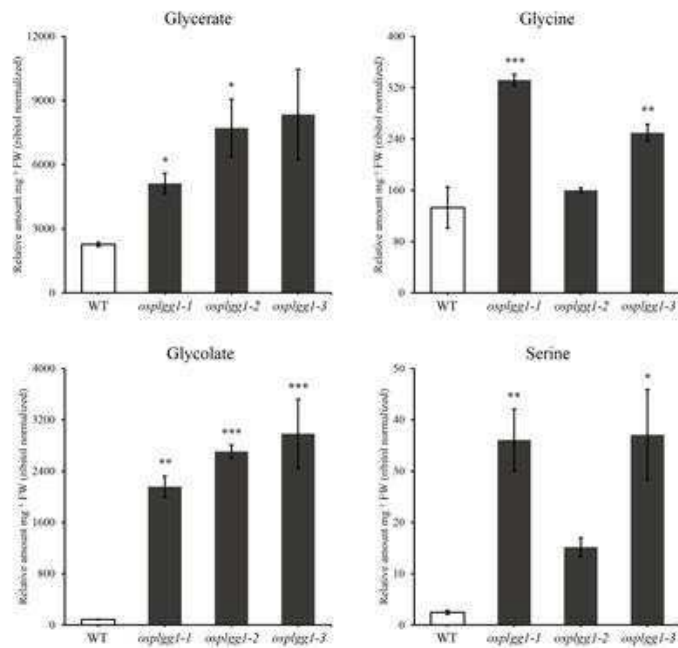
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A OsPLGG1 gene and its uses for rice photorespiratory metabolite transport
- <130> GKH19P-296-KR
- <160> 23
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 3710
- <212> DNA
- <213> Unknown
- <220><223> OsPLGG1
- <400> 1

```

gaatttttag cctgcacaat aaatacgggtg tctccttttaa ttttaaggct gttttaataa      60
tttaatttaa tagatagata gatagataga ttttttccaa tcataatttc agtttacttt      120
tcttcaatgt taaagtttta ccaaacatag accatactag tgtaaaccga atcgaatacc      180

cagcctaata agcaacgacg atatgctggc gcgtggtagc ccaacaatcc caatcccca      240
atcatcccaa ttttctggcc acatttgcac cctctgccg cctcctctc ttccacctgg      300
cctctgccac tgctccagc tcccttctca tcaactgtcac tgccactgct ctctcgtctgg      360
ccaaaggaga aggagaagaa gagaagagaa gagaagaggg ccaaaggaga aggagaagaa      420

```

gagaagagaa gagaagagat ggcagcgacc tcatcatcat cctccccctg catgattgcc	480
tcgctacgca gcagccatcg ctgccgcctt tcgccctccg ccaccgccac gtcgccgccc	540
cgctccgca cgcttctcc ccgccgatgc cgacgcaacc cctcctctc ctctcctcc	600
tcccgcaag cggcggcaat ctccatggct cccgccaatc ctgccaccg ctcacatgcc	660
ccgatccacg ccgcccgccg cgccggagga ggaggaggag gcgcgggcgc cacctctccc	720
tcgggcctac ccagcgtgag tcgtcaatca gtcaaatgc acgcagcctc gtcgcgattt	780
cgcatgacct gccgatcgaa ctgacatgcg tgagctatgt atggatttta tagctcgtcg	840
ggatcgcgca cctgctggtg tcgctgggga tcgtgctggc ctccgacaag ttctgaagc	900
aggcgcttgc ggcggcgctc atcaagtcc ccagcgccct cttcgcatg ttctgctct	960
tctccgtcct cgtcgtctc gacgccttcg cggccgcgt cgccaagggg ttcattggact	1020
tcttcgagcc ggccaccctc ttcattcaga ggtggctgcc cctctctac gtcccttccc	1080
tggctgtcct gccgtcgcg gtcagggacg tcccggctgc ttccggcctc aagatcttcc	1140
tcatcatttg tatgcacac actacgtcc tatcgttgca tgcattctgc tacttcttcc	1200
ttctcctga tcatcgtgt tatctgtcc gcctctgctt cctccggatt ttacattcta	1260
ctacttcgta ttgatatgc tgatcaatta acttcagta aatattacca caccaacttg	1320
cattgtggat tggccccatt cataaatcac aacaatttta cttagagggt gtttagattc	1380
aggggtgtaa agttttaccg tgtcacatcg gatattatat aggggtgtcgt aatagggtgt	1440
ttggatacta ataaaaaaaa ctaattacag aatccggcag taaactgcga gacgaattta	1500
ttaagtctaa ttaatccgtc attagcaaat gtttactgta aaaccacatt atcaaatcat	1560
agagcaatta gacttaaaag attcgtctcg caaattagt gcaatctgtg caattagtta	1620
tttttttagc ctatatttaa tacttcgtgc aagtgttcaa acgttcgatg tgacagggtg	1680
taaaatttta ggggtgggac taaacatgcc cttggtttca gattaatttg cattcaatct	1740
gaaaaaacg atgggtgtgat gttatctggi ttcatctcc cagttgggtg ctggtttgct	1800
tactcatgg tggccggata cacagcctc accgtgagga agattgtcca gacacagctt	1860
ataccagctg agccgatgag caagccgtct ccgttcgca cgctggaatt ctgggcctgg	1920
gggtgtgtct ttgtcgcac gtttctgtt gcgtatgta accccacagc gcttggcacc	1980
acggcaagaa catgtcttcc ttctctctc gtttcaactg tactgggata catggttgg	2040
tctgggtaaa tacatatgct tttgtatac acttaacttg taagatctga cgaagccacc	2100
agctgccttg ttactccat ttctctaaca acatacatgg gtcttattga ttacttggca	2160
ggataccatc tgggtgtcaag aaagtcttc acccaatcat ttgttgtgca ctctctgcag	2220

atttggcagc aatagcatat gggatatctt cccggtctgg agttgatgca gtgctaggtt 2280

gtaaaactaaa cctgatcaa tagtgctcta atcaagttgt gaattctgaa ataagttggt 2340

ttaattgcc aggtgattac ctacaaaagg cgccatctaa tcttgagct ggtgacgtcc 2400

tgatgggatt tcttggttca gtcatcatat cgtttgcatt ctcaatgttc aagcagagaa 2460

aggtagtgtc tgcgtctgtt tctgcagaat tattctcagt tagcatgcat ggttatggtg 2520

tgagatgatt catatatatc ctgaggctct gtgtttgttg ttgctggtgt gtgttggcta 2580

atcaactaat aatgttttgc ggtgggtaaa actcagcttg tgaagaggca tgcagcggaa 2640

attttcacat caattgccat cgcatacaaa ttctcgttat actcaactgc catcctagga 2700

cgggtgatag ggctagagcc ttcactgacc atatcaatat taccgagggtg cataaccgtg 2760

gcgttggctc tgagcatcgt gtctttcttt gaaggtacgg acctagtaca tacttatatt 2820

gctggaaatc aatttctgtt cttgctggtc gatcagctag atatataata tggagtactc 2880

agctagctta ttatatatgg tatggatgac ttagtttgtg tgtcccgggc atgcagggtg 2940

aaattcttcg ctaaccgtg cggtcgtcgt cctcaccggg ctgatcggcg caaattttgt 3000

gcaagcagcc atggacaagc ttggcctcaa cgacccatc gcgcgaggaa tagggacggc 3060

ttccaggtag atatatacct ttgagtttta cttttgagat ttgttccggt ccaacaaaaa 3120

gtatttcgag ataccgatac ctacagggtt cacagtatca aatcgtttcc gatcgttaga 3180

tctaacaatg tccatctac ataactagat ccaatggtcg gaaacgattt agatcaaatg 3240

atcgaaaatg atttggata ccacgagata gcaaatttct ttacttttac ctacctgtg 3300

gtgcttttt ttagtaagtt aagctgcata tatatacata catacagcag tatgctctat 3360

gaataatgtt tgcatttacg ttgcagtgtc catggactgg gaacagcagc gctgtcggcc 3420

aaggagcctg aagcgtgccc cttctgcgcc atcgtttacg gcctgacggg gatcttcggt 3480

tcgtcattt gtcggttcc ggccgtcagg cagagcttag tgttcatagc tggctgacaa 3540

cacgcacggt acatcagttt tgtttttgtt tgtttttct ttttacttt cttttgggtc 3600

gtcgtgcgtg tatagagcga tgcctgcaag attgcaagaa tatatgtata cagacacatt 3660

ttttgtgatt atgtctccgt tgtaataaga agcaagagag taattttgta 3710

<210> 2

<211> 1560

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsPLGG1 cDNA

<400> 2

atggcagcga cctcatcacc atcctccccc tgcattgattg cctcgctacg cagcagccat	60
cgctgccgcc ttctgccctc cgccaccgcc acgtcgccgc cccgcctccg cacgtttcct	120
ccccgccgat gccgacgcaa cccctcctcc tcctcctcct cctcccgcca agcggcgcca	180
atctccatgg ctcccgccaa tcctcgccac cgctcatcg ccccgatcca cgccgccgcc	240
gccgcccggag gaggaggagg aggcgcgggc gccacctctc cctcgggcct acccagcctc	300
gtcgggatcg cgcacctgct ggtgtcgctg gggatcgtgc tggcctccga caagttcctg	360
aagcaggcgt tcgcggcggc gtccatcaag tccccagcg cctctttcgg catgtttctg	420
gtttttcctg tcctcgtcgt cctcgacgcc ttcgcgcccg cgctcgccaa ggggttcattg	480
gactttctcg agccggccac cctcttcacc cagaggctgg tgccctctt ctacgtccct	540
tccttggtcg tcctgccgt cgccgtcagg gacgtcccg ctgcttcgg cctcaagatc	600
ttctcatca tttttggtgg ctggtttgct tcaactatgg tggccggata cacagcactc	660
accgtgagga agattgtcca gacacagctt ataccagctg agccgatgag caagccgtct	720
ccgttcgca cgctggaatt ctgggcctgg ggtgctgtct ttgtcgatc gtttctgtt	780
gcgtatgta accccacagc gcttggcacc acggcaagaa catgtcttc tttcctcctc	840
gcttcaactg tactgggata catggttgg tctgggatac catctggtgt caagaaagt	900
cttcacccaa tcatttgttg tgcactctct gcagatttgg cagcaatagc atatgggtat	960
ctctcccggt ctggagtga tgcagtgcta ggtgattacc tcacaaaggc gccatctaat	1020
cctggagctg gtgacgtcct gatgggattt ctggttcag tcacataac gtttgcatc	1080
tcaatgttca agcagagaaa gcttgtgaag aggcattgcag cggaaatttt cacatcaatt	1140
gccatcgcat caacattctc gttatactca actgccatcc taggacgggt gatagggcta	1200
gagccttcac tgaccatacc aatattaccg aggtgcataa ccgtggcggt ggcctctgagc	1260
atcgtgtctt tctttgaagg tgtaaatctt tcgctaaccg ctgcggctgt cgtcctcacc	1320
gggctgatcg gcgcaattt tgtgcaagca gccatggaca agcttggcct caacgacccc	1380
atcgcgcgag gaatagggac ggcttccagt gctcatggac tgggaacagc agcgtgtcg	1440
gccaaggagc ctgaagcgct gcccttctgc gccatcgctt acggcctgac ggggatcttc	1500
ggttcgtca tttgctcgtt tccggccgtc aggcagagct tagtgttcat agctggctga	1560
	1560
<210> 3	
<211> 519	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> OsPLGG1 Protein

<400> 3

Met Ala Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ser Pro Cys Met Ile Ala Ser Leu
1 5 10 15

Arg Ser Ser His Arg Cys Arg Leu Ser Pro Ser Ala Thr Ala Thr Ser

20 25 30
Pro Pro Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Arg Arg Cys Arg Arg Asn Pro
35 40 45

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Gln Ala Ala Ala Ile Ser Met Ala
50 55 60

Pro Ala Asn Pro Arg His Arg Leu Ile Ala Pro Ile His Ala Ala Ala
65 70 75 80

Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ser Pro Ser Gly
85 90 95

Leu Pro Ser Leu Val Gly Ile Ala His Leu Leu Val Ser Leu Gly Ile
100 105 110

Val Leu Ala Ser Asp Lys Phe Leu Lys Gln Ala Phe Ala Ala Ala Ser
115 120 125

Ile Lys Phe Pro Ser Ala Leu Phe Gly Met Phe Cys Val Phe Ser Val
130 135 140

Leu Val Val Leu Asp Ala Phe Ala Pro Ala Leu Ala Lys Gly Phe Met
145 150 155 160

Asp Phe Phe Glu Pro Ala Thr Leu Phe Ile Gln Arg Trp Leu Pro Leu

165 170 175
Phe Tyr Val Pro Ser Leu Val Val Leu Pro Leu Ala Val Arg Asp Val
180 185 190

Pro Ala Ala Ser Gly Leu Lys Ile Phe Leu Ile Ile Phe Gly Gly Trp
195 200 205

Phe Ala Ser Leu Met Val Ala Gly Tyr Thr Ala Leu Thr Val Arg Lys
210 215 220

Ile Val Gln Thr Gln Leu Ile Pro Ala Glu Pro Met Ser Lys Pro Ser

225 230 235 240
 Pro Phe Ala Thr Leu Glu Phe Trp Ala Trp Gly Ala Val Phe Val Ala
 245 250 255
 Ser Phe Ala Val Ala Tyr Val Asn Pro Thr Ala Leu Gly Thr Thr Ala
 260 265 270
 Arg Thr Cys Leu Pro Phe Leu Leu Ala Ser Thr Val Leu Gly Tyr Met
 275 280 285
 Val Gly Ser Gly Ile Pro Ser Gly Val Lys Lys Val Leu His Pro Ile
 290 295 300
 Ile Cys Cys Ala Leu Ser Ala Asp Leu Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Tyr

 305 310 315 320
 Leu Ser Arg Ser Gly Val Asp Ala Val Leu Gly Asp Tyr Leu Thr Lys
 325 330 335
 Ala Pro Ser Asn Pro Gly Ala Gly Asp Val Leu Met Gly Phe Leu Gly
 340 345 350
 Ser Val Ile Ile Ser Phe Ala Phe Ser Met Phe Lys Gln Arg Lys Leu
 355 360 365
 Val Lys Arg His Ala Ala Glu Ile Phe Thr Ser Ile Ala Ile Ala Ser
 370 375 380

 Thr Phe Ser Leu Tyr Ser Thr Ala Ile Leu Gly Arg Val Ile Gly Leu
 385 390 395 400
 Glu Pro Ser Leu Thr Ile Ser Ile Leu Pro Arg Cys Ile Thr Val Ala
 405 410 415
 Leu Ala Leu Ser Ile Val Ser Phe Phe Glu Gly Val Asn Ser Ser Leu
 420 425 430
 Thr Ala Ala Val Val Val Leu Thr Gly Leu Ile Gly Ala Asn Phe Val
 435 440 445
 Gln Ala Ala Met Asp Lys Leu Gly Leu Asn Asp Pro Ile Ala Arg Gly

 450 455 460
 Ile Gly Thr Ala Ser Ser Ala His Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ser
 465 470 475 480

Ala Lys Glu Pro Glu Ala Leu Pro Phe Cys Ala Ile Ala Tyr Gly Leu

485

490

495

Thr Gly Ile Phe Gly Ser Leu Ile Cys Ser Val Pro Ala Val Arg Gln

500

505

510

Ser Leu Val Phe Ile Ala Gly

515

<210> 4

<211> 2325

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsPLGG1-EGFP

<400> 4

atggcagcga cctcatcatc atcctcccc tgcatgattg cctcgtacg cagcagccat 60

cgtcgccgc tttcgccctc cgccaccgcc acgtcgccgc ccgcctccg cagcttctc 120

ccccccgat gccgacgcaa cccctcctcc tctcctcct cctcccgcca agcggcggca 180

atctccatgg ctcccgccaa tctcgcacac cgctcatcg ccccgatcca cgcccgccgc 240

gccgcccggag gaggaggagg aggcgcgggc gccacctctc cctcgggcct acccagcctc 300

gtcgggatcg cgcacctgct ggtgtcgtcg gggatcgtgc tggcctccga caagtctctg 360

aagcaggcgt tcgcgccggc gtccatcaag ttccccagcg cctcttccgg catgttctgc 420

gtcttctccg tctcgtcgt cctcgacgcc ttcgcgcccg cgctcgccaa ggggttcattg 480

gacttcttcg agccggccac cctcttcac cagaggtggc tgcccctctt ctacgtccct 540

tccctggtcg tctcgccgt cgccgtcagg gacgtcccg ctgcttccgg cctcaagatc 600

ttctcatca tttttggtgg ctggtttgct tcactcatgg tggccggata cacagcactc 660

accgtgagga agattgtcca gacacagctt ataccagctg agccgatgag caagccgtct 720

ccgttcgca cgctggaatt ctgggcctgg ggtgctgtct ttgtcgcatc gtttgcctgt 780

gcgtatgtta accccacagc gcttggcacc acggcaagaa catgtcttcc tttcctcctc 840

gcttcaactg tactgggata catggttgg tctgggatac catctggtgt caagaaagt 900

cttacccaa tcatttgttg tgactctct gcagatttgg cagcaatagc atatgggtat 960

ctctcccggt ctggagtga tgcagtgcia ggtgattacc tcacaaaggc gccatcta 1020

cctggagctg gtgacgtcct gatgggattt cttggttcag tcatcatatc gtttgcattc 1080

tcaatgttca agcagagaaa gcttgtgaag aggcattgcag cggaaatttt cacatcaatt 1140

gccatcgcat caacattctc gttatactca actgcatcc taggacgggt gatagggcta	1200
gagccttcac tgaccatata aatattaccg aggtgcataa ccgtggcggt ggctctgagc	1260
atcgtgtctt tctttgaagg tgtaaatctt tcgctaaccg ctgcggctgt cgtcctcacc	1320
gggctgatac gcgcaaatct tgtgcaagca gccatggaca agcttggcct caacgacccc	1380
atcgcgag gaataggagc ggcttccagt gctcatggac tgggaacagc agcgtgtcgt	1440
gccaaggagc ctgaagcgt gcccttctgc gccatcgctt acggcctgac ggggatcttc	1500
ggttcgtca ttigtctggt tccggccgtc aggcagagct tagtgttcat agctggcaag	1560
ggtggcgcg ccgaccagc tttctgtac aaagtgtga tatcaatggt gagcaagggc	1620
gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccata ctggtcagc tggacggcga cgtaaacggc	1680
cacaagtcca gcgtgtccg cgaggcgag ggcatgcca cctacggcaa gctgaccctg	1740
aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccacctcgt gaccaccctg	1800
acctacggcg tgcagtgtt cagccgtac ccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc	1860
aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gacgcacca tcttcttcaa ggacgacggc	1920
aactacaaga cccgcgcga ggtgaagttc gagggcgaca cctgggtgaa ccgcatcgag	1980
ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcaagct ggagtacaac	2040
tacaacagcc acaacgtcta tatcatggc gacaagcaga agaacggcat caagtgaa	2100
ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag	2160
aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgt ctgccgaca accactacct gagcaccag	2220
tccgccctga gcaagaccc caacgagaag cgcgatcaca tggctcctgt ggagtctgt	2280
accgcccgg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtaa	2325
<210> 5	
<211> 104	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> OsPLGG1-sgRNA	
<400> 5	
cctctttac gtcccttccc gttttagagc tatgtgaaa agcatagcaa gttaaaataa	60
ggctagtccg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg gtgc	104
<210> 6	
<211> 29	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer G1F

<400> 6

accggttctg acttgatatt accttttgt 29

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer G1R

<400> 7

cgagctataa aatccatata tagctcacg 29

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer G2F

<400> 8

glatgatttg aaataataga tggcgcatg 29

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer G2R

<400> 9

ttagagttga tgttgaagtt ttctcaagt 29

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer T1

<400> 10

gtggtgcaga tgaacttcag ggtc 24

<210> 11

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer T2
 <400> 11
 ctagagtcga gaattcagta 20
 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer T3
 <400> 12
 atccagactg aatgccca gg 22
 <210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer RT1F
 <400> 13
 caacattctc gttatactca actg 24
 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer RT1R
 <400> 14
 acaaacacaaa acaaaactga tgta 24
 <210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer RT2F
 <400> 15
 ctgtggcatc aacattctcg ttat 24

<210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer RT2R
 <400> 16
 gaagcttgtc catcactgct tg 22

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer UBQ5 F
 <400> 17
 gactacaaca tccagaagga gtc 23

<210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer UBQ5 R
 <400> 18
 tcatctaata accagttcga tttc 24

<210> 19
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer MF
 <400> 19
 atgtatggat tttatagctc gtcgg 25

<210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer MR

<400> 20
 tgcacaacaa atgattgggt gaa 23
 <210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer FLCF
 <400> 21
 agaaggagaa gaagagaaga gaag 24
 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer FLCR
 <400> 22
 tattacaacg gagacataat caca 24
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA
 <400> 23
 cctcttctac gtccttcc 20