

(11) 공개번호 10-2022-0150125
(43) 공개일자 2022년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 1/02 (2006.01) *A01H 1/06* (2006.01)
A01H 6/46 (2018.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12Q 1/6895 (2018.01) *G01N 33/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A01H 1/023 (2021.01)
A01H 1/06 (2021.01)

(21) 출원번호 10-2021-0057462

(22) 출원일자 2021년05월03일
심사청구일자 2021년05월03일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
부산대학교 산학협력단
부산광역시 금정구 부산대학교63번길 2 (장전동, 부산대학교)
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)

(72) 발명자
정기홍
경기도 수원시 영통구 영통로200번길 112, 103동 504호(망포동, 영통 SK VIEW)
김유진
경상남도 밀양시 삼랑진읍 삼랑진로 1268-50, 부산대학교 밀양캠퍼스 생명자원과학대학 생명환경화학과 3232호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
김순웅

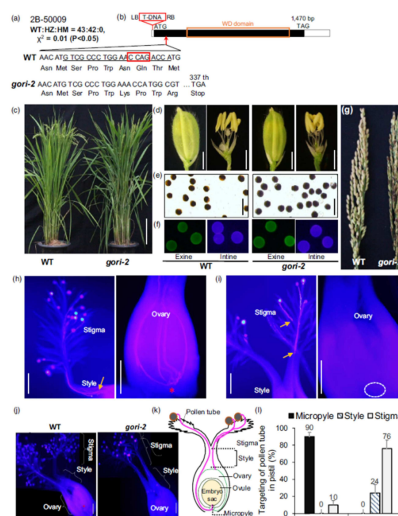
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **0s03g52870 유전자를 이용한 웅성불임 벼의 제조방법, 벼의 웅성불임 유도용 조성물 및 웅성 불임 벼**

(57) 요약

본 발명은 웅성불임 제조방법 및 이로부터 제조된 웅성불임 벼에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 *Os03g52870* 유전자가 돌연변이되어 발현 억제 및 기능이 억제되는 경우, 야생형(WT) 대비 발아된 화분관에서 액틴 필라멘트가 감소하고 펙틴의 비정상적인 분포를 확인할 수 있으며 화분 특이적인 유전자에 있어서 상이한 발현을 보이고, 화분 발아 및 화분관 신장이 감소되어 웅성불임이 야기된다. 따라서 본 발명에 따른 *Os03g52870* 유전자의 활성 조절을 통한 웅성불임 계통 제조방법 및 이로부터 제조된 웅성불임 계통은 기존의 육종 방식을 효과적으로 개선하기 위한 것으로, 환경의 영향을 거의 받지 않고 안정적으로 이용할 수 있어 벼 육종산업의 발전에 크게 기여할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01H 6/4636 (2022.05)
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/8289 (2013.01)
C12Q 1/6895 (2018.05)
G01N 33/0098 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12Q 2600/13 (2013.01)
G01N 2333/415 (2013.01)

(72) 발명자

홍우중

경기도 수원시 영통구 청명로59번길 51, 103호(영통동)

김의정

경기도 용인시 수지구 풍덕천로 76, 909동 804호(풍덕천동, 용인수지 신정마을9단지)

문선옥

경기도 용인시 기흥구 흥덕2로118번길 26, 904동 503호(영덕동, 흥덕마을이던하우스)

박순기

대구광역시 북구 대학로 80(산격동, 경북대학교) 농생대 응용생과학부

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395065526
과제번호	PJ01492703
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대농작물신육종기술개발
연구과제명	벼 유전자 교정 효율 향상을 위한 목적 유전자 선발 도구 개발 및 이를 활용한 화분
유전자교정 돌연변이 집단 구축	
기 여 율	8/10
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711106020
과제번호	2019R1C1C100263613
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	작물 생산량 증가를 위한 벼 화분관 발달 조절 연구
기 여 율	2/10
과제수행기관명	한국연구재단
연구기간	2020.09.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

벼에서 *Os03g52870* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 융성불임 벼의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 단계는 *Os03g52870* 유전자의 일부 염기를 치환 또는 결실하여 이루어지는 것인, 융성불임 벼의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 단계는 T-DNA 삽입 또는 CRISPR-Cas9에 의한 유전자 편집에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 융성불임 벼의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

Os03g52870 유전자의 발현이 억제된 벼를 모본으로 하여, 융성 가임의 벼와 교배시키는 단계;를 더 포함하는 융성불임 벼의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 발현이 억제된 *Os03g52870* 유전자는 237 내지 240 위치의 염기서열이 치환 또는 결손되는 것을 특징으로 하는, 융성불임 벼의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 발현이 억제된 *Os03g52870* 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 융성불임 벼의 제조방법.

청구항 7

Os03g52870 유전자의 발현이 억제된, 융성불임 벼.

청구항 8

Os03g52870 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 제제는 *Os03g52870* 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acid) 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물.

청구항 10

Os03g52870 유전자 발현 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법.

청구항 11

Os03g52870 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 제제는 상기 *Os03g52870* 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브인 것인, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물.

청구항 13

제 11항에 있어서,

상기 제제는 상기 *Os03g52870* 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것인, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 *Os03g52870* 유전자를 이용한 웅성불임 벼의 제조방법, 벼의 웅성불임 유도용 조성물 및 웅성불임 벼에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 벼(*Oryza sativa*)는 국내는 물론 전 세계 나라 중 3분의 1이상에서 주식으로 삼고 있는 쌀의 생산식물이다. 경제적으로 중요한 농작물 중 하나이며 생산량 증대를 위하여 많은 연구가 수행되고 있다. 벼의 생산량 증대를 위해 웅성불임 도입을 통한 F1 하이브리드 생산은 모든 세계 연구자가 주목하고 있는 기술개발이다. 벼에서도 세포질웅성불임(cytoplasmic male sterility, CMS) 방식이 가능하나 생산비용이나 실제 이용면에서도 현실적이지 못하다. 유전자 조작에 의한 웅성불임 형질전환체 개발 방식에는 타페툼(tapetum) 특이적 프로모터를 이용하면서 외부 독성유전자(박테리아 또는 식물체 유전자)를 이용하여 선택적인 수술 조직의 사멸을 유도함으로써 웅성불임을 만드는 방법이 이용되고 있다.

[0004] 한편, 꽃 피는 식물에서 화분(pollen)의 형성과 이후의 수분 및 수정은 성적 생식을 위한 결정적인 단계이다. 소포자(microspore)의 화분 발달은 일련의 조정된 세포 사건을 포함하며, 성숙한 화분은 빠르게 발아하고 영양

세포에서 유래된 극 성장 화분관(pollen tube, PT)을 생산하며 두개의 정자 세포를 배아 주머니에 전달하는 특수 기능을 가지고 있다. 정상적인 수정 및 수정 능력에 있어서 효율적이고 신속한 화분 발아 및 관 성장이 중요한 것으로 알려졌다.

[0005] 벼의 화분 발아 및 관 성장에 영향을 미치는 돌연변이에 있어서, 현재 극히 일부의 유전자가 기능적으로 발견되었다. 예를 들어, 벼 OsSUT1(Sucrose Transporter1)의 돌연변이가 웅성불임을 일으킨다. OsSUT1 돌연변이 화분립은 일반적으로 발달 중에 전분을 축적하지만, 발아 및 난자와 수정을 하지 않는다. 다른 예로, 벼의 OsSPS1(Sucrose Phosphate Synthase1) 유전자가 파괴되면 불임 화분이 형성된다고 알려져 있다. OsSPS1 유전자가 파괴된 돌연변이체는 화분에 충분한 전분을 축적하였지만, 발아 효율은 야생형의 절반으로 감소된 것을 확인되었다.

[0006] 현재까지 벼의 화분 발아 및 관 성장 등에 영향을 미치는 유전자에 대한 연구는 극히 제한적으로 이루어진 바, 이외 웅성불임을 야기할 수 있는 유전자에 대한 더 많은 연구가 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 벼의 생산량 증대를 위하여 연구하던 중, 벼의 특정 유전자의 발현이 억제되어 이의 기능이 결실되는 경우, 화분 발아 및 화분관 신장이 감소되어 웅성불임이 야기되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 웅성불임 벼의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 웅성불임 벼를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 벼의 웅성불임 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 벼의 웅성불임성 확인용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼에서 *Os03g52870* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 웅성불임 벼의 제조방법을 제공한다.

[0016] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os03g52870* 유전자의 발현이 억제된, 웅성불임 벼를 제공한다.

[0017] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os03g52870* 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물을 제공한다.

[0018] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os03g52870* 유전자 발현 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법을 제공한다.

[0019] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os03g52870* 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 *Os03g52870* 유전자의 발현 억제 및 기능이 억제된 웅성불임 벼의 제조방법 및 이로부터 제조된 웅성불임 벼에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, *Os03g52870* 유전자의 발현 억제 및 기능이 억제된 벼에서 화분 발아 및 화분관 신장이 감소되어 웅성불임이 야기되는 것을 확인하였다. 본 발명에 따른 *Os03g52870* 유전자의 활성 조절을 통한 웅성불임 계통 제조방법 및 이로부터 제조된 웅성불임 계통은 기존의 육종 방식을 효과적으로 개선하기 위한 것으로, 환경의 영향을 거의 받지 않고 안정적으로 이용할 수 있어 벼 육종산업의 발전에 크게 기여

할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 gori 돌연변이체의 생성 및 표현형(phenotype) 분석에 대한 것으로, 도 1(a)는 자가(selfed) GORI/gori 돌연변이 라인의 자손에서 분리비율(segregation ratio)을 분석한 결과이며, 야생형(wild type, WT)에 있어서 관측된 데이터와 예측된 비율 1:1 사이의 관계를 평가하기 위해 카이-제곱 테스트(chi-square test)를 수행하였다. 도 1(b)는 야생형(wild type, WT) 및 GORI 돌연변이의 DNA 구조를 나타낸 결과로, GORI / gori에서 T-DNA 삽입 위치는 50개의 번역되지 않은 영역(untranslated region (UTR))에 있으며, CRISPR-Cas9의 표적은 빨간색의 화살표 및 박스로 표시하였다. 돌연변이된 뉴클레오타이드 및 아미노산 코돈을 기재하고 있으며, LB: 왼쪽 T-DNA 경계(border); RB: 오른쪽 T-DNA 경계; 하얀색 영역은 50 또는 30 UTR이고 검은색 영역은 엑손(exon)이다. 도 1(c)는 GORI 및 gori 돌연변이체의 전체 식물의 사진이며, 도 1(d)는 각 개체의 꽃 구조의 사진이고, 도 1(e)는 각 개체의 화분을 염색한 사진이며, 도 1(f)는 각 개체의 화분벽(pollen wall)의 정상적인 형성 여부를 확인한 도이다. 상기 도 1(c) 및 도 1(f)에 있어서, WT 및 gori의 차이는 확인되지 않았다(하얀색 바(Bars)=도 1(c): 20 cm, 도 1(d): 2mm, 도 1(e): 100 μ m). 도 1(g)는 WT에서는 원추꽃차례(panicle)가 종자를 형성한 반면, gori 돌연변이체(gori-2)는 불임인 것을 확인한 결과이다(하얀색 바= 2cm). 도 1(h) 내지 도 1(j)는 각 개체의 생체내(In vivo) 발아(germination)를 확인한 결과로, 도 1(h)는 WT의 이미지이며 빨간색 별표는 화분관이 암술대(style)를 가로질러 정공(micropyle)에 도달했음을 나타낸 것이고, 도 1(i)는 gori 돌연변이체의 이미지이며 노란색 화살표는 gori 돌연변이체에서 성장이 중단된 관은 정공을 향하지 않았음을 나타낸 것이며, 도 1(j)는 WT와 gori 돌연변이체의 암술 전체 이미지를 나타낸 것이다(하얀색 바= 100 μ m). 도 1(k)는 벼 암술(rice pistil)의 계획(Scheme)을 나타낸 것으로 분홍색 선은 염색에 의해 관찰된 PT의 유형을 나타내며, gori 돌연변이체의 암술머리(sigma) 및 암술대(style)의 중단된 성장에서 최대 PT 성장을 나타낸다. 도 1(l)은 암술에서 표적화된 화분관의 통계적 분석의 결과이다. 상기 도 1의 결과는 3개의 독립적인 실험에서 수집되었으며(각 유전자형에 대해 n> 50개 암술), 오차 막대(Error bar)는 3회 반복 결과의 표준 편차이다.

도 2는 야생형 및 gori 돌연변이체의 생체외(In vitro) 화분 발아를 나타낸 것으로, 도 2(a) 및 도 2(c)는 고체 발아 배지에서 생체외 발아 20분 후에 WT의 PT의 현미경 사진(Micrographs)이다. 도 2(b) 및 도 2(d)는 고체 발아 배지에서 생체외 발아 20분 후에 gori 돌연변이체의 PT의 현미경 사진이다. 상기 도 2(a) 내지 도 2(d)에 있

어서, ◀는 발아되지 않은 상태, ^는 발아되지 않고 파열된 상태, →는 발아된 상태의 화분을 나타낸다(검은색 바= 도 2(a) 및 도 2(b): 100 μ m, 도 2(c) 및 도 2(d): 50 μ m). 도 2(e)는 WT 및 gori 돌연변이체의 화분립(pollen grain)의 생체외 발아율(germination percentage)을 나타낸 도이다(각 유전자형(genotype)에 대하여 n>200개의 화분립). 오차 막대는 5회 반복 결과의 표준 편차이다.

도 3은 WT 및 gori 돌연변이체의 PT에서 펙틴(Pectin)의 분포를 확인한 것으로, 도 3(a)는 생체외(In vitro) 발아 20분 후 WT의 PT의 현미경 사진이고(검은색 바=100 μ m), 도 3(b)는 생체외 발아 20분 후 gori 돌연변이체의 PT의 현미경 사진으로(검은색 바=100 μ m), 상기 도 3(a) 및 도 3(b)에 있어서, 대표적인 PT 형태를 확대하여 상자에 표시하였으며, 이에 있어 빨간색 화살표는 고도로 염색된 메틸에스테르화된(methyl esterified) 펙틴을 나타낸다(검은색 바=50 μ m). 도 3(c)는 WT의 PT에 있어서, 디-에스테르화(de-esterified) 및 메틸에스테르화된 펙틴이 표지(label)된 LM19 및 LM20 항체를 이용하여 펙틴 분포를 확인한 결과이고, 도 3(d)는 gori 돌연변이체의 PT에 있어서, 상기 LM19 및 LM20 항체를 이용하여 펙틴 분포를 확인한 결과이다. 상기 도 3(c) 및 도 3(d)에 있어서, 상단 패널(upper panel)은 2분 내지 5분동안 발아한 후의 결과이고, 하단 패널(lower panel)은 15분동안 발아한 후의 결과이다. 더불어 점선은 PT 영역에서 관찰되지 않는 신호를 나타내며, 도 3(d)에 있어서 gori 돌연변이는 LM19의 정점 분포와 같은 국소화를 변경함을 나타내었다(하얀색 바= 5 μ m).

도 4는 WT 및 gori 돌연변이체의 발아중인 PT에 있어서 액틴(Actin)의 레벨을 확인한 것으로, 도 4(a)는 생체외 발아 15분 후 WT 및 gori 돌연변이체의 PT를 염색한 결과이고, 도 4(b)는 발아 2분 내지 5분 후 즉시 고정된 WT 및 gori 돌연변이체의 화분립(follen grain)을 염색한 결과이며, 도 4(c)는 각 개체의 발아중인 관의 이미지를 확대한 결과로, gori 돌연변이체에서 발아중인 팁(tip)에서 약한 액틴 신호를 나타내고, 도 4(d)는 2분 내지 5분의 발아중인 화분립의 최대 투사 영상(maximum projection image)으로부터 염색에 의한 형광을 결정하여 액틴 필라멘트(actin filament, F-actin)의 양을 평가한 결과이다(값(Values)은 평균+SD를 나타내며, 통계적 차이를 분석하였다(n>20). 더불어 빨간색 화살표는 PT를 나타낸다(하얀색 바= 20 μ m(도 4(b): 10 μ m, 도 4(c): 5 μ m).

도 5는 GORI 매개 PT 성장에 있어서 중요한 역할을 하는 유전자를 확인한 것으로, 도 5(a)는 WT 및 gori 돌연변이체의 꽃밥(anther)의 화분 성숙 단계에서 DEG(differentially expressed genes)를 비교한 결과이고, 도 5(b)는 도 5(a)를 통해 확인된 화분-특이적 하향 조절된 유전자의 DEG에 의한 온톨로지 농축 분석(Gene Ontology(GO) enrichment analysis) 결과이며, 도 5(c)는 WT 및 gori 돌연변이체간의 전사 프로파일(transcript profile)을 비교한 결과로, MapMan에 의한 gori 돌연변이체에서 차별적으로 발현된 유전자의 대사적 프로파일의 개요(Overview)를 나타내는 것으로, 빨간색 박스는 전사체가 하향 조절되었음을 나타내고, 분홍색 상자는 화분 특이적 발현 프로파일을 가진 하향 조절된 유전자를 나타내며, 녹색 상자는 gori 돌연변이체에서 상향 조절된 전사체를 나타낸다(AGP: 아라비노갈락탄 단백질(arabinogalactan protein); CHO: 탄수화물(Carbohydrate); LRR: 류신이 풍부한 반복(Leucine-rich repeat); OPP: 산화성 오탄당 경로(oxidative pentose pathway); PME: 펙틴 메틸에스테라아제(pectin methylesterase); TCA: 트리카르복실산 회로(tricarboxylic acid cycle)).

도 6은 GORI-상호작용 단백질을 식별한 것으로, 도 6(a)는 베이트(bait) 및 프레이(pre) 플라스미드를 AH109 균주에 도입하여 효모 이중잡종체계(Yeast two-hybrid, Y2H) 분석을 수행한 결과이고, 도 6(b)는 AH109 균주에서 GORI 베이트의 자가 전사 활성(self-transcriptional activity)을 확인한 결과로, GORI 베이트를 포함하는 효모 형질전환체는 SD 선택 배지에서 성장하지 않았음을 나타내며, 도 6(c)는 화분 발생 단계(pollen developmental stage)를 포함하여 벼 조직에서 발현되는 GORI 및 이의 상호작용 단백질의 히트맵 분석(Heatmap analysis) 결과이고, 도 6(d)는 WT 및 gori 돌연변이의 꽃밥에서 상기를 통해 확인된 상호작용 단백질에 대한 유전자의 RT-qPCR 결과이다. 이때 유비퀴틴 5(ubiquitin 5 (OsUbi5, Os01g22490))에 의한 상대적 발현이 제시되며, 오류 막대는 표준편차를 나타낸다. 각 반응에 대하여 3가지 생물학적 복제가 수행되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명자들은 웅성불임이 유도된 벼를 제조하기 위하여 다양한 연구를 수행하던 중, *Os03g52870*이 화분 발아 및 화분관 신장에 관여하는 유전자임을 확인하고, *Os03g52870* 유전자의 발현을 억제하여 웅성불임 벼를 제조할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0026] 따라서 본 발명은 벼에서 *Os03g52870* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 웅성불임 벼의 제조방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명에서 용어 “벼”는 학명이 *Oryza sativa* L.이며, 일년생 초본식물이고, 본 발명에서의 벼는 자포니카(Japonica)형, 인디카(Indica)형 및 자바니카(Javanica)형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 “*Os03g52870*”는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 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 *Os03g52870*과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 의미할 수 있다. 본 발명에 있어서 상기 *Os03g52870* 유전자는 “GORI 유전자”로 명명될 수 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 “웅성불임”은 웅성기관의 형태적 또는 기능적 이상 때문에 수분, 수정, 종자현상이 이루어지지 않는 현상을 의미하며, 환경적인 일시적 변이로서 발현하는 경우와 유전형질로서 발현하는 경우가 있으나, 본 발명에서의 웅성불임은 유전형질로서 유도되는 것일 수 있다. 특히, 본 발명에서의 웅성불임은 화분 발아 및 화분관 신장에 관여하는 핵의 *Os03g52870* 유전자의 발현을 억제하여 유도되는 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 상기 단계는 *Os03g52870* 유전자의 1 이상의 일부 염기를 치환 또는 결실하여 이루어지는 것일 수 있으며, 예를 들어 전장 DNA 중 10%, 구체적으로는 0.01% 이상의 염기를 치환 또는 결실하여 이루어지는 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 4개의 염기를 치환 또는 결실하여 이루어질 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 발현이 억제된 *Os03g52870* 유전자는 225 내지 244 위치의 염기서열이 치환 또는 결손될 수 있으며, 보다 바람직하게는 237 내지 240 위치의 CCAG 염기가 치환 또는 결손될 수 있고, 상기 237 내지 240

위치가 결손된 *Os03g52870* 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.

- [0032] 또한 상기 단계는 T-DNA 삽입에 의해 이루어지는 것일 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 *Os03g52870* 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이체는 화분관의 성장 중단을 보이며, 화분 발아의 결함을 보여 웅성불임을 나타내었다. 본 발명에서 상기 T-DNA가 *Os03g52870* 유전자에 삽입되는 위치는 특별한 제한이 있는 것은 아니며, 본 발명의 일실시예에서는 *Os03g52870* 유전자의 시작코돈 앞 74번째 위치의 번역되지 않은 영역(untranslated region (UTR))에 있어서, 5'-URT의 ATG로부터 역방향으로 300번째 서열 사이(-300UTR5')에 삽입되어 웅성불임을 야기함을 확인하였다.
- [0033] 더불어 상기 단계는 CRISPR-Cas9에 의한 유전자 편집에 의해 이루어질 수 있다.
- [0034] 또한 상기 단계는 T-DNA와 같은 식물 게놈내 삽입이 가능한 외래 유전자 외에도, TOS17과 같은 내생 트랜스포존을 이용하거나 엑스레이(X-ray)나 감마레이(gamma-ray) 등을 주사하여 돌연변이를 유발하거나, RNAi 또는 안티센스 방법을 이용하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 "T-DNA"는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 종의 Ti(tumor-inducing) 플라스미드내의 전달(transfer) DNA로서 숙주 식물세포의 핵으로 전달되는 DNA 절편을 말한다. T-DNA의 양 끝 가장자리에는 25 bp의 반복서열이 존재하며, 전달은 왼쪽 경계(border)에서 전달이 시작되어 오른쪽 경계에서 종료된다. 박테리아 T-DNA는 약 20,000bp 길이로서 이들의 삽입에 의하여 타겟 유전자를 붕괴시킴으로서 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis)를 일으키는 데에 사용되며, 삽입된 T-DNA 서열은 돌연변이를 일으킬 뿐 아니라 타겟 유전자를 표지하기도 한다.
- [0036] 더불어 본 방법은 *Os03g52870* 유전자의 발현이 억제된 벼를 모본으로 하여, 웅성 가임의 벼와 교배시키는 단계;를 더 포함할 수 있다. 이와는 반대로 *Os03g52870* 유전자의 발현이 억제된 벼를 부분모본으로 하여, 야생형 모본과 교배시키는 단계를 추가로 포함하게 되면 웅성불임의 벼를 제조할 수 없다.
- [0037] 상기 교배 방법은 기존 공지된 방법 중 어느 것을 사용해도 무관하며, 예를 들어 가장 일반적으로 벼 교배 육종에 가장 많이 사용하는 절영법을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 더불어 본 발명은 *Os03g52870* 유전자의 발현이 억제된, 웅성불임 벼를 제공한다.
- [0039] 상기 벼는 자포니카(*Japonica*)형, 인디카(*Indica*)형 및 자바니카(*Javanica*)형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며 모든 벼 품종에 적용 가능하다.
- [0040] 상기 벼의 웅성불임은 가역적인 것일 수 있다. 즉, 상기 웅성불임의 벼의 임성은 정상적인 *Os03g52870* 유전자의 도입에 의해서 회복될 수 있다.
- [0041] 또한 본 발명은 *Os03g52870* 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물을 제공한다.
- [0042] 상기 제제는 *Os03g52870* 유전자 또는 mRNA에 직접 또는 간접적으로 결합하여 *Os03g52870*의 발현을 억제할 수 있는 물질을 의미한다.
- [0043] 예를 들어 상기 제제는 *Os03g52870* 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acid) 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 즉, 상기 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acid) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 *Os03g52870* 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하여 *Os03g52870* 단백질 합성을 위한 번역을 억제할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 "siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법이다.
- [0045] 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음)등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구

조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 타겟 유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA분자)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. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

[0046] 본 발명에 있어서, 상기 "shRNA(short hairpin RNA)"는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드를 의미하며, in vivo상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루고 있다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 "miRNA(microRNA)"는 유전자 발현을 조절하며, 전장 20-50개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 20-45개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 20-40개 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 20-30개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 21-23개의 뉴클레오타이드로 구성된 단일 가닥 RNA분자를 의미한다. miRNA는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드이며, 짧은 스템-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는 2 이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며, 상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 "리보자임(ribozyme)"은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 되어 있다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 "PNA(Peptide nucleic acid)"는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로, 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다.

[0050] 상기 PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.

[0051] 본 발명에 있어서, 상기 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

[0052] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.

[0053] 더불어 본 발명은 Os03g52870 유전자 발현 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 융성불임성을 확인하는 방법을 제공한다.

[0054] 상기 Os03g52870 유전자 발현 여부를 측정하는 단계에 있어서, 대상 벼의 Os03g52870 유전자의 발현 여부를 측정하여 그 발현이 억제된 경우 상기 대상 벼가 융성불임인 것으로 판정할 수 있다.

- [0055] 상기 융성불임성을 확인하는 방법은 상기 *Os03g52870* 유전자의 mRNA 수준 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하여 이루어지는 것일 수 있다.
- [0056] 상기 유전자의 mRNA 수준은 별도의 제제를 이용하여 측정할 수 있다. 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 예를 들어 상기 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.
- [0058] 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RTPCR(Competitive RTPCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 칩 분석법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 상기 단백질의 수준은 별도의 제제를 이용하여 측정할 수 있다. 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 예를 들어 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미한다. 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 될 수 있다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 "앵타머"는 단일 가닥 올리고 뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앵타머는 그 염기서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있으나 이들에 한정되지 않는다.
- [0062] 상기 단백질의 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0063] 또한 본 발명은 *Os03g52870* 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 벼의 융성불임성 확 인용 조성물을 제공한다.
- [0064] 상기 제제는 상기 *Os03g52870* 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 상기 제제는 상기 *Os03g52870* 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0069] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0071] 실시예 1. 재료 및 방법

[0072] 1-1. 식물 및 성장 조건

[0073] 자포니카(japonica) 품종인 동진벼((*O. sativa* ssp. japonica) cv. Dongjin) 및 생성된 형질전환 식물을 28℃ (16시간 낮) 및 22℃(8시간 밤)의 온실(greenhouse) 및 논(paddy field)에서 재배하였다. GORI 유전자(*Os03g52870*)(cv. Hwayoung)에 T-DNA 삽입을 전달하는 2B-50009 라인은 공지된 T-DNA 삽입 돌연변이 집단 중 선택하였다. 종자를 반강성 MS 배지(half-strength MS medium)에서 발아시킨 후, 10일 뒤 묘목을 토양으로 옮겼다. 더불어 브롬화세틸트리메틸암모늄(cetyltrimethylammonium bromide) 방법을 통해 잎에서 DNA를 준비하고, 하기 표 1의 유전자 특이적 프라이머와 T-DNA 프라이머를 사용한 PCR을 통해 유전자형을 결정하였다.

표 1

	프라이머 명칭	서열(5' - 3')	서열번호
T-DNA genotyping	2B-50009-F	GTGTCATGGAGGATGAATTC	3
	2B-50009-R	CCTTCCACACCCTGATCTTG	4
	2707 Tubr	GGTGAATGGCATCGTTGAA	5
	NGUS	AACGCTGATCAATTCCACAG	6
	HPH-F	GATCGTTATGTTTATCGGCACTT	7
	HPH-R	TTCCACTATCGGCGAGTACTTCT	8

[0076] 1-2. RNA 분리 및 역전사 정량 증합효소 연쇄반응(reverse-transcription quantitative PCR, RT-qPCR)

[0077] 샘플을 액체 질소에서 즉시 동결시켰다. 그 후, TRIZOL 시약(Invitrogen)이 결합된 RNase Plant Mini kit(Qiagen) 및 DNase 처리를 통하여 총 RNA를 추출하였다. 첫 번째 가닥 cDNA(first-strand cDNA)는 MMLV 역전사 효소(Reverse Transcriptase (Promega)) 및 올리고(dT)(Oligo(dT)) 15 프라이머로 합성되었다. 이를 이용하여 기존 공지된 방법으로 RT-qPCR을 수행하였다. 이때 하기 표 2의 프라이머를 사용하였다.

표 2

프라이머 명칭	서열(5' - 3')	서열번호
GORI_qrt_f	TACGTCGAGGTCCGCAAGAA	9
GORI_qrt_r	GCACTTGGAGTCGTTGATCC	10
OsUbi5_F	GCACAAGCACAAGAAGGTGA	11
OsUbi5_R	GCCTGCTGGTTGTAGACGTA	12

[0080] 1-3. GORI 유전자(*Os03g52870*) T-DNA 삽입 돌연변이체의 제작

[0081] pGA2707 벡터(T-DNA 삽입 돌연변이체 제작용 벡터) 2μg를 아그로박테리움 캄피턴트 셀(*Agrobacterium tumefaciens* LB4404)과 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서 액체질소에 75초간 넣은 후, 37℃ 오븐에서 5분 동안 방치하고, 이에 1 ml의 LB(Luria-Bertani broth) 액체 배지를 넣은 다음 3시간 동안 28℃의 진탕배양기(Shaking incubator)에서 배양하였다. 그 후 테트라사이클린(Tetracycline) 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간후 생성되는 콜로니를 PCR을 통해 확인하였다.

[0082] 상기 생성된 형질전환된 아그로박테리움을 벼의 형질전환 실험에 사용하였다. 28℃ 생장실에서 동진벼 종자를 N6D 고체 배지에서 7일 정도 키워서 벼의 캘러스(callus)를 생성하였다. 생성된 캘러스와 72시간동안 배양한 pGA2707 식물 발현용 벡터로 형질 전환된 아그로박테리움 세포를 혼합하고, 22℃ 암실의 생장실에서 N6D-아세트 시린곤(N6D-Acetosyringone)을 포함하는 배지에서 배양하였다.

[0083] 아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 세척한 후 N6D 고체 배지하에서 1차 (hygromycin 30 mg/L), 2차 (hygromycin 40 mg/L)에 걸친 계대 배양을 통해 하이그로마이신(hygromycin) 선발을 진행하였다. 상기 하이그로마이신 선발은 28℃ 생장실에서 4 주 동안 이루어졌다(각 차수마다 2주씩 수행). 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR (hygromycin 40 mg/L) 고체배지에 옮겨 4주 28℃ 광조건 생장실에서 재분화를 유도한 후, 식물체를 MS 고체 배지로 옮기고 7일 28℃ 광조건 생장실에서 키우고 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

[0084] 재분화된 형질전환 식물체 잎의 DNA를 추출 후, PstI 제한효소를 이용하여 절단 및 자가-결합(self-ligation)을 진행하였다. pGA2707에 존재하는 PCR 올리고(표 3)를 이용하여 역-PCR(inverse-PCR)을 수행하였고, 시퀀싱 분석을 통하여 벼 게놈상에서 T-DNA 삽입 위치를 확인하였다.

표 3

[0085]

	프라이머 명칭	서열(5' - 3')	서열번호
pGA2707 inverse PCR	242R	TTGGGGTTTCTACAGGACGTAAC	13
	hph4R	CCATGTAGTGTATTGACCGATTC	14
	DA2R	CAAGTTAGTCATGTAATTAGCCAC	15
	hph1R	TCGTCTGGCTAAGATCGCCGCA	16

[0087] 1-4. CRISPR/Cas을 사용한 GORI 유전자(*Os03g52870*) 돌연변이체의 제작

[0088] T-DNA가 삽입된 돌연변이는 동형접합 자손을 생산할 수 없으므로, T₀ 세대에서 CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 동형접합체 돌연변이를 제작하고, GORI 유전자의 발현 변화가 음성발현에 미치는 영향을 확인하였다.

[0089] 단일 가이드 RNA(single-guide RNA)를 위한 두 개의 독립적인 부위를 표적으로 하기 위해 크리스퍼-캐스 9(CRISPR-Cas9)기술을 사용하였다. 특정 표적 서열은 CRISPR 소프트웨어를 사용하여 확인하였다. GORI 코딩 영역의 225-244 (표 4의 gori-2) 뉴클레오타이드(nucleotide)의 올리고머(oligomer)를 합성하여 pRGE32 이원 벡터(binary vector (Addgene plasmid ID 63142)의 BsaI 부위에 연결하였다.

[0090] 아그로박테리움 컴피던트 셀(Agrobacterium tumefaciens LB4404) 50μl와 1μg의 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서 액체질소에 75초간 넣은 후, 37℃ 오븐에서 5분 동안 방치하고, 이에 1 ml의 LB 액체 배지를 넣은 다음 3시간 동안 28℃의 진탕배양기에서 배양하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간후 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양하여 선별하였다.

[0091] 상기 생성된 형질전환된 아그로박테리움을 벼의 형질전환 실험에 사용하였다. 28℃ 생장실에서 동진벼 종자를 N6D 고체 배지에서 7일 정도 키워서 벼의 캘러스를 생성하였다. 생성된 캘러스와 72시간동안 배양한 pGA2707 식물 발현용 벡터로 형질 전환된 아그로박테리움 세포를 혼합하고, 22℃ 암실의 생장실에서 N6D-아세트시린곤을 포함하는 배지에서 배양하였다.

[0092] 아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 세척한 후 N6D 고체 배지하에서 1차 (hygromycin 30 mg/L), 2차 (hygromycin 40 mg/L)에 걸친 계대 배양을 통해 하이그로마이신 선발을 진행하였다. 상기 하이그로마이신 선발은 28℃ 생장실에서 4 주 동안 이루어졌다(각 차수마다 2주씩 수행). 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR (hygromycin 40 mg/L) 고체배지에 옮겨 4주 28℃ 광조건 생장실에서 재분화를 유도한 후, 식물체를 MS 고체 배지로 옮기고 7일 28℃ 광조건 생장실에서 키우고 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

[0093] 재분화된 형질전환 식물체 잎의 DNA를 추출 후, GORI CasF와 CasR 올리고를 이용하여 PCR을 통한 염기서열 증폭한 후 시퀀싱 분석을 통하여 염기서열의 돌연변이가 일어난 식물체를 선별하였다.

표 4

[0094]

	프라이머 명칭	서열(5' - 3')	서열번호
CRISPR-Cas9-target construct	gori-2 F	GGCAGTCGCCCTGGAACCAGACCA	17
	gori-2 R	AAACTGGTCTGGTTCCAGGGCGAC	18
Genotyping	GORI cas F	CACTCCGACCCAAACCTCCA	19

GORI cas R	GAATCCTTCTGCTTGCGCCA	20
------------	----------------------	----

[0096] 1-5. 화분 및 화분관의 세포학적 분석(cytological analysis)

[0097] 꽃과 꽃밥(anther)은 SZX61 현미경(Olympus)을 사용하여 촬영하였다. 화분의 성숙(maturation)을 조사하기 위하여, 개화(anthesis) 전에 소수(spikelet)를 수집하고, 핀셋을 이용하여 화분립(pollen grain)을 짜내어 1% I₂-KI로 염색하였다. 유사하게, 화분립의 화분내벽 층(intine layer)을 0.1% 칼코플루오르 화이트(Calcofluor White)로 15분동안 염색하고 자외선(UV light) 하에서 모니터링하였다. 화분벽(pollen wall)의 바깥 층인 엑신(exine)은 0.001% 아우라민 O(Auramine O)로 염색하였고, BX61 현미경(Olympus)의 FITC(fluorescein isothiocyanate) 채널에서 관찰하였다. 시험관 내 화분 발아율 및 화분관(pollen tube, PT)의 형태를 관찰하기 위하여, 개화 직후 수집된 신선한 화분립을 고체 또는 액체상의 화분 발아 배지(pollen germination medium, PGM)에 넣고 즉시 흔들어 배양하였다. 상기 PGM은 20%(w/v) 수크로오스(sucrose), 10% 폴리에틸렌 글리콜 4000(polyethylene glycol(PEG) 4000), 3mM의 질산 칼슘(calcium nitrate), 40mg L⁻¹의 붕산(boric acid) 및 10 mg L⁻¹의 비타민 B1(vitamine B1)(pH 6.8-7.0)을 첨가하여 준비하였다. 1% 아가로오스(agarose)를 함유한 응고된 PGM 슬라이드를 커버 글래스로 덮고, 28℃의 어둡고 습한 챔버(chamber)에서 20분 동안 배양하였다. 각 실험에서 최소 150개의 화분립에 대한 발아율 및 PT 길이를 분석하였다. PT에서 펙틴(pectin)을 시각화하기 위하여, 발아된 화분을 최종 농도 0.01%(w/v)의 루테늄 레드(ruthenium red (Sigma-Aldrich)로 염색하고 BX61 현미경으로 확인하였다. 유사하게, 원형질막(plasma membrane, PM)을 시각화하기 위하여, 발아된 화분을 최종농도 10 μM의 FM4-64(Invitrogen)으로 염색하고, BX61 현미경 또는 공초점 주사 레이저 현미경(confocal scanning laser microscope, CSLM (LSM 510 META, Carl Zeiss)를 이용하여 RFP(Red Fluorescent Protein) 채널에서 관찰하였다.

[0098] 더블어 펙틴 면역표지화(immunolabeling)는 다음과 같이 수행하였다. 2분 내지 5분 이내에 발아하고 15분 이내에 충분히 신장(elongation)된 PT를 4% 포름알데하이드(formaldehyde)를 첨가한 액체 PGM에 30분 동안 침지하여 고정한다. 다음, 4% 포름알데하이드를 포함하는 PEM 버퍼(100 mM 피페라진-N,N'-비스(2-에탄설폰산)(ppiperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)), 10 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, 0.3 M 만니톨(mannitol), pH 6.9)에 30분간 침지하여 고정하였다. 이를 PBS로 세척한 후, LM19 및 LM20 단클론 항체(monoclonal antibody) (PBS로 1:50 희석)와 함께 2시간 동안 배양하였다. 다시 PBS로 세척한 후, PT를 FITC(fluorescein isothiocyanate)가 결합된 래빗 안티-랫트 IgG(rabbit anti-rat IgG (Sigma F1763, PBS로 1:200 희석)와 함께 2시간동안 배양하였다. 이를 PBS로 세척한 후, CSLM을 이용하여 관찰하였다.

[0099] 액틴 세포골격(actin cytoskeleton)은 다음과 같은 과정을 통해 염색하였다. 액상 PGM의 발아된 화분을 300 μM의 3-말레이미도벤조익산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(3-Maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester)에서 1시간 동안 고정하였다. 그 후, PT를 0.05% NP-40(Nonidet P-40)을 포함하는 액상 배지에 넣고 10분 동안 배양하여 안정적인 막(membrane)을 생성하였다. 이를 PBS(pH 7.4)로 세척한 후, 액틴 필라멘트(actin filament, F-actin)를 2%(w/v) 글리세롤을 포함하는 PEM 버퍼 내의 6.6 μM의 알렉사 플루오르 488-팔로이딘(Alexa Fluor 488-phalloidin (Invitrogen))으로 염색한 후, 488-nm 아르곤 레이저(argon laser)를 이용하여 CSLM 하에서 확인하였다. Image J 소프트웨어(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>, 버전 1.46g)를 사용하여 평균 회색값(gray value)를 측정하여 화분립 및 관에서 F-액틴의 상대적인 양을 정량하였다.

[0100] 암술(pistil)에서 아닐린 블루(aniline blue)를 이용한 PT의 칼로스(Callose) 염색은 다음과 같이 수행하였다. 먼저 2시간의 수분(pollination) 후, 암술을 식물로부터 제거하고, 카르누아 용액(Carnoy's solution)에서 밤새 배양하였다. 그 후 증류수로 5회 세척(회 당 5분)한 후, 1M NaOH에서 6시간 동안 배양하였다; 암술을 2회 세척(회 당 10분)한 후, 0.05%의 아닐린 블루(0.1 M K₂HPO₄, pH 8.5 에 포함)로 1시간 동안 암흑에서 염색하였다. 그런 후, 50% 글리세롤로 암술을 고정하고, 형광 현미경(Olympus BX61)을 이용하여 자외선에서 관찰하였다.

[0102] 1-6. RNA 시퀀싱 분석(RNA sequencing(RNA-seq) analysis)

[0103] RNA-seq 분석을 위하여, 13-14 단계(Zhang and Wilson, 2009 참고)의 성숙한 화분립을 포함하는 꽃밥을 사용하였다. 시퀀싱 라이브러리(sequencing library)는 상용화된 일루미나 라이브러리 준비 키트(Illumina library

preparation kit (TruSeq Stranded mRNA LT)를 사용한 5' 및 3' 어댑터 결합(adapter ligation)에 이은 cDNA 샘플의 무작위 단편화(random fragmentation)에 의해 준비하였다. RNA-seq는 Macrogen Inc.의 일루미나 플랫폼(Illumina platform)에서 수행하였다. 원데이터(raw data)는 Cutadapt를 사용하여 정리하였고, MSU7 참조 게놈(RGAP)에 매핑된 후(mapped) R 패키지(R package)를 사용하여 FeatureCounts 및 DESeq2를 이용한 원 판독 계수(raw read counting)에 의해 정규화되었다. cuffdiff를 사용하여 DEG(differentially expressed genes) 분석을 수행하였고, $P < 0.05$ 및 $\log_2$ 배수(fold) 변화 > 1 (즉, 배수 변화(fold change) > 2)인 유전자를 선택하였다. 유전자 온톨로지 용어(GO Term) 농축(enrichment)을 조사하기 위하여, GO 카테고리에서 중요한 term을 선택하였다($P < 0.05$, 최소 2배 농축 값). R 스튜디오(R studio(버전 1.1.453)) 및 ggplot2 R 패키지(버전 3)을 사용하여 데이터를 시각화하기 위한 플롯(plot)을 생성하였다. MapMan 프로그램을 이용하여 유전자를 각각의 기능적 카테고리로 분류하고, 다양한 다이어그램(diagram)을 통해 데이터를 시각화하였다. 이들의 기능적 분류를 위하여, RGAP 로커스 ID(RGAP Locus ID)를 MapMan 프로그램에 업로드하였다. GORI 및 gori 돌연변이체를 이용한 하향조절된 유전자의 네트워크를 구축하기 위하여, Rice Interactions Viewer 및 STRING를 사용하였다. 네트워크 파일은 다운로드되었고, Cytoscape에 업로드되었다.

[0105]

1-7. 효모 이중잡종체계(Yeast two-hybrid, Y2H) 분석

[0106]

GORI의 전장 코딩 서열(Full-length coding sequence)은 pGBKT7 벡터의 EcoRI/BamHI 사이트에서 GAL4 DNA-결합 도메인과 융합되었다. GORI 배이트(bait)의 자가 전사 활성(self-transcriptional activity)을 확인하기 위하여, 플라스미드를 빈 프레이(pre) 벡터와 함께 효모 균주(yeast strain) AH109에 도입하였다. 상기 AH109에는 HIS 및 ADE2 리포터(reporter)가 존재한다. 양성 대조군 효모는 태그 배이트(pGBKT7-53) 플라스미드 및 p53(pGADT7-T) 프레이 플라스미드로 형질전환하였다. 상기 pGBKT7-53은 뮤린 p53과 융합된 Gal4 DNA 결합 도메인을 인코딩하는 반면, pGADT7-T는 SV40 대형 T-항원과 융합된 Gal4 활성화 도메인을 인코딩한다. 음성대조군 효모는 부모의(parental) 배이트 벡터(pGBKT7) 및 프레이 벡터(pGADT7)로 형질전환하였다. 라이브러리 스크리닝은 벼 꽃밥 라이브러리를 이용하여 Panbionet 회사(<http://www.panbionet.com/>)에서 수행하였다. cDNA 활성화 도메인 라이브러리를 생성하기 위하여, 성숙한 벼 꽃밥의 총 mRNA를 cDNA로 합성하고, Mate 및 Plate 라이브러리 시스템(Mate and Plate library system(Clontech))을 사용하여 SmaI-선형화된 pGADT7-Rec 벡터(SmaI-linearized pGADT7-Rec vector)와 함께 효모 균주 AH109로 공동 형질전환(co-transformed)하였다. 라이브러리 스크리닝은 Panbionet 회사에서 수행하였다. GORI 배이트 플라스미드 및 프레이 라이브러리의 효모 형질전환체를 류신(leucine), 트립토판(tryptophan), 히스티딘(histidine) 및 아데닌(adenine)이 결여된 SD 배지(SD-LWHA)에 확산시켜, 배이트 및 프레이 플라스미드로 효모의 성장을 지원하여 서로 상호작용하는 단백질을 생성하였다. 대조군인 벼 묘목(seedling)의 프레이 라이브러리에서는 GORI의 상호작용 파트너는 감지되지 않았다. 스크리닝된 1.13×10^7 개의 콜로니 중 SD-LWHA 플레이트에서 성장하고, X-a-Gal의 존재하에 파란색으로 변한 60개의 콜로니를 플라스미드 구출(rescue) 및 DNA 시퀀싱에 사용하였다.

[0107]

류신 및 트립토판이 결여된 SD 최소 배지(SD minimal medium, SD-LW)에서 선택된 배이트-효모 형질전환체(bait-yeast transformant)를 류신, 트립토판 및 히스티딘이 결여된 배지(SD-LWH, +5mM 3-AT) 및 류신, 트립토판 및 아데닌이 결여된 배지(SD-LWA)를 포함하는 다양한 SD 선택 배지에 복제-플레이팅하였다(replica-plated). GORI 배이트를 포함하는 효모 형질전환체는 SD 선택 배지에서 성장하지 않았다. 또한, XGal 필터 분석(XGal filter assay)에서 b-갈락토시다아제(b-galactosidase) 활성을 보이지 않았다. 이를 통해 GORI 배이트가 전사 활성화 기능을 가지고 있지 않음을 확인한 바, 추가 Y2H 스크리닝에 사용하였다.

[0109]

실시예 2. GORI 유전자의 웅성 생식 전파(male gametic transmission)에 미치는 영향 확인

[0110]

실시예 1에서 T-DNA 삽입을 통해 제조된 gori를 이용한 GORI/gori 돌연변이의 자손에서 야생형(WT), GORI/gori 이형접합(heterozygote), gori/gori 동형접합(homozygote)의 비율을 확인하였다. 그 결과, 야생형:이형접합:동형접합의 비율이 1:2:1로 나타나지 않고, 동형접합 자손(homozygous progeny)이 없고, 이형접합체(heterozygote)(GORI/gori)와 야생형(wild type, WT)이 1 : 1의 분포를 나타내는 것을 확인하였다(도 1(a)). 이를 통해 GORI 유전자가 배우체적(gametophytic) 결손을 유도할 수 있음을 확인하였다. GORI 돌연변이가 웅성 불임을 유발하는지 확인하기 위하여, WT 식물과 GORI/gori의 상호 교차(reciprocal crosses)를 수행하였다. 그 결과 GORI/gori를 화분 공여자(pollen donor)로 사용하였을 때, 이형접합 자손 또는 동형접합 자손없이 오로지

WT 자손만을 얻었다. 반면, 화분 수용자(pollen recipient)로 사용하였을 때는 1 : 1 비율(14:10, 전달 효율(transmission efficiency)=71.4)의 WT 및 이형접합 자손을 얻었다. 따라서 이러한 유전적 분석을 통해 GORI가 웅성 배우체(male gamete)를 배주(ovule)로 전달하는데 중요한 역할을 함을 확인하였다.

[0111] 추가적으로 GORI가 웅성 전파에 미치는 영향을 확인하기 위해, T₀ 세대에서 CRISPR-Cas9 시스템을 사용하여 동형접합체 돌연변이를 제작하였으며, 야생형 및 *gori* 돌연변이의 DNA 구조를 도 1(b)에 나타내었다. 도 1(b)에 나타낸 바와 같이, *gori* 돌연변이에서 T-DNA 삽입이 일어난 위치는 5'UTR 부분이다. 더불어 시퀀싱 데이터(sequencing data)를 기반으로 독립적인 표적 영역에서 돌연변이를 전달하는 동형접합 라인을 확인하였다. 4-bp가 결실된 동형접합체(*gori-2*로 명명됨)는 코딩 서열의 조기 종료를 유발하였다(도 1(b)). 더불어 동형접합 돌연변이체(*gori-2*)의 대립유전자(allele)는 영양(vegetative) 및 생식(reproductive) 발달 단계에서 성장 결함 없이 웅성불임(sterile)의 표현형(phenotype)을 나타냈다(도 1(c) 및 도 1(d)).

[0112] 화분립 성숙에서 결함 가능성을 확인하기 위하여, 성숙한 화분립을 이용한 실험을 수행하였다. DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)로 핵을 염색한 결과 *gori-2*는 WT와 유사한 3세포 핵(tricellular nuclei)을 가지고 있었으므로, 돌연변이체인 *gori-2*는 정상적인 유사 분열(mitotic division)을 나타냄을 확인하였다. 더불어 돌연변이 라인에서 요오드(iodine) 염색에 의해 분석된 성숙한 화분립의 전분 과립(starch granule) 형성은 WT와 유사하였다(도 1(e)).

[0113] 또한 성숙한 화분립을 아우라민 0 및 칼코플루오르 화이트로 염색하여, 화분립이 온전한 화분 벽을 형성하였는지 확인하였다. 그 결과 *gori-2* 돌연변이체와 WT간의 각 개체의 화분벽의 바깥 층인 엑신(exine)과 가장 안쪽의 층인 인틴(intine)에 있어서, 별다른 차이점은 확인되지 않았다(도 1(f)). 이러한 결과를 통해 GORI는 화분 성숙 단계(stage)까지 화분 발달에 영향을 미치지 않음을 확인하였다;

[0114] 한편 도 1(g)에 나타낸 바와 같이, WT에서는 원추꽃차례(panicle)가 종자를 형성한 반면, *gori-2*는 불임인 것을 확인하였다. 이를 통해 GORI가 화분 발아(germination) 또는 PT 성장과 같은 성숙 단계 이후에 화분 기능에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다. 따라서 아널린 블루 염색을 통해 프로그램 단계(programic phase)에서 표현형을 확인하였다. 그 결과 대부분의 WT의 PT는 암술머리(stigma) 및 암술대(style)를 통해 성장하고 여러개의 관(tube)이 자방강(ovarian cavity)을 통해 빠져나가며, 가장 빠른 관은 정공(micropyle) 암술대를 관통하는 것을 확인하였다. 대조적으로, *gori-2*에서는 화분이 많이 발아되지 않았고, 대부분의 PT는 암술머리에서 성장을 멈췄다(도 1(i) 및 도 1(j)). 추가 통계 분석에 따르면 *gori-2*의 PT는 암술대에 도달하는 것이 최대인 것을 확인하였다(도 1(i) 및 도 1(j)). 따라서 *gori-2*의 PT의 자방(ovary)에 도달하는 성장을 확인하지 못했다(도 1(l)).

[0115] 그러므로 GORI 유전자가 변이되는 경우, 화분 발아 및 PT 성장에 결함이 생김을 확인하였다.

[0117] 실시예 3. 생체의(In vitro) *gori-2*에서 화분 발아 및 화분관 성장의 손상 확인

[0118] GORI 유전자 변이가 PT 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 생체의 내에서 *gori-2*의 발아 습성을 확인하였다. 화분 발아는 트리거 신호(triggering signal) 역할을 하는 입자의 수분 공급으로 시작된다. 생체의 화분 발아 조건에서 WT의 경우 화분의 74.8%가 발아하였으며, PT는 20분 이내에 평균 100 μ m가 늘어났다(도 2(a) 및 도 2(c)). 반면, *gori-2*는 장기간 배양에도 불구하고, 약 19.9%의 화분립 발아를 보였다(도 2(b)). *gori-2*의 PT의 길이는 대부분 짧았으므로(<50 μ m 길이)(도 2(d)), 화분 신장에도 결함이 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 GORI의 기능 상실이 화분 발아 및 화분관의 신장 감소를 야기한다는 것을 확인하였다(도 2(e)).

[0119] 화분관 발아 및 신장은 화분 벽의 발아구(germination aperture)에서 세포벽의 변형 및 세포벽 물질의 침적(deposition)에 따라 달라진다. 따라서 펙틴(pectin)을 염색하는 루테놀 레드를 이용하여, *gori-2*의 PT에서 세포벽 구성 요소의 침적에 결함을 보이는지 확인하였다. 수화되지 않은 화분은 전체 화분립에 있어서 진하게 염색되었다. 그리고 PT에서는 정점에서(apically) 분포된 반면, WT-수화된 화분립에서는 거의 발견되지 않았다(도 3(a)). 그러나 발아된 *gori-2* 화분은 화분립 및 화분관에서 진한 염색을 보였고, 극성(polar) 펙틴의 침적 패턴은 확인되지 않았다(도 3(b)). 추가적으로, 디-에스터화(de-esterified) 및 메틸 에스터화 펙틴(methyl-esterified pectin)이 표지(label)된 LM19 및 LM20 항체를 이용하여 면역형광법 분석(immunofluorescence assays)을 수행하였다. WT에서, LM19-표지된 펙틴 신호는 전체 발아된 관의 생크(shank)를 따라 확인되었지만, 연장된 관의 정점(apex)에서는 확인되지 않았다. LM20-표지된 펙틴 신호는 전체 발아된 관에서 확인되었지만, 관의 끝(tip)에서는 뚜렷하게 확인되지 않았다(도 3(c)). 반면, *gori-2*에서 LM19 및 LM20 신호는 발아된 관에

고르게 분포되지 않았으며, LM19-표지된 신호는 *gori-2* PT의 정점 영역에서도 관찰되었다(도 3(d)). 따라서 *gori-2* PT에서 세포벽 변형 또는 펙틴의 비정상적 분포를 확인하였다.

[0120] 또한, 세포벽 재료는 소포 수송(vesicle trafficking) 및 융합(fusion)에 의해 침적된다. F-액틴(F-actin)은 세포내 도입(endocytosis) 및 세포외 배출(exocytosis)을 포함하는 세포내 수송 현상에 대한 추적(track)을 제공한다. 그러므로, 발아중인 화분의 액틴 분포를 시각화하였다. 그 결과 WT의 화분립은 과립에 액틴 메쉬워크(actin meshwork)가 함유되어 있었고, 생크에 F-액틴이 함유되어 있었다(도 4(a)). 대부분의 *gori-2* 화분립은 다발화된 액틴 케이블(bundled actin cable)이 없는, 탈분극된 형태(depolarized shape)로, 온전한 PT는 확인되지 않았다. 드물게 확인된 신장된 *gori-2* PT의 경우, 유사한 액틴 신호 레벨이 관찰되었지만, 일반적으로 온전한 관에서 검출가능한 신호를 얻는 것은 어려웠다. 발아 5분 이내에 고정된 화분립의 F-액틴 분포 분석 결과는 WT 및 돌연변이체의 통계 분석을 통해 결정된 바와 같이, *gori-2*의 관에서 형광 수준이 약간 감소된 것을 보여주었다(도 4(a) 내지 도 4(d)). 화분립에서의 레벨은 WT 및 돌연변이체 간의 유의미한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과를 통해 *gori-2*는 발아구(aperture)에서 F-액틴의 집합(gathering)을 감소시켜, 발아중인 관에 필라멘트(filaments)를 집중시키고, 또한 PT 벽에서 펙틴의 비정상적 분포를 야기함을 확인하였다.

[0122] 실시예 4. *gori-2* 및 WT 꽃밥의 전사체 분석(Transcriptomic analysis) 및 단백질 분석

[0123] GORI 매개 PT 성장에 있어서 중요한 역할을 하는 유전자를 확인하기 위해 WT와 *gori-2*의 화분 성숙 단계에서 꽃밥의 전사체를 비교했다. 그 결과, 3493개의 차별 발현 유전자(differentially expressed genes, DEGs) 중 WT와 비교하였을 시, *gori-2*에서 1407개가 상향 조절(upregulation)되었고, 2086개가 하향 조절(downregulation)된 것을 확인하였다.

[0124] 더불어 화분의 전사체 변화를 조사하기 위하여, 화분 및 GORI의 영향을 받는 것으로 알려진 화분 특이적 유전자를 포함하여, 7개의 조직(tissue)/기관(organ)으로 구성된 사용가능한 벼 RNA 시퀀싱(RNA-seq) 데이터를 사용하여 메타-해부학적 발현 분석(meta-anatomical expression analysis)을 수행하였다(도 5(a)). 유클리드 거리 측정법(Euclidean distance metric) 및 K-평균 클러스터링 분석(K-means clustering analysis)을 통해, *gori-2* 꽃밥에서 하향조절된 유전자 중 후기 화분 특이적 발현 패턴을 보이는 852개의 유전자를 확인했다. 상기 확인된 852개의 하향 조절된 유전자와 관련된 생물학적 과정을 식별하기 위하여, 유전자 온톨로지 농축 분석(Gene Ontology(GO) enrichment analysis)을 수행하였다. 그 결과, 트랜스포존(transposon) 또는 레트로트랜스포존(retrotransposon)을 인코딩하는 유전자 또는 알려지지 않은 유전자가 많았기 때문에 557개의 유전자는 GO 주석(annotation)이 없는 것을 확인하였다. 더불어 상당히 풍부한 GO term에는 '세포벽 수정(cell wall modification)'(22.5 배) 및 '클라트린 코트 어셈블리(clathrin coat assembly)'(15.7 배)(도 5(b))가 포함되어, 이러한 프로세스가 *gori-2*의 PT 결함과 밀접하게 관련있을 것으로 예상하였다. 또한 MapMan 개요를 사용하여 WT와 *gori-2*의 꽃밥 사이의 DEG와 연관된 기능적 분류를 수행한 결과, 세포벽과 지질 대사(lipid metabolism)가 *gori-2* 돌연변이에서 크게 영향을 받음을 확인하였다. 세포벽 단백질 그리고 펙틴 메틸에스테라아제(pectin methylesterase) 및 익스팬신(expansin)과 같은 세포벽 변형 효소(cell wall modification enzyme)를 포함한 유전자는 특히 *gori-2*에서 화분 특이적인 하향 조절된 유전자로 확인되었다. 반면, 인지질(phospholipid), 당지질 대사(glycolipid metabolism) 및 지방산 합성(fatty acid synthesis)과 관련된 대부분의 DEG는 지질 분해 리파아제 유전자(lipiddegrading lipase gene)를 제외하고는 화분 특이적이지 않았다(도 5(c)).

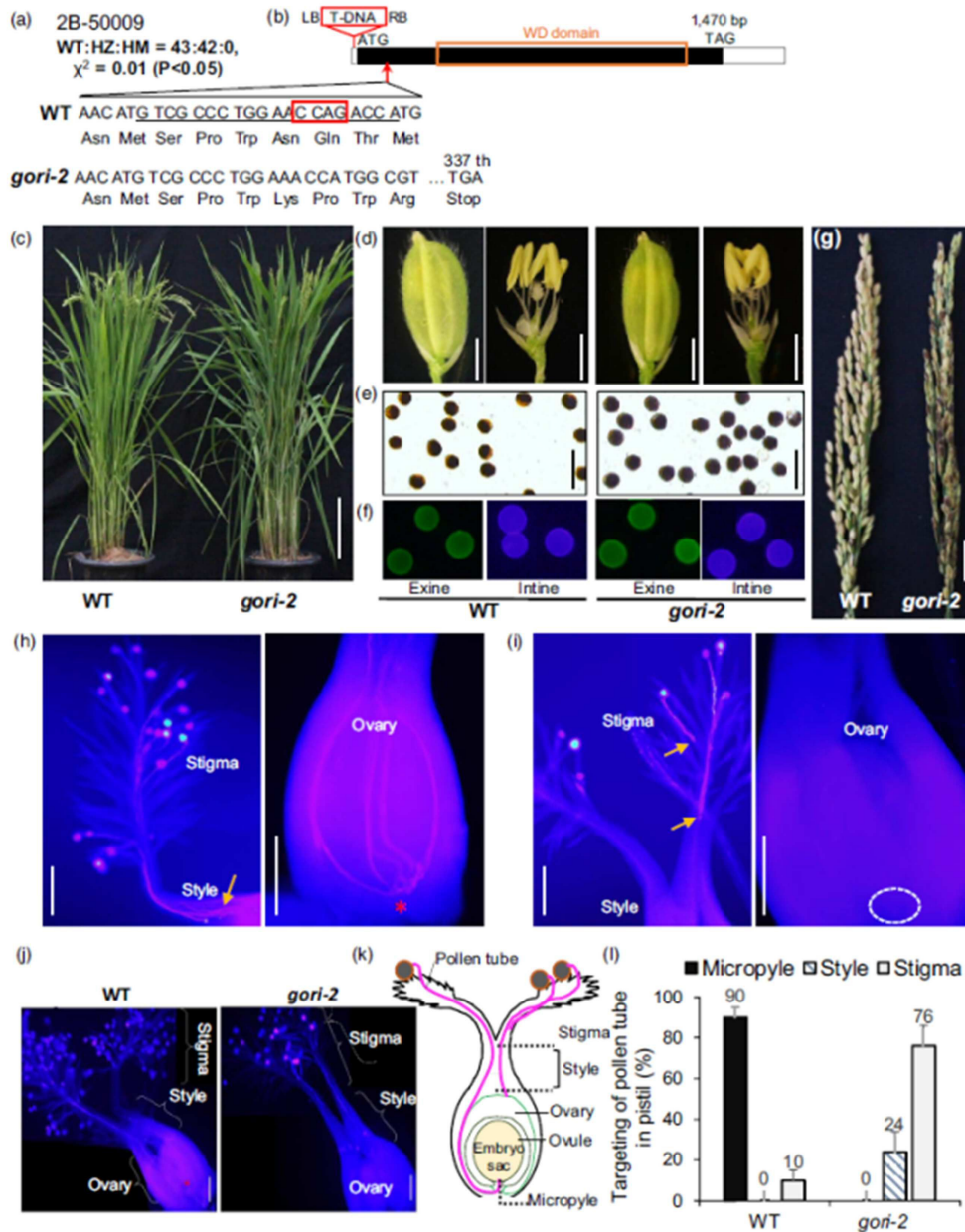
[0125] 더불어 GORI의 결함에 의해 직접적으로 영향을 받는 분자 메커니즘을 확인하기 위해 효모 2-하이브리드 스크리닝(yeast two-hybrid (Y2H) screening)을 수행한 결과, GORI의 6 개의 상호 작용 파트너를 확인했다. 확인된 상기 단백질은 GORI의 C-말단 WD 도메인과 상호작용하지만, N-말단 도메인과는 상호작용하지 않는 것으로 확인되어(도 6(a) 및 도 6(b)), WD 모티프의 스캐폴드(scaffold) 기능을 지원하였다. 흥미롭게도, 상기 6개의 상호 작용하는 GORI 파트너는 꽃밥의 성숙한 화분에서 높거나 특이적으로 발현되었으며, *gori-2* 돌연변이에 의하여 하향 조절되었다(도 6(c)). 벼 꽃밥에서의 이들의 발현 패턴을 확인하기 위하여 RT-qPCR을 수행한 결과에서도 마찬가지로 *gori-2* 돌연변이체에서 상기 유전자들의 하향 조절이 확인되었다(도 6(d)).

[0127] 종합적으로 본 발명은 T-DNA 삽입 및 CRISPR-Cas9을 이용하여 벼의 웅성불임 동형접합 돌연변이인 *gori-2*를 제조하고, 이들이 화분관 발아 및 신장이 저해됨을 확인하였다. 또한 상기 *gori-2*의 발아된 화분관에서는 액틴 필

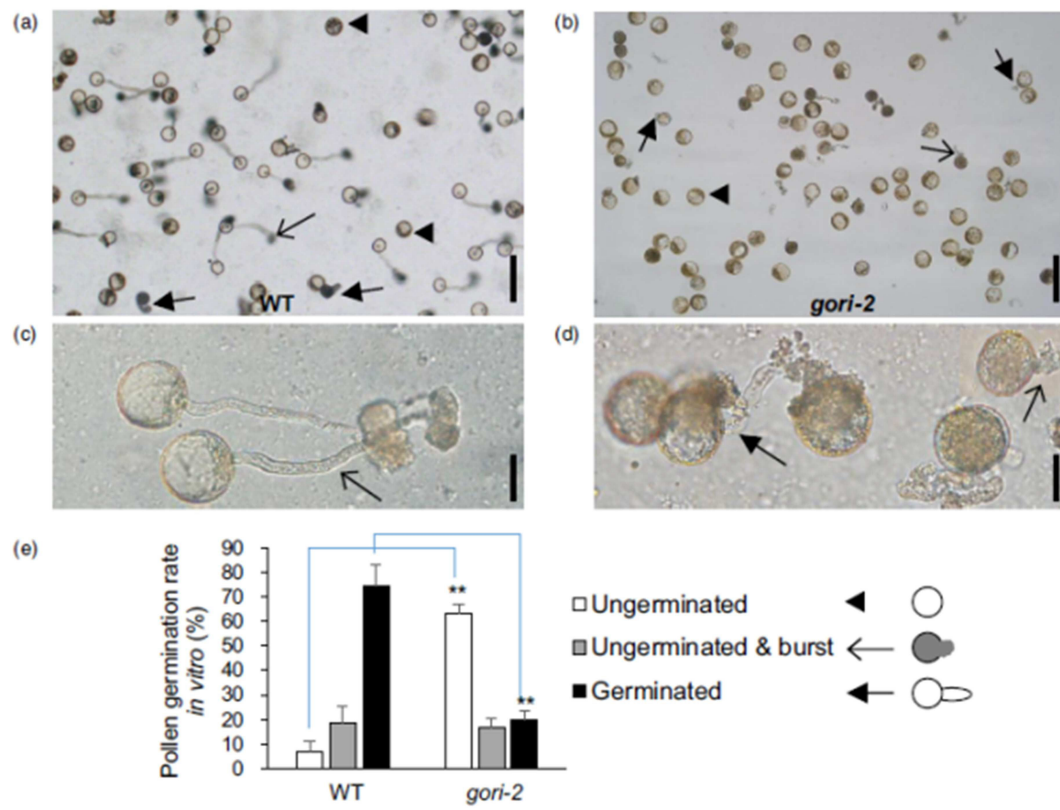
라멘트가 감소하고 펙틴 분포가 변화됨을 확인하였으며, WT와 비교하여 *gori-2*에서는 852개의 화분 관련 유전자가 하향 조절되어 있음을 확인하였다. 이러한 결과를 통해, 본 발명은 벼의 GORI 유전자가 돌연변이되어 발현 억제 및 기능이 억제되는 경우, 야생형(WT) 대비 펙틴의 비정상적인 분포를 확인할 수 있고, 화분 특이적인 유전자에 있어서 상이한 발현을 보이며, 화분 발아 및 화분관 신장이 감소되어 융성불임이 야기되는 것을 확인하였다.

도면

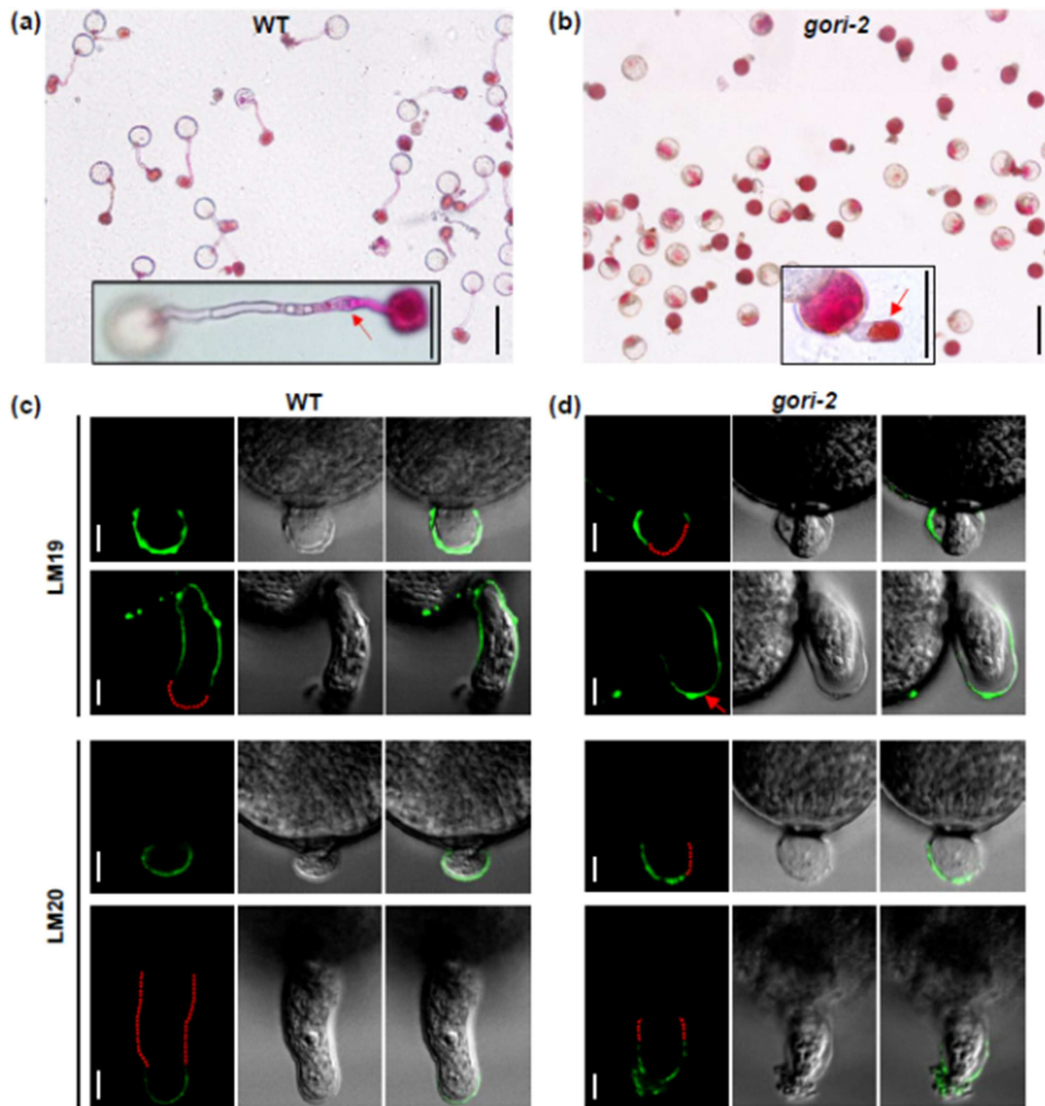
도면1



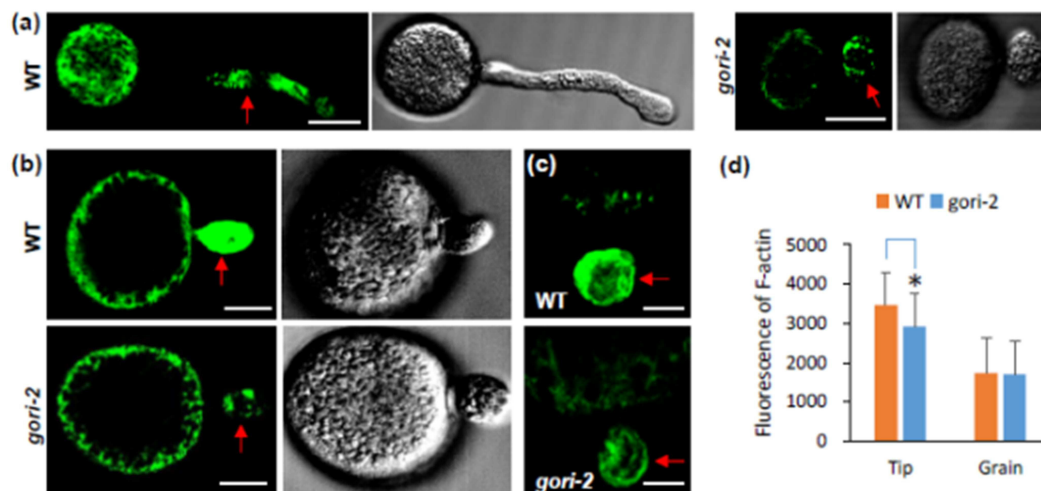
도면2



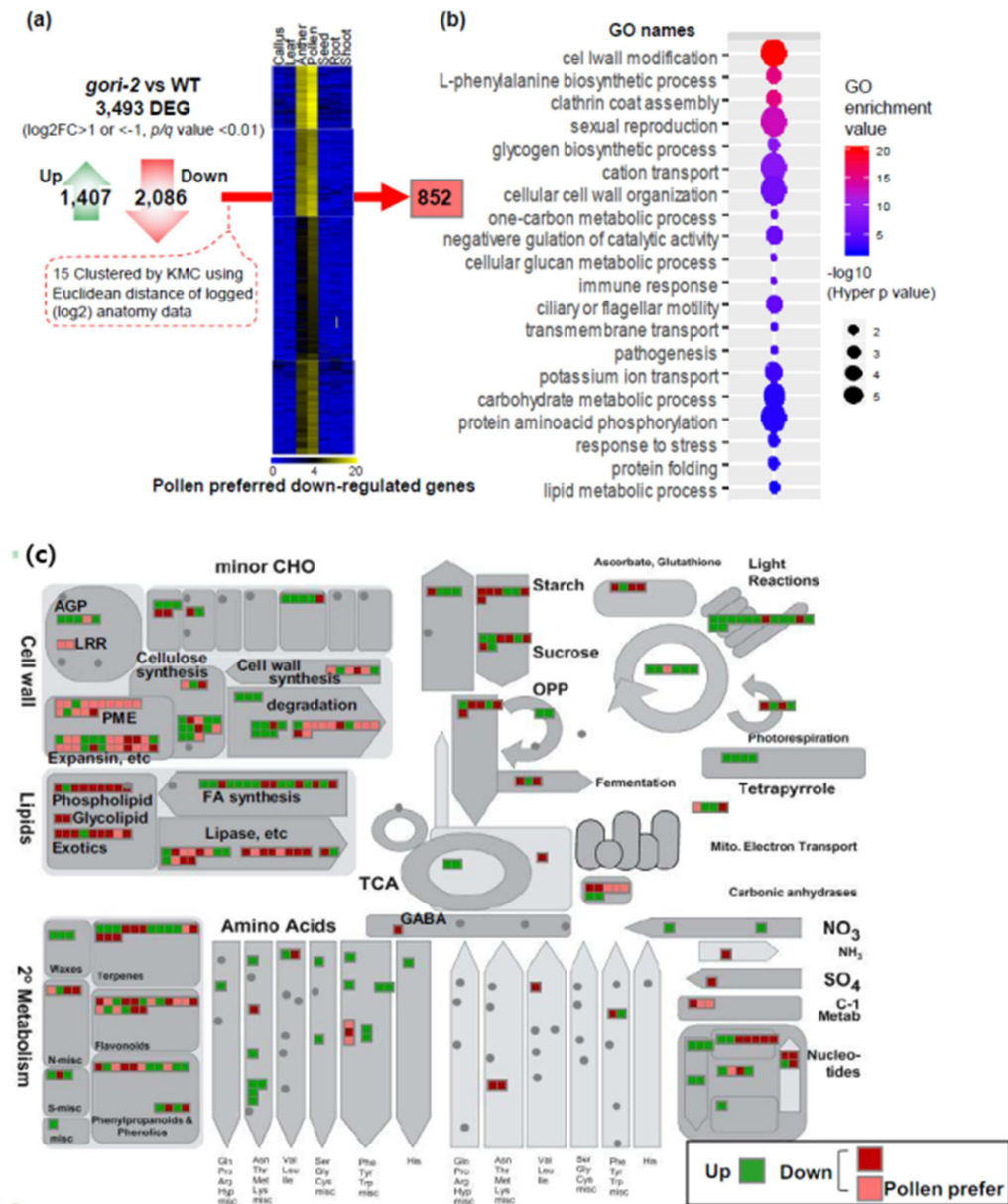
도면3



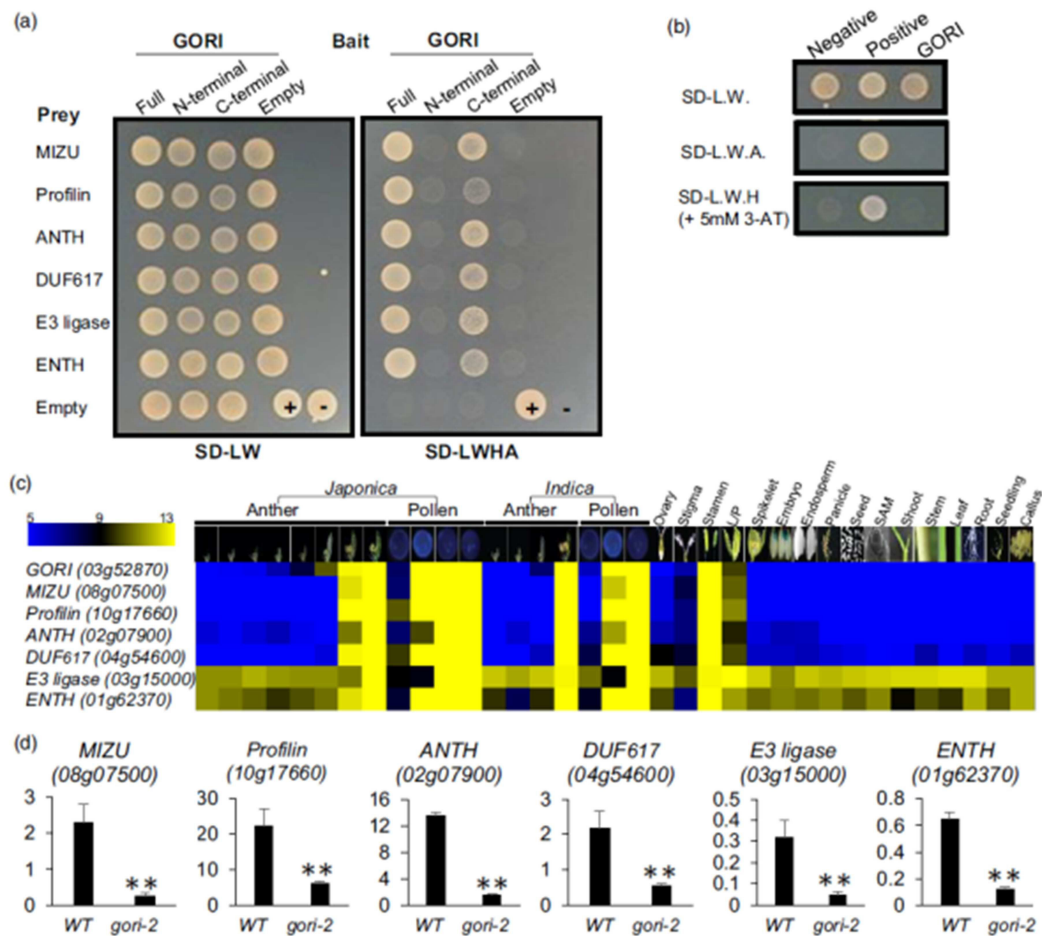
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- Pusan National University Industry-University Cooperation Foundation
- Kyungpook National University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Preparation method of male sterility rice using Os03g52870 gene,
- composition for inducing male sterility of rice and male
- sterility rice
- <130> 1-54P
- <160> 20
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 3879
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Os03g52870(GORI) gene

<400> 1

aatagcctcg acgacaactt catctacgcc acgcggacgc tgctgttcct gcgcggcgac	60
ggcacgctgg cggcgctcgc catcgagctg agcttgccgc acctgcagga cgacgggctg	120
atcacgcgca ggagcacctg gtacacgccg gcggcgcgcg gcggcaccgg cgccggcgcc	180
gtggagtggg ggggtgtggca gctcgccaag gcgtacgtca acgtgaacga ctactgctgg	240
caccagctga tcagccactg gctcaacacg cagccgtga tggagccctt cgtcatcgcc	300
accaaccggc agctcagcgt ggcgcacccg gtgcacaagc tgctgctgcc gcactaccgc	360
gacaccatga ccatcaacgc gctggcgcgg cagacgtca tcaacggcgg cggcatttc	420
gagatgaccg tgttcccgcg gaagcacgcg ctcccatgt cgtcggcggt ctacaaggac	480
tggagcttcg ccgaccaggc gctccccgac gaccttgtca agcgcggcgt cgcggtgccg	540
gaccggcgga gcccgtacaa ggtgcggtg ctcatcgagg actaccgta cgccaacgac	600
gggtggcgcc tctggcacgc catcgagcag tgggccaccg agtacctcg catctactac	660
cccaacgacg gcgtgtcca gggcgacgcc gagctgcagg cgtggtggaa ggaggtccgc	720
gaggtcgggc atggcgacat caaggacgcg acgtggtggc cggagatgaa gacggtggcg	780
gagctggtca aggcgtgcgc caccatcatc tggatcgggt ccgcgctgca cgccgccgtc	840
aatttcgggc agtaccgta cgccgggtac ctcccgaacc gtccgtcggg gagccggcgg	900
ccgatgccgg agccgggaac gaaggagtac gacgagctgg cgcgcgatcc ggagaagggtg	960
ttcgtccgga caatcaccaa gcagatgcag gccatcgtgg ggatctcgct gctggagatc	1020
ctgtccaagc actcctccga cgaggtgtac ctcgacagc gcgacacgcc ggagtggacg	1080
tcggacgcca aggcgttga ggcgttcaag cggttcggcg cgcggtgac ggagatcgag	1140
agccgcgtcg tcgcatgaa caaggacccc caccgcaaga accgtgtcgg gccgaccaat	1200
ttccctaca cgtgctcta cccaaacacc tccgacctca agggcgacgc tgccggcctc	1260
tccgccaggg gcatcccaa cagcatctcc atctgatctc catctcatca gatgaggctg	1320
ctccacggag gcgccagcgt ggacaagagt agttttacgg tggcttttac cggtagtatt	1380
ttactttcaa taattgcat gacacctaca cccggagggtg tcatggagga tgaattcgtt	1440
gtgtaatttc ctttcagtt cctaataaag aataaggaag catatggttg ttagcattt	1500
tcaagcaat cctccatata tctaccatgt ttgaattga aaggactgaa ttaccgaaaa	1560
tcctttgatg aacattatct gaagacttaa taagttggat taatgtctaa caaaccatta	1620
agtgatttaa attgtctgta aactgatggc aacaatatga acaaagagca aaccactagt	1680
gaatgtgaat caagccaata gaactcatct caggtcataa ctgaatgatg tgaactgtca	1740
glaaactgag gctattcttg atgcctttct cctattttct tataactaac attttaatca	1800

ggcaaaatag catitttctaa gtttggtttag cctcctaaac cgacgaaagg gagcaatccg	1860
agggaagtgg ggcccaccgt ttcttccccg cccaacctc gcaacggtct caacactttt	1920
ctcgttccc gccattttct cgtcgctca cactccccct cctccacac atacacacc	1980
aacgctctcc cacacctctc gcagttctct ttcttcccc cctcatctc cgccgctcg	2040
ccgcgaacgg gacgccggcc aagagctcga agctgatgag agatagcgac ggcgaagggg	2100
ccggcggcgg cctccccgcg tcgcaccgt cgaacctgcc gctgccggcg ccgcactccg	2160
acccaaacct ccagttctcc gggacggacg atgacttctc caaccgtcac agcagctcgt	2220
cggcgacggg cggcgcgagc cccgggtact actccgacta cccgtccagc ttcagcggcg	2280
agtgtctgcc gtacaacatg tcgccctgga accagaccat ggctgtcccg tggctgcacc	2340
acagcgacgc gtccatggcc gggctcggcg gcgcgccgc catggcgccc gggaccagcc	2400
tcacggtctc gctggtgagg gaggaagggc acatctactc gctcgccgcc aagaccgaca	2460
ccctgtacac cggctccgac agcaagaaca tccgctgtg gcgcaagcag aaggattccg	2520
gcgggttcaa gtcgtcgagc ggctcgtca agccatcgt catctccgc gagcgcatct	2580
tcacgggca ccaggacggc aagatcaggg tgtggaaggt gtcgccaag aacggcctgc	2640
acaagcgct cggcagcctg ccccggtgc gcacttct cccggctcg ctcaaccgt	2700
ccaactacgt cgaggtccgc aagaaccgga cggcgctctg gatccgccac agcgacgccg	2760
tgtgtgctt gagcccgacg gactcggcg agggcctgct ctactcggc tcgtgggacc	2820
ggaccttcaa ggtgtggcgg atcaacgact ccaagtgcct cgagtcctg gtggcgcacg	2880
acgacaacgt gaacgccatc gtggcagcgt tcgacgggt ggtgttcacc gggtcggcgg	2940
acgggacggt gaaggtgtgg aagagggagc tgcaggggaa agggaccaag cacgtcgcgg	3000
tgcagacgct gctgaagcag gagcacgcgg tgaacgcgt cgccgtgagc gccgtcgcgc	3060
cgggtgctta ctgcggtcc tccgacgggc tcgtcaactt ctgggaagg gagcgccacc	3120
tggtcacgg cggcgtgctg cgcgggcaca agaaggcgt gttctgcctc gccgccggcg	3180
gtcctctct ctcagcggc tccgccgaca acaccatcta cgtgtggcgg cgcgacggcg	3240
gcgtccactc ctgcctctcc gtgtcaccg gccacaccga gccgatcagg tgcctcgcca	3300
tcgtcgagga caacaaggac aacgccgccg tgcccgtcga cgccgtggac agcagcttcg	3360
cgtcgggtc gtccacggcg tggatttgt acagcggcag cctcgacaag tcgatcaagg	3420
tgtggcgct cgccgaggac gcgcctgacg cgtgtctccg tggccccgt ggccggcgacg	3480
cgccgcagat gttcgaccgg taccgccggc acccatcgg cgccagcagc tcgtcgttcc	3540
gctagaacac gcgcccgatc aaccaatgca ccattttgat cagttccaag aagaaatit	3600
caccttaca ttgggcagat caacgtcatg aacctctctg atggctaacg gtttgagcga	3660

attgaaggaa attgctgggt tttgtttgtt acacgtccta tatatactgt gatgaagaca 3720

agtatgaaat gaatagcatc aacatcattt ctggccatga acatctgaag ctgcaacggc 3780

aagtggtaga aatgaagagc gtatataggt aagtttgctt tcagaaagtg gccgggggga 3840

atTTTTgata catgctcata tatctgatgt gtactagt 3879

<210> 2

<211> 1466

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GORI mutant(gori-2)

<400> 2

atgagagata gcgacggcga aggggccggc ggccggcctcc cgcgctcgca cccgtcgaac 60

ctgccgctgc cggcgccgca ctccgaccca aacctccagt tctccgggac ggacgatgac 120

ttctccaacc gtcacagcag ctctctggcg acggcgccgg cgagccccgg gtactactcc 180

gactaccggt ccagcttcag cggcgagtgct tcgccgtaca acatgtcgcc ctggaaacca 240

tggcgtcgcc gtggtcgcac cacagcgacg cgtccatggc cgggctcgcc ggccgccccg 300

ccatggcgcc cgggaccagc ctcatcggtc cgttggtgag ggaggaaggg cacatctact 360

cgtcgccgc caagaccgac acctgtaca ccggctccga cagcaagaac atccgctgtt 420

ggcgcaagca gaaggattcc ggccgggttca agtcgtcgag cggcctcgtc aaggccatcg 480

tcatctccgg cgagcgcatc ttaccgggc accaggacgg caagatcagg gtgtggaagg 540

tgctgcccaa gaacggcctg cacaagcgcg tcggcagcct gcccggctg cgcgacttcc 600

tcccggtctc gctcaaccgc tccaactacg tcgaggtccg caagaaccgg acggcgtctt 660

ggatccgcca cagcgacgcc gtgtcgtgcc tgagcccgac ggactcggcg cagggcctgc 720

tctactccgg ctctgtggac cggaccttca aggtgtggcg gatcaacgac tccaagtgcc 780

tcgagtcctg ggtggcgcac gacgacaacg tgaacgccat cgtggcagcg ttcgacgggc 840

tggtgttcac cgggtcggcg gacgggacgg tgaaggtgtg gaagaggag ctgcagggga 900

aagggaacaa gcacgtcgcg gtgcagacgc tgctgaagca ggagcacgcg gtgaacgcgc 960

tcgccgtgag cgcgctcgcg ccgggtgctct actcggtctc ctccgacggg ctctcaact 1020

tctgggaagg ggagcgccac ctggtccacg gcggcgtgct gcgcgggcac aagaaggccg 1080

tgttctgcct cgcgcccgcg ggctccctcc tctcagcgg ctccgcccac aacaccatct 1140

acgtgtggcg gcgacggc ggctccact cctgcctctc cgtgtctacc ggccacacgg 1200

agccgatcag gtgcctcgcc atcgtcgagg acaacaagga caacgccgc gtgcccgctc 1260

acgccgtgga cagcagcttc gcgtcgggct cgtccacgcg gtggattgtg tacagcggca 1320

gcctcgacaa gtgatcaag gtgtggcgcg tcgccgagga cgcgcctgac gcgctgctcc 1380

gtggccccgg tggcggcgac gcgccgcaga tgttcgaccg gtaccccggc gacccattcg 1440

gcgccagcag ctctcgttc cgctag 1466

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B-50009-F

<400> 3

gtgtcatgga ggatgaattc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B-50009-R

<400> 4

ccttcacac cctgatcttg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2707 Tubr

<400> 5

ggtgaatggc atcgtttgaa 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NGUS

<400> 6

aacgctgac aattccacag 20

<210> 7

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HPH-F
 <400> 7
 gatcgttatg tttatcgga ctt 23

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HPH-R
 <400> 8
 ttccactatc ggcgagtact tct 23

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GORI_qrt_f
 <400> 9
 tacgtcgagg tccgaagaa 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GORI_qrt_r
 <400> 10
 gcacttgag tcgttgatcc 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OsUbi5_F
 <400> 11

gcacaagcac aagaaggtga	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> OsUbi5_R	
<400> 12	
gcctgctggt ttagacgta	20
<210> 13	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 242R	
<400> 13	
ttggggtttc tacaggacgt aac	23
<210> 14	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hph4R	
<400> 14	
ccatgtagtg tattgaccga ttc	23
<210> 15	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DA2R	
<400> 15	
caagttagtc atgtaattag ccac	24
<210> 16	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hph1R	

<400>	16	
tcgtctggct aagatcggcc gca		23
<210>	17	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GORI-2 F	
<400>	17	
ggcagtcgcc ctggaaccag acca		24
<210>	18	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GORI-2 R	
<400>	18	
aaactggtct ggttcaggc cgac		24
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GORI cas F	
<400>	19	
cactccgacc caaacctcca		20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GORI cas R	
<400>	20	
gaatccttct gcttgcgcca		20