



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0001712
(43) 공개일자 2023년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 1/06 (2006.01) A01H 1/02 (2006.01)
A01H 5/10 (2018.01) A01H 6/46 (2018.01)
C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01H 1/06 (2021.01)
A01H 1/021 (2021.01)

(21) 출원번호 10-2021-0084572

(22) 출원일자 2021년06월29일

심사청구일자 2021년06월29일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

전종성

경기도 안양시 동안구 동안로 101, 103동 1302호
(호계동, 목련전경아파트)

이상규

경기도 용인시 기흥구 보정로 30, 112동 2003호
(보정동, 행원마을동아슬레시티아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

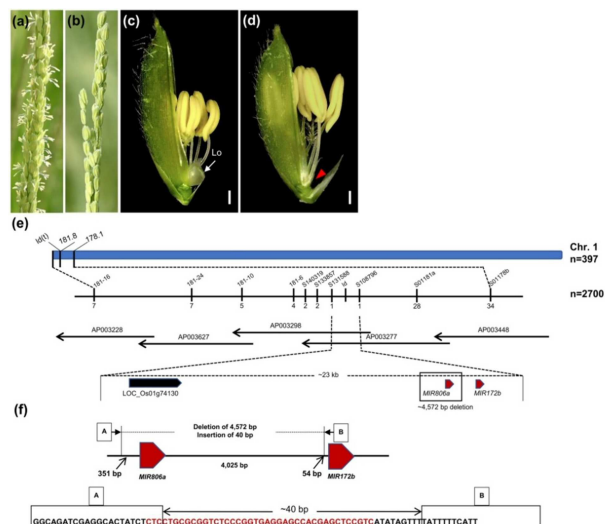
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 벼의 폐화수정 유도를 위한 MicroRNA172b 유전자 및 이의 돌연변이에 의한 폐화수정 벼의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제하여 폐화수정 벼를 제조하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 폐화수정 벼의 제조방법은 농경학적 특성에 해로운 영향을 미치지 않으면서도 도입된 외래 유전자의 환경 방출을 방지하여 유전적 순도와 안정성을 유지하는데 유용하게 사용할 수 있고, 상기 방법으로 제조된 본 발명의 miR172 결실된 1d 돌연변이 벼는 인피가 완전히 결핍됨으로 인해 우수한 폐화수정 형질을 발휘할 수 있는 상업적으로 유용한 벼 품종을 제공할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01H 5/10 (2022.05)
A01H 6/46 (2022.05)
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/8261 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자

심수현

경기도 용인시 기흥구 서천서로20번길 8-4, 201호
(서천동)

고희중

서울특별시 관악구 남부순환로260길 50, 301호(남
현동, 삼목빌라)

김백기

경기도 수원시 권선구 금곡로 45, 203동 1501호(금
곡동, 금곡엘지아파트)

정동훈

강원도 춘천시 승지골길16번길 47, 1010동 1304호
(퇴계동, 뜨란채아파트)

박소영

강원도 춘천시 삭주로 89-6, 101동 303호(후평동,
현대맨션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711106710
 과제번호 2020R1A2C2012976
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
 연구과제명 잎 전분 합성 극대화를 통한 벼 생산성 향상 탄소대사 조절
 기여율 1/4
 과제수행기관명 경희대학교(국제캠퍼스)
 연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711137181
 과제번호 2021M3E5E6025387
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 바이오위해평가원팀리노베이션
 연구과제명 CRISPR/Cas9 매개 벼 및 배추 F1 Non-GM 교잡종 개발
 기여율 1/4
 과제수행기관명 경희대학교(국제캠퍼스)
 연구기간 2021.04.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395063077
 과제번호 PJ013165012020
 부처명 농촌진흥청
 과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
 연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)
 연구과제명 아종계놈과 분자유종을 통한 벼 육종 신소재 개발
 기여율 1/4
 과제수행기관명 서울대학교
 연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345283352
 과제번호 2018R1D1A1B0704975114
 부처명 교육부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
 연구과제명 벼의 가뭄 스트레스 조건에서 decapping에 의한 mRNA 분해 기작 연구
 기여율 1/4
 과제수행기관명 한림대학교
 연구기간 2018.06.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 폐화수정(cleistogamy) 벼의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 miR172b 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것인, 폐화수정 벼의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단계는 miR172b 유전자의 일부 염기의 결실 또는 삽입에 의하여 이루어지는 것인, 폐화수정 벼의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계는 miR172b 유전자에 대한 표적 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(single guide RNA; sgRNA)를 클로닝한 벡터로 벼를 형질전환하여 miR172b 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 폐화수정 벼의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 miR172b 유전자에 대한 표적 서열은 서열번호 5 및 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 염기서열을 포함하는 것인, 폐화수정 벼의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 단일 가이드 RNA는 서열번호 9 및 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 염기서열을 포함하는 것인, 폐화수정 벼의 제조방법.

청구항 7

벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 벼의 폐화수정(cleistogamy)을 유도하는 방법.

청구항 8

벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 폐화수정 유도용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 제제는 miR172b 유전자에 대한 표적 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(single guide RNA; sgRNA)를 클로닝한 벡터인 것인, 벼의 폐화수정 유도용 조성물.

청구항 10

miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현이 억제된, 폐화수정 벼.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 폐화수정 벼는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 것인, 폐화수정 벼.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 폐화수정 벼는 서열번호 2 내지 4의 염기서열로 표시되는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자를 포함하는 것인, 폐화수정 벼.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 벼는 형질전환된 폐화수정 벼와 타 벼의 교배를 통하여 생산되는 자손 세대를 포함하는 것인, 폐화수정 벼.

청구항 14

miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현이 억제된, 폐화수정 벼의 종자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벼의 폐화수정 유도를 위한 miR172b(microRNA172b) 유전자, 이의 발현을 억제시킨 폐화수정 벼 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폐화수정(cleistogamy)은 꽃이 피지 않은 꽃봉오리 상태에서 자가 수분(self-pollination)하여 자가 수정(self-fertilization)으로 이어지는 형질을 의미한다. 폐화수정하는 꽃의 한 가지 장점은 폐화수정이 재배종과 상대적 야생종 간의 교배를 방지하여 꽃내 자가 수분 작물의 유전적 순도 유지를 보장한다는 것이다. 또한, 유전자 변형(genetically modified; GM) 작물(식물)의 경우, 도입 유전자를 갖는 꽃가루가 주변에 잠재적인 생식 가능한 야생 개체에게 수정을 통하여 전이할 가능성이 있으나, 폐화수정은 이러한 유전자 흐름을 방지할 수 있다. 또한, 폐화수정은 개화 중에 병원체 감염이 방지되는 효과를 제공한다.

[0003] 이러한 폐화수정은 60과(families)의 약 300개의 식물종(species)에서 발견되는 형질로서, 보리, 밀, 쌀과 같은 풀 종류의 작물에서 많이 발견되어, 폐화수정의 유전적 조절을 밝히기 위해 여러 작물이 연구되고 있다. 예를 들어, 보리에서 영(hulls), 내영(palea) 및 외영(lemma)으로 구성된 작은 이삭(소수, Spikelet)에 클레이스토가미 1(cleistogamy1, cl1) 유전자를 갖는 경우, 개화 과정에서 인피(lodicules)의 오작동으로 인해 작은 이삭이 단단하게 닫혀있는 상태로 유지되며, 비-폐화수정 야생형 보리에 비해 인피의 크기가 작게 발달된다. 이러한 발달의 결함으로 인해, 개화기에서 인피가 부풀어오르는 것에 영향을 미치며, 작은 이삭을 열기 위해 영, 내영 및 외영을 밀어내어 작은 이삭으로부터 분리하는 것이 불가능하게 된다. 이러한 형질은 꽃받침(풀(grasses)의 내영 및 외영과 동일) 및 꽃잎(풀의 인피와 동일)의 꽃 기관 정체성을 조절하는 Arabidopsis APETALA2 (AP2)의 상동체인 cly1 유전자의 돌연변이에 의해 조절되는 것으로 보고되었다 (Nair et al., 2010).

[0004] 에틸메탄설포네이트(ethyl methanesulfonate)로 돌연변이가 유발된 풀(pool)의 폐화수정 돌연변이 벼 cl7의 경우, 꽃 기관 발달에는 특별한 결함은 없으나 인피(lodicules)의 능력이 약하기 때문에 내영과 외영을 여는데 강한 힘이 필요하다. 돌연변이 벼 cl7은 DEPE2 유전자에 돌연변이가 있는 것으로 밝혀졌으며, 이는 기능이 알려진 도메인이 없는 식물 특이적 단백질을 암호화한다. N-메틸-N-니트로소요소(N-methyl-N-nitrosourea) 돌연변이가 유발된 풀의 폐화수정 돌연변이 벼인 Rice superwoman1-cleistogamy1 (spw1-clsl)의 경우, 인피 및 수술(stamen)에 작용하는 유전자인 class-B MADS-box gene SPW1 (OsMADS16)에서 미스센스 돌연변이(missense mutation)를 전달한다. spw1-clsl 돌연변이에서 SPW1은 대응하는 클래스-B 단백질인 OsMADS2 및 OsMADS4와의 이종이량화(heterodimerization)를 손상시켜 인피가 인피-겨 모자이크 기관으로 변형된다. 그러나 돌연변이된

SPW1/OsMADS2 heterodimer가 저온 조건에서 안정화되기 때문에 추운 환경에서 성장하면 spw1-cls1의 폐화수정 형질이 손실되는 문제가 있다. 온도-안정성을 갖는 SPW1의 새로운 폐화수정 돌연변이 대립 유전자인 spw1-cls2의 경우, DNA 결합을 포함하는 아미노산에 돌연변이를 가지고 있으며, spw1-cls1과 달리 spw1-cls2의 폐화수정 형질은 추운 상태에서도 유지되지만, spw1-cls2 식물의 번식력은 저온 조건에서 감소되는 문제가 있다.

[0005] 마이크로RNA(MicroRNA; miRNA)는 전사 후 수준에서 표적 유전자 발현을 부정적으로 조절하는 작은 비번역 RNA(small non-coding RNA)의 한 종이다. 20 내지 24 nt 길이의 단일 가닥 RNA의 기능적인 성숙한 miRNA는 전사체를 표적화하고 이들을 핵산 내부 분해 방식(endonucleolytically)으로 절단 또는 번역 억제한다. 식물 miRNA는 식물의 성장과 발달뿐만 아니라 표적 유전자 발현을 조절하여 다양한 식물의 환경 스트레스에 대한 반응에 중요한 역할을 한다. 쌀에서는 738 개의 성숙한 miRNA를 생성하는 604 개의 miRNA 전구체가 보고된 바 있다.

[0006] 본 발명자들은 식물의 수정시에 꽃이 열리지 않아서 꽃가루가 외부로 방출이 안되게 하는 기술을 개발하고자 벼에서 폐화수정을 유발할 수 있는 방법을 연구한 결과, 맵-기반 클로닝, sam11-RNAs 시퀀싱 및 CRISPR/Cas9 접근법을 통해 MIR172b 유전자의 돌연변이가 인피 결핍된 폐화수정(lodiculeless cleistogamous) 형질을 유발시킬 수 있음을 확인하고, 이를 이용하여 폐화수정이 유도된 벼를 제조하는 것이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2202118호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Maeng et al., Molecular mapping of a gene 'ld(t)' controlling cleistogamy in rice, Theor Appl Genet (2006) 112:1429-1433.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 폐화수정(cleistogamy) 벼의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 벼의 폐화수정(cleistogamy)을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

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

[0012] 본 발명의 다른 목적은 폐화수정 벼를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 폐화수정 벼의 종자를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 목적을 해결하기 위하여,

[0015] 본 발명은 벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 폐화수정(cleistogamy) 벼의 제조방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 벼의 폐화수정(cleistogamy)을 유도하는 방법을 제공한다.

[0017] 나아가, 본 발명은 벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 폐화수정 유도용 조성물을 제공한다.

[0018] 더 나아가, 본 발명은 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현이 억제된, 폐화수정 벼 및 이의 종자를 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 폐화수정 벼의 제조방법은 CRISPR/CAS9 유전자 편집 기술을 적용하여 벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제함으로써 폐화수정 벼를 제조하는 것이 가능하며, 개발된 돌연변이 벼는 폐화수정 특성을 가짐으로 인해 도입된 외래 유전자의 환경 방출을 방지하여 유전적 순도와 안정성을 유지하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명의 miR172 결실된 1d 돌연변이 벼는 인피가 완전히 결핍됨으로 인해 농경학적 특성에 해로운 영향을 미치지 않으면서도 기존 연구들에서 보고된 돌연변이 벼 대비 우수한 폐화수정 특성을 발휘할 수 있는 효과가 있으며, 이러한 1d 대립 유전자를 사용한 폐화수정 벼 생산을 위하여 도입된 CRISPR/Cas9 운반체가 분리된 자손을 활용하여 역교배 육종을 적용함으로써, 환경 위해성이 감소된 non-GM 작물로서, 상업적으로 유용한 폐화수정 품종을 제공할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 1d 돌연변이(1d-1) 벼의 표현형 특성 및 1d 유전자좌(locus)의 맵 기반 복제를 나타낸 것이다:
- (a-b) 개화 단계에서 야생형(WT) 및 1d-1 돌연변이 식물의 유수(panicles)의 표현형,
- (c-d) WT 및 1d-1 돌연변이의 작은 이삭(Spikelet)의 표현형(스케일 바 = 1cm). 흰색 화살표는 WT의 인피(lodicules, Lo)를 나타내고, 붉은색 화살표는 1d 돌연변이에서 인피의 결핍을 나타냄,
- (e) 1d 유전자좌(locus)의 미세 매핑 및 이의 도식화. 1d-1의 1번 염색체에서 181.8 및 178.1 마커 사이의 간격에 대한 1차 매핑을 상단에 표시함. S131588과 S108796 마커 사이의 간격에 대한 미세 매핑을 중간 영역에 표시함. 간격내에서 예측되는 하나의 대조군 유전자(검은색 화살표 상자)와 두 개의 miRNA 전구체(붉은색 화살표 상자)를 하단에 표시함. 직사각형 상자 표시는 게놈 시퀀싱에 의해 1d-1에서 삭제된 영역을 나타냄,
- (f) 1d-1에서 결실된 영역의 개략도. A 및 B는 1d-1에서 삭제된 영역을 증폭하는 데 사용되는 프라이머를 나타내며, 빨간색 문자는 1d-1에서 삽입된 시퀀스를 나타냄.
- 도 2는 CRISPR/Cas9 방법에 의하여 MIR806a 및 MIR172b에 대한 돌연변이 벼의 생성을 나타낸 것이다:
- (a) MIR806a 및 MIR172b에 대한 CRISPR/Cas9 표적의 모식도. 각 MIRNA의 표적 부위는 푸른색 및 붉은색 화살표로 표시되고 파란색 서열은 PAM 부위를 나타냄. 게놈 편집을 검증하는데 사용되는 프라이머는 검은색 화살표로 표시함,
- (b) MIR806a 및 MIR172b의 염기서열 돌연변이 유도를 위한 CRISPR/Cas9 구조물: 검은색 막대, 왼쪽/오른쪽 경계; T35S, CaMV35S 터미네이터; Hyg R, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(Hygromycin phosphotransferase); p35S, CaMV35S 프로모터; pOsU3, 벼 U3 프로모터; pOsUbi, 벼 유비퀴틴 촉진제; NosT, 노팔린 합성효소 유전자 종결인자(Nopaline synthase terminator),
- (c) 생성된 MIR172b 돌연변이체의 게놈 서열. mir172b-4 (1d-2) 및 mir172b-5 (1d-3)에서 MIR172b의 일부가 결실되고, mir172b-6 (1d-4)의 성숙한 miR172b 영역에 하나의 뉴클레오티드가 삽입됨. miR172b의 시퀀스는 밑줄로 표시됨,
- (d) 생성된 MIR806a 돌연변이체의 게놈 서열. mir806a-4에서 MIR806a 전구체 영역이 완전히 결실됨.
- 도 3은 CRISPR/Cas9 방법을 통해 mir806a 및 mir172b 염기서열 돌연변이에 의해 생성된 돌연변이 벼(1d-2, 1d-3, 1d-4 및 mir806a-4)와 야생형 벼(WT)의 표현형을 나타낸 것이다:
- (a-e) 개화 단계에서 야생형(WT), 1d-2(mir172b-4), 1d-3(mir172b-5), 1d-4(mir172b-6) 및 mir806a-4 돌연변이 벼 각각의 유수(panicle)의 표현형,
- (f-j) 개화 단계에서 야생형(WT), 1d-2, 1d-3, 1d-4 및 mir806a-4 돌연변이 벼 각각의 작은 이삭(spikelet)의 표현형,
- (k-o) 야생형(WT), 1d-2, 1d-3, 1d-4 및 mir806a-4 돌연변이 벼의 화기(floral organ)의 표현형. 흰색 화살표는 WT 벼(k) 및 mir806a-4 돌연변이 벼(o)의 인피(lodicules)를 나타내고, 붉은색 화살표는 1d 돌연변이 벼(1-

n)에서 인피의 결핍을 나타냄,

(p-t) 야생형(WT), ld-2, ld-3, ld-4 및 miR806a-4 돌연변이 벼의 종자 발달의 표현형.

도 4는 야생형 및 ld 돌연변이 벼의 small RNAs 시퀀싱을 나타낸 것이다:

(a) 정규화된 데이터를 통해 분석된 야생형과 ld 돌연변이 벼 식물체의 통계적 유의성(p-값) 대 발현변화(fold change)에 대한 화산플롯, 회색 점선은 2배의 발현량 차이의 임계값(thresholds)을 나타냄. 노란색 점선은 P -값 = 0.01을 나타냄. miR172b 및 miR172ad는 각각 붉은색 및 파란색 점으로 표시됨,

(b) 야생형과 ld-1 돌연변이 식물체 간의 miRNA 상대적 풍부도에 대한 산점도. miRNA 풍부도는 5백만 리드 (TP5M)당 전사체로 정규화됨,

(c) 야생형과 ld-2 돌연변이 사이의 miRNA 상대적 풍부도에 대한 산점도,

(d) 선택된 miRNA의 발현 수준. miR172ad, miR172b, miR172c는 벼 MIR172 계열의 성숙한 miRNA로 선택된 것이며, miR159ab 및 miR166a-dfj는 대조군으로 선택됨. 붉은색 문자는 miR172 멤버 간의 시퀀스 차이 부분을 나타냄.

도 5는 야생형 및 ld 돌연변이 벼의 어린 유수(young panicles)에서 잠재적 miR172 표적 유전자의 발현 수준을 나타낸 것이다:

(a) AP2 전사 인자를 인코딩하는 4개의 잠재적인 miR172 표적 유전자(SHAT1, SNB, TOE1 및 IDS1)와 3개의 miR172 구성원(miR172ad, miR172b 및 miR172c)의 miRNA 표적 부위에 대한 서열 정렬(sequence alignment). 시퀀스 차이가 있는 부분은 붉은색 문자로 표시함. 표적 유전자와 miRNA 간의 선은 완벽한 일치율을 나타내며, G:U 흔들림은 0로 표시함,

(b) 야생형과 ld 돌연변이 벼 식물체 간의 4개의 AP2 유전자의 발현 패턴.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.

[0024] 수정시에 꽃이 열리지 않는 폐화수정(cleistogamy)은 유전자변형(GM) 작물에서 꽃가루 방출을 통한 도입된 유전자의 환경 방출을 완전히 차단하는 유용한 형질이며, 자가수분 식물의 유전적 안정성을 유지하는 효과적인 방법이다.

[0025] 본 발명자들은 이전에 인피 결핍을 특징으로 하는 자연적인 폐화수정 돌연변이 벼로서, lodiculeless spikelet(ld)를 보고한 바 있다. 상기 ld 돌연변이체는 식물의 높이, 유수(panicle) 구조 및 수확량과 같은 농경학적 특성에 해로운 영향을 미치지 않는 장점이 있다.

[0026] 본 발명자들은 이러한 ld 돌연변이 벼를 이용하여, 맵-기반 클로닝 접근 방식을 통해 ld 유전자를 복제하고, ld 유전자좌에서 두개의 microRNA로서 전체 MIR806a 전구체 및 MIR172b 전구체의 업스트림에 걸친 약 4kb의 결실을 확인하였으며, CRISPR/Cas9 매개 형질전환을 통해 ld 돌연변이의 폐화수정 형질이 상기 두 가지 microRNA중 MIR172b 프로모터의 결실로 인한 것임을 입증하였으며, small-RNAs 시퀀싱을 통해 성숙한 miR172b가 ld 돌연변이에서 발현되지 않음을 확인하였고, 정량적 RT-PCR 분석을 통해 miR172b의 AP2 표적 유전자의 발현이 ld 돌연변이에서 변형되지 않음을 확인하였다(실시예 1 내지 5 참조). 특히, CRISPR/Cas9 접근법을 사용하여 생성된 MIR172b의 돌연변이가 ld 돌연변이와 동일한 인피 결핍된 폐화수정(lodiculeless cleistogamous) 형질을 유발됨을 확인함으로써, 벼에서 miRNA의 돌연변이를 통해 폐화수정을 유발할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0027] 이처럼 벼에서 miR172b 유전자의 발현을 억제하여 폐화수정 벼의 제조가 가능하다는 사실은 지금까지 전혀 알려지지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 규명되었다.

[0028] 본 발명에 따른 폐화수정 벼 및 이의 제조방법은 CRISPR/CAS9 유전자 편집 기술을 적용하여 벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제함으로써 폐화수정 벼를 제조하는 것이 가능하며, 농경학적 특성에 해로운 영향을 미치지 않으면서도 도입된 외래 유전자의 환경 방출을 방지하여 유전적 순도와 안정성을 유지하는데 유용하게 사용할 수 있고, 상기 방법으로 제조된 본 발명의 miR172 결실된 ld 돌연변이 벼는 인피가 완전

히 결핍됨으로 인해 기존 연구들에서 보고된 cl7, spw1-cls1 및 spw1-cls2와 같은 대립 유전자를 이용한 경우보다 더 나은 폐화수정 벼 품종을 개발하는데 적용할 수 있을 것이다.

- [0030] 따라서, 본 발명은 벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 폐화수정(cleistogamy) 벼의 제조방법을 제공한다.
- [0031] 상기 폐화수정 벼의 제조방법은 벼에서 miR172b 유전자의 발현을 억제시켜 인피를 결핍시킴으로써 벼의 폐화수정을 유도하는 것이다.
- [0032] 또한, 본 발명은 벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 벼의 폐화수정(cleistogamy)을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명에서 용어 “벼”는 학명이 *Oryza sativa* L.이며, 일년생 초본식물이고, 본 발명에서의 벼에는 자포니카(Japonica)형, 인디카(Indica)형 및 자바니카(Javanica)형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0035] 상기 miR172b 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 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 miR172b와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 의미할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 용어 "폐화수정"은 개화하지 않고 꽃봉오리상태에서 이루어지는 수정으로서, 타화수분을 방지하여 자가수분을 유도하는 형질을 의미하는 것으로서, 꽃이 봉오리인 채로 충분히 피지 않고 꽃 속에 있는 수술의 화분이 암술머리로 바로 옮겨져 자가수정을 하는 현상을 의미하며, 본 발명에서의 폐화수정은 miR172b 유전자의 발현을 억제하는 유전형질로서 유도되는 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 상기 miR172b 유전자의 발현을 억제하는 단계는 miR172b 유전자의 1 이상의 일부 염기의 결실 또는 삽입에 의하여 이루어지는 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 상기 miR172b 유전자의 발현의 억제는 바람직하게는 CRISPR/Cas9 통한 유전자 편집으로 제작할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. CRISPR/Cas9 시스템은 특정한 유전체의 좌위에서 돌연변이를 유도할 수 있는 간편하고 쉬운 방법으로, 특정 염기서열에 특이적으로 결합하는 RNA(sgRNA)와 특정한 염기서열을 자르거나 유용한 유전자를 삽입하는 역할을 하는 Cas9 nuclease로 구성되어 있으며, 이를 통해 특정 유전자의 기능을 억제하는 것이 가능하다.
- [0040] 구체적으로, 상기 miR172b 유전자의 발현을 억제하는 단계는 miR172b 유전자에 대한 표적 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(single guide RNA; sgRNA)를 클로닝한 벡터로 벼를 형질전환하여 miR172b 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 상기 miR172b 유전자의 1 이상의 일부 염기의 결실 또는 삽입이 이루어진 miR172b 돌연변이 유전자는 서열번호 2 내지 4의 염기서열로 표시되는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 sgRNA는 편집하려는 유전자의 위치를 찾아내는 역할을 수행하는 단일가닥 RNA를 의미하며, 상기 가이드 RNA는 PAM(protospacer adjacent motif) 자리와 인접하며, 편집하려는 유전자의 10 내지 30 bp의 염기서열과 상보적인 서열을 포함하는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 sgRNA는 miR172b 유전자에 대한 표적 서열을 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 상기 miR172b 유전자에 대한 표적 서열은 서열번호 5 또는 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0044] 본 발명에서 상기 sgRNA는 서열번호 9 또는 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 염기서열을 포함

하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0046] 상기 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체", "운반체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0047] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부를 식물 세포로 전이시킬 수 있는 벡터로서, 바람직한 형태는 바이너리(binary) 벡터(vector)이다.
- [0048] 상기 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 비아포스(bialophos), 글리포세이트(glyphosate), 포스포노트리신(phosphinothricin) 및 글루포시네이트(glufosinate)와 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(Hygromycin), 클로람페니콜(Chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 일실시예에서는 바이너리 벡터 pRGEB32를 사용하였다.
- [0050] 본 발명의 벡터에서 프로모터를 포함할 수 있고, CaMV35S 종결인자(CaMV35S terminator, T35S), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(Hygromycin phosphotransferase, Hyg R), CaMV35S 프로모터(CaMV35S promoter, p35S), 벼 U3 프로모터(rice U3 promoter, pOsU3), 벼 유비퀴틴 프로모터(rice Ubiquitin promoter, pOsUbi) 또는 노팔린 합성효소 유전자 종결인자(Nopaline synthase terminator, NosT)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 식물의 형질전환은 유전자를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및/또는 조직배양 기간을 가질 필요는 없다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 외래의 유전자를 적당한 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법, 원형질체의 전기천공법, 식물 요소로의 현미주사법, 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법, 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 유전자 전달을 포함한다.
- [0052] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 식물의 어떠한 세포도 모두 본 발명에 적용 가능하다. 식물 세포는 비성숙 배, 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물이다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(inplanta)이거나 기관 배양, 조직배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [0054] 나아가, 본 발명은 벼에서 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 폐화수정 유도용 조성물을 제공한다.
- [0055] 예를 들어 상기 제제는 miR172b 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 siRNA, shRNA, miRNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 miR172b 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하여, miR172b 유전자의 1 이상의 일부 염기를 결실시키거나, 1 이상의 일부 염기를 삽입시킴으로써 유전자의 발현 및 기능을 저해할 수 있다.
- [0056] 바람직하게는, 상기 제제는 miR172b 유전자에 대한 표적 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(single guide RNA; sgRNA)를 클로닝한 벡터인 것일 수 있다.
- [0057] 본 발명의 벼의 폐화수정 유도용 조성물에 있어서 기재의 중복을 피하기 위해, 상술한 기재를 준용할 수 있다.

- [0059] 더 나아가, 본 발명은 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현이 억제된, 폐화수정 벼를 제공한다.
- [0060] 본 발명에서 상기 벼는 자포니카(Japonica)형, 인디카(Indica)형 및 자바니카(Javanica)형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며 모든 벼 품종에 적용 가능하다.
- [0061] 상기 폐화수정 벼는 바람직하게는 앞서 기술된 폐화수정 벼의 제조방법 또는 벼의 폐화수정을 유도하는 방법에 따라 제조된 것일 수 있다.
- [0062] 본 발명의 일실시예에서는 폐화수정 벼에서 상기 miR172b 유전자의 염기서열 중 1 이상의 일부 서열이 결실 또는 삽입되어, 서열번호 2 내지 4의 염기서열로 표시되는 miR172b 돌연변이가 발생된 각각의 형질전환체를 제조하여, 인피가 결핍 및 폐화수정이 유발되었음을 확인하였다.
- [0063] 본 발명에서 상기 벼는 형질전환된 폐화수정 벼와 타 벼(형질전환 되지 않은 비폐화수정 벼)의 교배를 통하여 생산되는 자손 세대를 포함하는 것일 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명은 miR172b(microRNA172b) 유전자의 발현이 억제된, 폐화수정 벼의 종자를 제공한다.
- [0066] 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.
- [0068] **실시예 1. 재료 및 방법**
- [0069] **<1-1> 식물 재료 및 재배 조건**
- [0070] 자포니카(Japonica) 야생형 벼와 모든 돌연변이체 벼의 종자는 발아하여 1/2 무라시게&스쿠(Murashige and Skoog) 배지(1/2 MS media)에서 10 일 동안 재배 한 후 토양으로 옮겼다. 벼 식물체는 14시간/10시간 명암주기(30/20℃)의 온실에서 또는 여름에 자연 환경 조건의 현장 실험 플롯(experimental field plot)에서 재배되었다.
- [0072] **<1-2> 유전자 지도 작성 집단(mapping population)의 제조**
- [0073] 단일 열성 1d 돌연변이(CL-SNU)는 자포니카 벼의 생식질(germplasm)에서 자연 돌연변이로 확인되었다. 단일 열성 1d 유전자좌는 기존 연구에서 1번 염색체(chromosome 1)의 장완(long arm)의 끝 영역에 매핑(mapped) 되었으며, 이는 보리와 벼 염색체 간의 신테닉 관계(syntenic relationship)를 기반으로 인과 인자가 보리 cly1과 다르다는 것을 의미한다(Maeng et al. 2006). 1d 돌연변이체를 모본으로 인디카 품종 벼인 밀양23호를 부분으로 하여 교배하였고, 이로부터 수득된 1,027 개의 F2 식물이 미세 매핑(fine mapping)에 사용되었다. 1d 영역을 좁히기 위해 F2 계통에서 파생된 1,673 개의 F3 식물을 추가로 분석하여 간격 내에서 재조합을 수행하였다.
- [0075] **<1-3> 맵 기반 복제**
- [0076] 간단한 miniprep 방법을 사용하여 벼의 어린 잎에서 게놈 DNA를 분리하였다(Chen and Ronald, 1999). 1d 유전자좌의 미세 매핑을 위하여, 인디카와 자포니카 벼 아종(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> for indica and <http://www.rgp.dna.affrc.go.jp/> for japonica) 간의 DNA 서열 차이를 기반으로 10 개의 STS 마커를 개발하였다. 약 23kb 매핑 영역 서열의 전체 길이를 여러 세그먼트로 분할하여 1d 돌연변이체 및 야생형 품종 화청(Hwacheong) 벼에서 게놈 DNA를 증폭하는 데 사용하기 위한 특이적 PCR 프라이머를 설계하였다.
- [0077] 돌연변이 부위를 확인하기 위해 DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit (Seegene, Korea)를 사용한 DNA walking 전략을 사용했다. 2개의 특이적 프라이머 5'-GATGTAACCATCACCTTTACCG-3' 및 5'-CTATAAGTGCCACCTTGCTGCT-3'가 증폭 반응에 사용되었다. 수득된 앰플리콘(amplicon)을 클로닝하고 시퀀싱하였다. 삭제된 영역은 5'-AGAGGGAGGGAGGATCACTC-3' 및 5'-CTTCGCTTGAGCTCCTCTGTT-3' 프라이머를 사용하여 확인되었다.

표 1

프라이머 이름	서열	서열번호
ldF	5'-GATGTAACCATCACCTTTACCG-3'	서열번호 13
ldR	5'-CTATAAGTGCACCTTGCTGCT-3'	서열번호 14
Ld-delF	5'-AGAGGGAGGGAGGATCACTC-3'	서열번호 15
Ld-delR	5'-CTTCGCTTGAGCTCCTCTGTT-3'	서열번호 16

<1-4> CRISPR/CAS9 시스템을 이용한 ld 돌연변이 대립 유전자의 제조

효과적인 프로토스페이서 근접 모티프(protospacer adjacent motif; PAM)를 발견하고, 비-표적(off-target)을 방지하기 위해, 본 발명자들은 CRISPRdirect 프로그램(Naito et al., 2015; <http://crispr.dbcls.jp/>)을 사용하여 가능한 표적 서열을 스크리닝하였다.

디자인된 가이드 RNA로서, MIR806a (5' -CTAGTCGATCTCACTAGCT-3' 및 5' -AATTAAGTATACTAATTAC-3') 및 MIR172b (5' -GCAGTAGAGAGTGTGATGCC-3' 및 5' -GAATCTTGATGATGCTGCAT-3')의 2개의 가이드 RNA를 다중 게놈 편집(multiplex genome editing)을 위한 바이너리 벡터(binary vector)인 pRGE32에 클로닝하였다(Xie et al., 2015).

생성된 벡터는 아그로박테리움(Agrobacterium) 매개 형질전환(Jeon et al., 2000)을 통해 자포니카 벼(품종명: 동진벼)를 형질전환시켰다. 형질 전환 식물의 sgRNA 표적 부위는 시퀀싱에 의해 확인하였다. 이로부터 제조된 돌연변이체 벼를 확보하여 각각 mir806a와 mir172b 계통으로 지정했다. 본 발명에서 사용된 sgRNA 표적 부위 및 sgRNA의 염기서열은 서열번호 5 내지 8 및 서열번호 9 내지 12에 나타난 바와 같다.

표 2

가이드 RNA 표적 대상	서열	서열번호
MIR172b	5' -GAATCTTGATGATGCTGCAT-3'	서열번호 5
MIR172b	5' -GGCATCACACTCTCTACTGC-3'	서열번호 6
MIR806a	5' -GTAATTAGTATACTTTAATT-3'	서열번호 7
MIR806a	5' -AGCTAGTGAGATCGAACTAG-3'	서열번호 8

<1-5> 폐화수정 표현형의 분석

개화 전 heading 단계에서 논밭에서 자란 각 유전자형의 식물체로부터 작은이삭(spikelets)을 수확하였다. 표현형 분석을 위해, 내영(palea)과 외영(lemma)을 제거한 후 SZX16 현미경(Olympus, Japan)을 사용하여 인피(lodicules)를 촬영하였다.

<1-6> small RNA 라이브러리 구축 및 서열 분석

Trizol 시약(Invitrogen, USA)을 사용하여 야생형, ld-1 및 ld-2 식물체 각각의 어린 유수(young panicles)로부터 총 RNA(total RNA)를 분리하고, 15 % 변성 PAGE 겔(Accerbi et al., 2010)에서 겔 정제로 20 내지 30 nt의 small RNAs를 정제하였다. NEXTflex Small RNA-seq 키트 v3(Bioo Scientific, USA)를 사용하여 small RNA 라이브러리를 구성하고 Illumina MiSeq 플랫폼에서 시퀀싱하였다. small RNA 시퀀싱 데이터는 CLC Genomics Workbench 버전 11.0.1 (Qiagen, Germany)을 사용하여 처리되었다. 완벽하게 일치하는 성숙한(mature) miRNA를 검색하고 발현 값을 얻기 위해 miRBase Release 22에 등록된 Rice miRNAs를 사용하였다(Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). 발현 수준은 5 백만 리드(TP5M)당 전사체로 정규화하였다. CLC Genomics에서 EDGE 테스트를 사용하여 분석된 야생형과 ld 돌연변이 식물체 간의 발현 변화(fold change) 차이가 >2 또는 <2이고, P-값(P-value)이 >0.01에서 유의한 경우에 성숙한 miRNA가 차별적으로 발현된 것으로 해석하였다. small RNA 시퀀싱의 raw read는 National Center for Biotechnology Information의 Sequence Reads Archive에 수탁 번호 GSE174230으로 기탁되었다.

[0092] <1-7> RNA 분리 및 qRT-PCR 분석

[0093] miR172 표적의 발현 패턴을 평가하기 위해 Trizol 시약을 사용하여 0.5 ~ 1.0cm의 어린 유수에서 total RNA를 준비하고 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix cDNA Synthesis kit(Toyobo, Japan)를 사용하여 역전사하였다. 첫 번째 가닥 cDNA는 유전자 특이적 및 대조군 프라이머를 사용한 PCR 분석에 사용되었다(표 3). Ubiquitin5 유전자(OsUbi5; LOC_Os01g22490)는 내부 PCR 대조군으로 사용되었다. 각 샘플에 대해 세번의 생물학적 반복 실험을 수행하였다.

표 3

[0094]

프라이머 이름	서열
SHAT1 F	5' -CAACCGCTACAGCAGCTGCA-3'
SHAT1 R	5' -GACGATGAATGCAGCGATCTTG-3'
SNB F	5' -ATGGAAGGGAAGCTGTTACT-3'
SNB R	5' -AATGTGGATGCTGGGACATC-3'
TOE1 F	5' -GACTGCCCAACCTCATCCCTAT-3'
TOE1 R	5' -TGGGCGTTTTATGTGTGGATGCA-3'
IDS1 F	5' -CTGGCCTCCAGTTAACTTGT-3'
IDS1 R	5' -GGCGCCGGCAGAGAATCCT-3'
AP2-1 F	5' -GGATGACTACAAGGAGGACATA-3'
AP2-1 R	5' -GTCATACAGGCCAAGGTACAC-3'
OsUBQ5 F	5' -GACTACAACATCCAGAAGGAGTC-3'
OsUBQ5 R	5' -TCATCTAATAACCAGTTCGATTTC-3'

[0096] 실시예 2. ld 유전자의 후보로서 두 miRNA의 동정

[0097] 벼 식물체에서 자연적으로 발생하는 폐화수정 돌연변이 계통인 lodiculeless spikelet(ld) 품종의 경우 작은이삭(spikelets) 내부의 인피(lodicules)의 정상적인 발달이 결핍되어 폐화수정 표현형이 생긴 것임을 확인하였으며(도 1a 내지 1d), ld 돌연변이 벼의 작은이삭의 꽃밥은 모두 닫힌 영(hulls) 내에 남아 있는 반면, 야생형 벼의 작은이삭에서는 꽃밥이 모두 영의 외부에서 나타났다.

[0098] 단일 열성 ld 유전자좌(single recessive ld locus)는 1번 염색체(chromosome 1)의 장완(long arm)의 끝 영역에 매핑(mapped) 되었으며, 0.8 cM에서 S01178b가 측면에 있으며 S01181a와 함께 분리되었다(도 1e 상단).

[0099] ld의 유전자좌(locus) 범위를 더 좁히기 위해 1,027 F2 및 1,673 F3 자손 개체를 사용하여 고휘상도지도도를 구성하였으며, 그 다음, 로커스를 마커 S131588과 S108796 사이의 약 23kb 게놈(genome) 간격으로 구분하였다(도 1e 중간영역). ld를 운반하는 게놈 간격은 두 개의 겹치는 PAC/BAC 클론, AP003277 및 AP003298에 의해 정의된 영역에 걸쳐 있다. 사용 가능한 in silico 서열 주석 데이터베이스(<http://www.tigr.org> 및 <http://www.gramene.org>)를 검색한 결과, 해당 간격 내에서 1개의 예측 유전자(LOC_Os01g74130) 및 2개의 miRNA(MIR172b 및 MIR806b)만이 확인되었다(도 1e 하단).

[0100] 다음으로, ld 돌연변이 및 야생형 품종인 화청(Hwacheong) 각각의 23kb 게놈 영역을 시퀀싱하고 공개적으로 사용 가능한 품종인 Nipponbare의 해당 게놈 영역과 비교했다. 분석 결과, ld 돌연변이에서 미지의 40 bp로 대체된 4,572 bp의 결실을 확인하였으며, 전체 MIR806a 게놈 영역과 ld의 MIR172b 프로모터 영역에 해당하는 것으로 확인되었다(도 1f). 대조적으로 야생형 화청의 게놈 영역은 Nipponbare의 게놈 영역과 차이가 없었다.

[0101] 결과적으로, 맵 기반 클로닝 접근 방법을 이용한 분석을 통해, ld 돌연변이 유전자좌에서 두 개의 microRNA, 전체 MIR806a 전구체 및 MIR172b 전구체의 업스트림에 걸친 약 4kb의 결실이 존재함을 확인하였다.

[0103] 실시예 3. CRISPR/Cas9 접근법을 사용한 Ld 유전자 검증

[0104] 어떤 miRNA가 ld 형질을 담당하는지 확인하기 위하여, CRISPR/Cas9 다중 유전자 편집 방법을 채택하여 MIR806a 및 MIR172b의 각 miRNA 전구체를 삭제하였다. MIR806a 및 MIR172b의 전체 게놈 영역을 제거하기 위해 각 miRNA

에 대해 두 개의 sgRNA 표적(target) 부위를 선택하였다(도 2a 내지 2b). 특히, MIR172b 표적 2(target 2)는 성숙한 miR172b의 서열을 기반으로 설계되었다.

[0105] 14개와 22개의 형질전환 벼(품종명: 동진벼)를 확보하여 각각 mir806a와 mir172b 계통으로 지정했다. 각 형질전환 식물의 유전자형을 결정하는데 있어서, 시퀀싱 결과에서 혼합된 뉴클레오티드 피크로 인한 노이즈 문제가 있으므로, 두 표적 부위에서 돌연변이가 모두 발생한 형질전환 식물만 선택하였다. 14 개의 mir806a 및 22 개의 mir172b T0 형질전환 식물 중, MIR806a 계통의 1종(mir806a-4로 명명됨)과 MIR172b 계통의 3종(mir172b-4, mir172b-5 및 mir172b-6로 명명됨) 식물만이 각각 MIR806a 표적 1 및 MIR806a 표적 2와 MIR172b 표적 1 및 MIR172b 표적 2 모두에서 돌연변이가 나타났다(도 2c 및 2d). mir172b-4 돌연변이 계통은 MIR172b 표적 1에서 2-bp 결실 및 전체 표적 2에 걸친 74-bp 결실을 전달하였고, mir172b-5 돌연변이 계통은 전체 표적 1에 걸친 31-bp 및 타겟 2에서 170-bp 결실을 전달하였으며, mir172b-6 돌연변이 계통은 타겟 1과 타겟 2 모두에 각각 하나의 뉴클레오티드 삽입을 전달하였다(도 2c). 특히, mir172b-6 돌연변이 대립 유전자는 성숙한 miR172b에 하나의 뉴클레오티드 삽입을 유발하였다. mir806a-4 돌연변이 라인은 MIR806a 게놈 영역의 502개 뉴클레오티드를 삭제하여 MIR806a 표적 1 및 표적 2 전체를 삭제하였다(도 2d).

[0106] 표현형을 분석한 결과, MIR806b 전구체가 결실된 mir806a-4 식물은 비정상적인 작은이삭(spikelets)이 나타나지 않았으며 야생형 동진 품종과 표현형 차이가 나타나지 않았다(도 3a, 3e, 3f, 3j, 3k, 3o, 3p 및 3t). 이와 반면에, MIR172b 전구체가 결실된 mir172b-4, mir172b-5 및 mir172b-6에서는 모두 작은이삭에서 인피가 결핍되는 1d 돌연변이 식물체와 유사한 폐화수정 표현형이 분명하게 나타났다(그림 3b-d, g-i).

[0107] 따라서, 이러한 결과로부터 MIR806a가 아닌 MIR172b 상류 서열의 결실이 1d 돌연변이체에서 폐화수정 표현형을 유발하는 것을 확인하였다.

[0108] 1d 돌연변이 식물체와 상기 폐화수정을 보인 돌연변이체 mir172b-4, mir172b-5 및 mir172b-6을 각각 1d-1, 1d-2, 1d-3 및 1d-4로 재분류 및 명명하였다(도 3). mir172b 돌연변이 라인은 모두 작은이삭의 인피가 결핍된 반면에(도 3l 내지 3n), 야생형 및 mir806a-4는 일반적인 인피 발달이 나타났다(도 3k 및 3o). 개화 후, 야생형 및 mir172b 돌연변이 계통 모두 정상적으로 종자가 발달하였고, mir172b 돌연변이 벼의 경우 꽃밥(anthers)이 작은 이삭 내부에 남아 있는 것을 확인하였다(도 3q 내지 3s). 이는, 꽃의 폐화수정으로 인해 작은이삭 내에 꽃밥을 갖고 있더라도 꽃이 열리기 전에 화분을 옮겼음을 알 수 있다. 상기 모든 계통에 대하여 자손 세대에서 유전자형과 표현형을 확인하였다.

[0110] 실시예 4. 1d 돌연변이 체에서 miR172b의 발현

[0111] 1d 돌연변이 체에서 miR172b 발현 여부를 조사하기 위해, 2개의 선택된 돌연변이체 대립 유전자인 1d-1 및 1d-2와 야생형(품종명: 동진벼)의 어린 유수의 small RNAs를 시퀀싱하고 분석했다. 벼에서 MIR172 계통군에 4개의 MIR172 전구체가 주석으로 표시되었다. 이들은 세 가지 유형의 성숙한 miRNA로서 miR172ad, miR172b 및 miR172c를 생성한다. 이러한 miRNA는 대부분의 서열을 공유하고 5'말단의 첫 번째 서열에서만 다르기 때문에 RNA blotting 또는 qRT-PCR로 발현 패턴을 구별하기가 어려우므로, miR172 구성원의 발현 수준을 정확하게 측정하기 위해 small RNAs의 심층 시퀀싱(deep sequencing)을 수행했다. small RNAs 라이브러리를 구성 및 시퀀싱한 후, 야생형, 1d-1 및 1d-2의 어린 유수에서 각각 small RNAs의 7.2M, 7.4M 및 4.0M 리드(reads)를 얻었다(표 4).

표 4

유전형	리드 개수	정리된 리드 개수
야생형 (Wild type)	7,243,015	6,966,727
1d-1 (lodiculeless spikelet)	7,361,511	7,102,668
1d-2 (mir172b-4)	4,040,682	3,943,756

[0114] miRNA 유전자 발현패턴의 차이를 분석한 결과, 1d 돌연변이체에서 miR172b의 발현이 거의 완전히 감소되는 것으로 나타났으며, miR172b가 야생형과 1d 돌연변이 사이에서 차별적으로 발현되는 유일한 miRNA임을 확인하였으며, 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였다(도 4a). miR172b와 동일한 AP2 유전자를 표적하는 것으로

알려진 miR172ad를 포함한 다른 miRNA의 발현 수준은 야생형과 1d 돌연변이 사이에서 유의하게 변화하지 않았다. 1d-1 및 1d-2 돌연변이체 모두에서 miR172b의 발현이 거의 나타나지 않음을 확인했다(도 4b 및 4c). 1d-1 및 1d-2 돌연변이 체에서 상기 miR172b 서열이 각각 2회 및 1회 검출되었으나, 이는 오염 또는 시퀀싱 오류로 인한 것으로 분석되었다. 또한, miR172ad 발현은 야생형 및 1d 돌연변이에서 변화가 없었으나, miR172c는 검출되지 않았다(도 4d).

[0116] 실시예 5. 1d 돌연변이 체에서 miR172b의 잠재적 표적 유전자의 발현

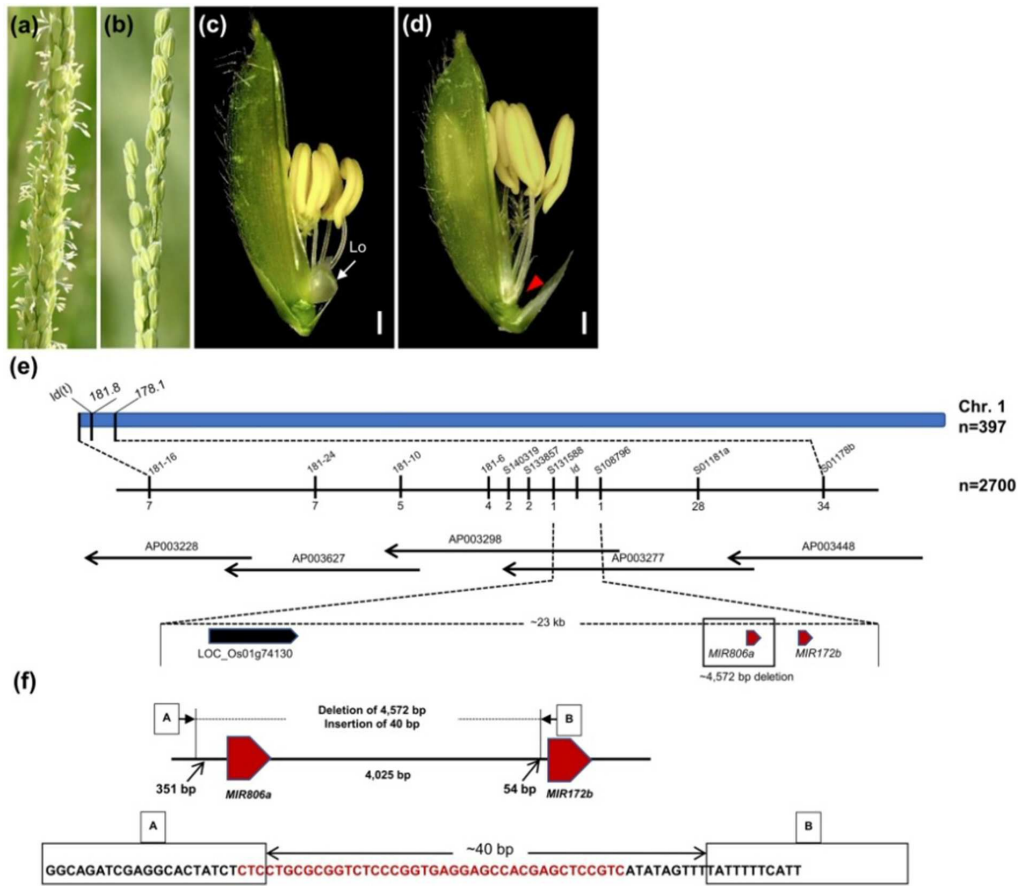
[0117] 1d 돌연변이가 miR172b 표적 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 벼에서 miR172b의 잠재적 AP2 표적 유전자를 조사하였다. miR172b의 추정(putative) 표적으로서, 애기장대(Aukerman and Sakai, 2003)에서 개화를 촉진하는 것으로 알려진 상동체(ortholog)인, Seed Shattering Abortion1 (SHAT1), Supernumerary Bract (SNB), Indeterminate Spikelet1 (IDS1) 및 TARGET OF EAT1 (TOE1)의 4 개의 추정 대상을 선정하였고, 이 중 SHAT1은 표적 및 miRNA172b 사이에 단 하나의 불일치를 갖는 유력한 후보였다(도 5a). 꽃 발달의 극초기 단계에서 인피 발달이 시작되는 시점에서, 세가지 생물학적 복제물 중 두 가지 기술적 복제물을 사용하여, 야생형, 1d-1, 1d-2로부터 각각 어린 유수(young panicles, 0.5~1.0 cm)를 채취하여 qRT-PCR 분석을 실시하였다. qRT-PCR에는 각 표적 유전자와 Ubi5 유전자 사이의 상대적 발현 수준을 나타내었다. 그 결과, 분석된 모든 1d 돌연변이체의 어린 유수에서 SHAT1, SNB, IDS1, TOE1의 발현은 유의한 변화가 없는 것으로 나타났다 (도 5b-f).

[0118] 따라서, cl7, spw1-cls1 및 spw1-cls2와 같은 기존 연구들에서 보고된 벼 돌연변이 대립 유전자와 비교할 때, 본 발명의 miR172 결실된 1d 돌연변이 벼는 인피가 완전히 결핍됨으로 인해 농경학적 특성에 해로운 영향을 미치지 않으면서도 더 나은 폐화수정 특성을 발휘할 수 있는 효과가 있으며, 이러한 1d 대립 유전자를 사용한 역교배 육종을 적용함으로써, 상업적으로 유용한 폐화수정 품종을 제공할 수 있음을 확인하였다.

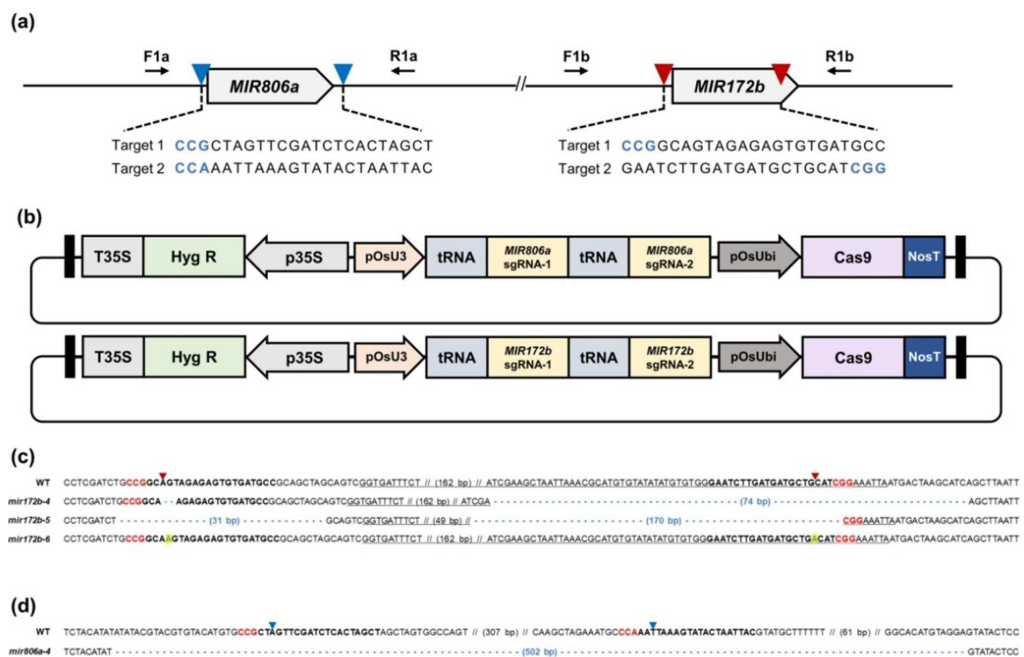
[0120] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

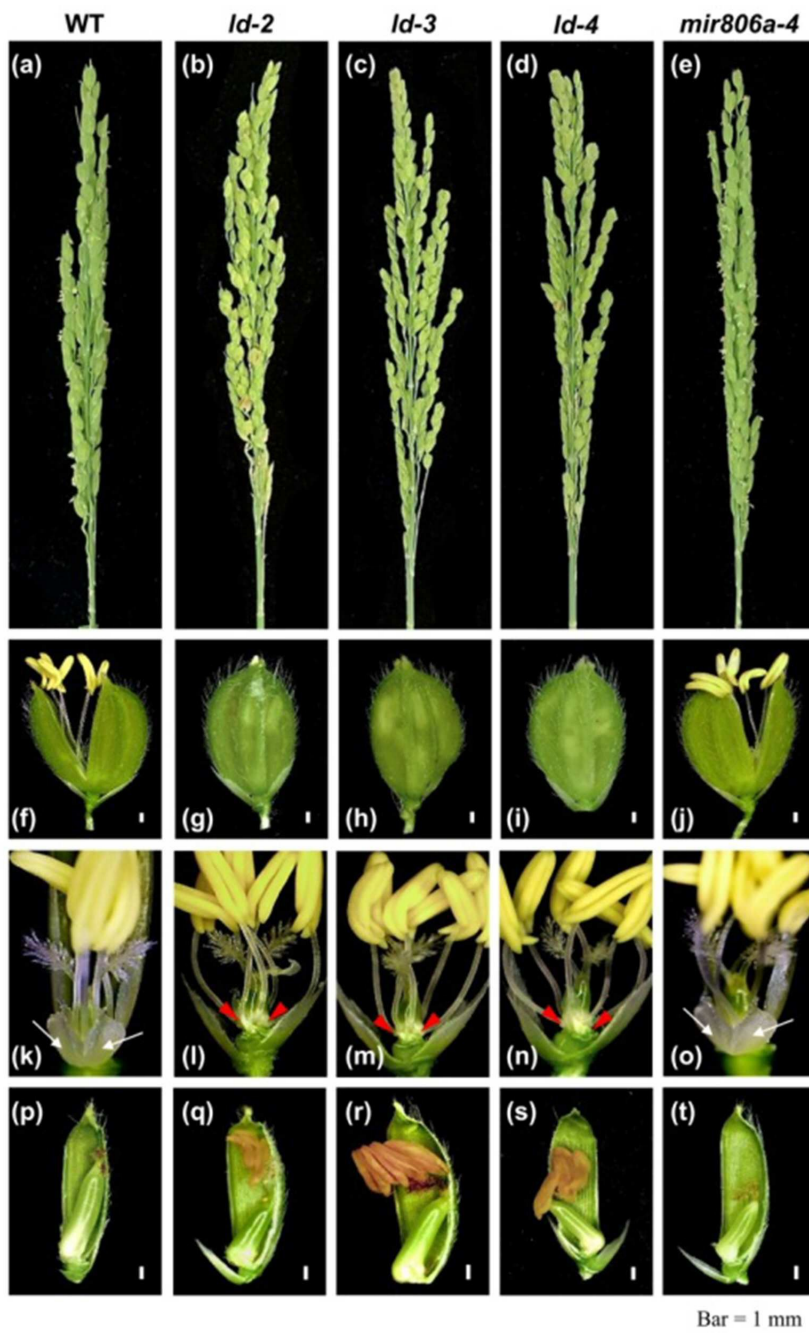
도면1



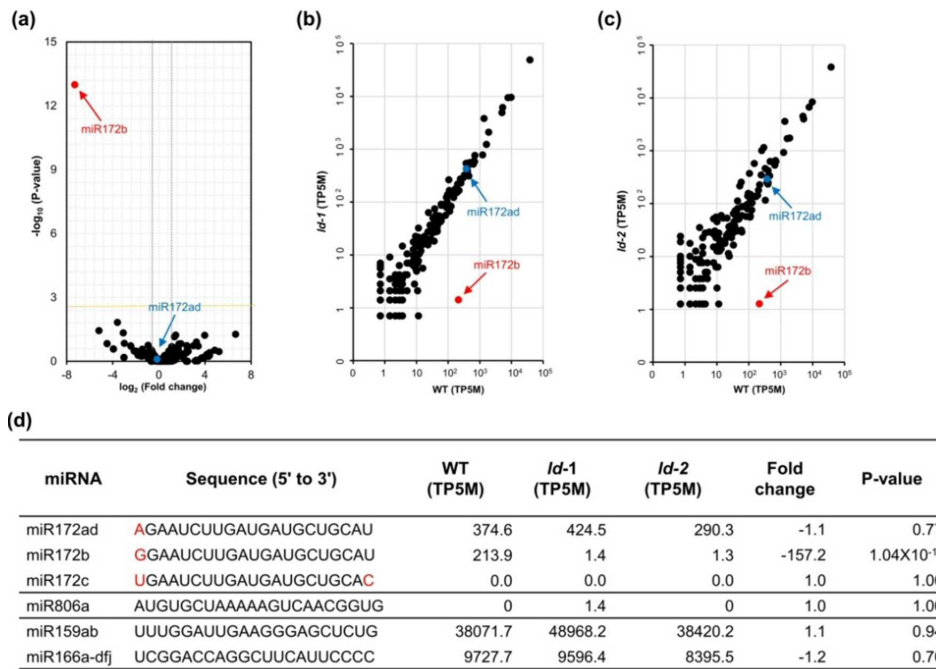
도면2



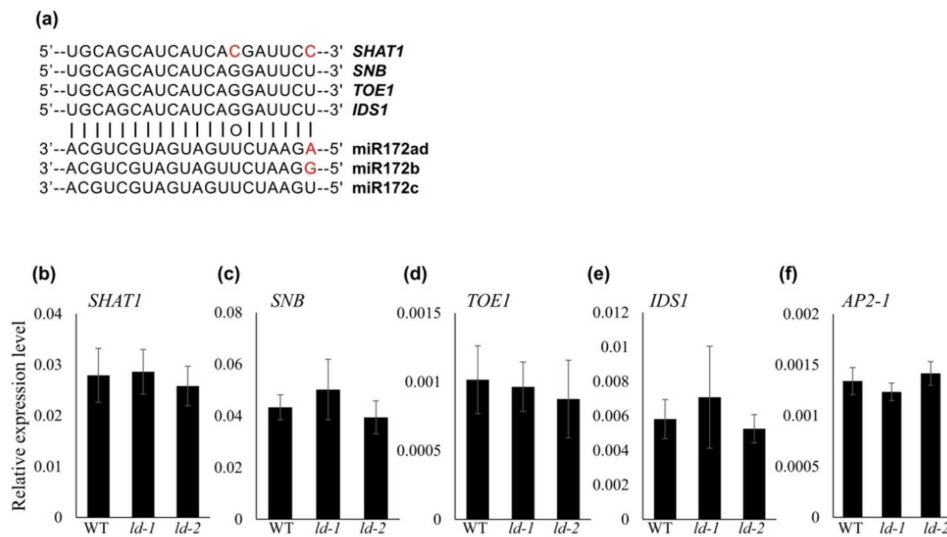
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
Seoul National University R&DB Foundation
Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> MicroRNA172b gene for inducing cleistogamy in rice and method for producing cleistogamous rice by mutation thereof
- <130> PN2105-229
- <160> 16
- <170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
 <211> 238
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa
 <400> 1
 ggtgatttct gacgtggcat catcaagatt cacacattac attgcatgca tgcataatgtc 60
 tatgcatctt tgagcttggt gttctgatct caacaaccta gctagctaata atttctctcc 120
 tggccctgac ctgcatgatg catggttgca cgcattggaga gagaagagag agatcgaagc 180
 taattaaacg catgtgtata tatgtgtggg aatcttgatg atgctgcatc ggaaatta 238
 <210> 2
 <211> 177
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oryza sativa mir172b-4 (1d-2)
 <400> 2
 ggtgatttct gacgtggcat catcaagatt cacacattac attgcatgca tgcataatgtc 60
 tatgcatctt tgagcttggt gttctgatct caacaaccta gctagctaata atttctctcc 120
 tggccctgac ctgcatgatg catggttgca cgcattggaga gagaagagag agatcga 177
 <210> 3
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oryza sativa mir172b-5 (1d-3)
 <400> 3
 ggtgatttct gacgtggcat catcaagatt cacacattac attgcatgca tgcataatgtc 60
 ggaaatta 68
 <210> 4
 <211> 124
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oryza sativa mir172b-6 (1d-4)
 <400> 4

cctcgatctg ccggcaagta gagagtgtga tgccgcagct agcagtcggt gatttctatc	60
gaagctaatt aaacgcatgt gtatatatgt gtgggaatct tgatgatgct gacatcggaa	120
atta	124
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MIR172b sgRNA target_1	
<400> 5	
gaatcttgat gatgctgcat	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MIR172b sgRNA target_2	
<400> 6	
ggcatcacac tctctactgc	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MIR806a sgRNA target_1	
<400> 7	
gtaattagta tactttaatt	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MIR806a sgRNA target_2	
<400> 8	
agctagttag atcgaactag	20
<210> 9	
<211> 96	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MIR172b sgRNA-1

<400> 9

gaatcttgat gatgctgcat gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60

cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgc 96

<210> 10

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MIR172b sgRNA-2

<400> 10

ggcatcacac tctctactgc gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60

cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgc 96

<210> 11

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MIR806a sgRNA-1

<400> 11

gtaattagta tactttaatt gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60

cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgc 96

<210> 12

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MIR806a sgRNA-2

<400> 12

agctagttag atcgaaactag gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60

cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgc 96

<210> 13

<211> 22

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ldF primer

<400> 13

gatgtaacca tcacctttac cg 22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ldR primer

<400> 14

ctataagtgc caccttgctg ct 22

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ld-delF primer

<400> 15

agaggaggagg aggatcactc 20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ld-delR primer

<400> 16

cttcgcttga gctcctctgt t 21