

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0031000
(43) 공개일자 2025년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)
A01H 6/46 (2018.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 9/22* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8245 (2013.01)
A01H 5/10 (2022.05)

(21) 출원번호 10-2023-0110587

(22) 출원일자 2023년08월23일

심사청구일자 2023년08월23일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

전중성

경기도 안양시 동안구 동안로 101 목련선경아파트 103동 1302호

심수현

경기도 수원시 영통구 매탄로79번길 6-21 301호

이상규

경상남도 진주시 예나로175번길 11 401동 2103호 (충무공동, 혁신도시중흥에스-클래스센트럴시티4단지)

(74) 대리인

위병갑

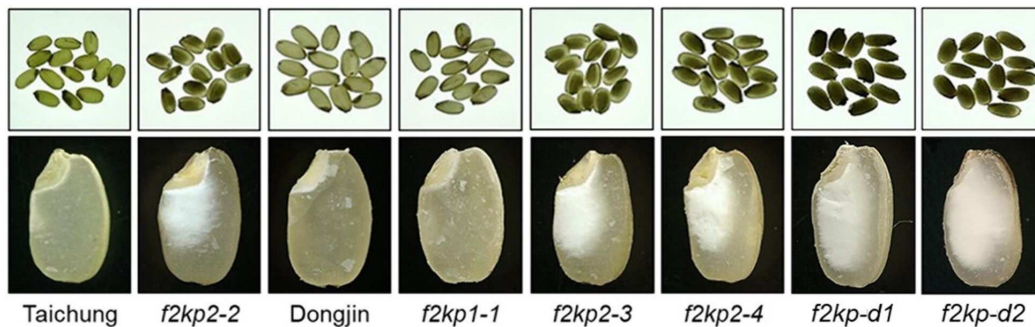
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 벼 유래 F2KP1 유전자 및 F2KP2 유전자의 이중 기능상실 돌연변이체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 벼 유래 F2KP1 유전자 및 F2KP2 유전자의 이중 기능상실 돌연변이체 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 건식제분용 식물체 생산용 조성물은 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 이중 기능상실 돌연변이를 유발함으로써 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자 단일 기능상실 돌연변이체와 비교하여 배유 분상질 정도가 현저히 증가된 형질전환 벼를 생산할 수 있다. 또한, 상기 형질전환 식물체의 종자를 이용하여 비용이 저렴한 건식제분으로 쌀가루를 용이하게 가공할 수 있어 다양한 쌀 가공식품 제조에 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A01H 6/4636 (2022.05)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/8234 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12Y 207/01105 (2013.01)
C12Y 301/03054 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395077466
과제번호	RD010381
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대농작물신육종기술개발사업
연구과제명	유전자교정 기반 성분 개선 육종소재 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자의 발현을 억제하는 제제 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 건식제분용 식물체 생산용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Fructose-2,6-phosphate kinase1을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 건식제분용 식물체 생산용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Fructose-2,6-phosphate kinase2을 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 건식제분용 식물체 생산용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제제는 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide), siRNA, shRNA, miRNA, PNA(protein nucleic acid), ribozyme, CRISPR/Cas9, T-DNA 또는 DNAzyme인 것을 특징으로 하는, 건식제분용 식물체 생산용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 종자의 불투명한 배유(opaque endosperm) 표현 형질을 유도하는 것을 특징으로 하는, 건식제분용 식물체 생산용 조성물.

청구항 6

Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 기능상실 돌연변이를 유발하는 단계를 포함하는, 건식제분용 형질전환 식물체 생산 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 단계는 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 일부 염기를 치환 또는 결실하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 건식제분용 형질전환 식물체 생산 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 기능상실 돌연변이는 CRISPR/Cas9 시스템에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 건식제분용 형질전환 식물체 생산 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 식물체는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파, 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쪽갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 건식제분용 형질전환 식물체 생산 방법.

청구항 10

Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자의 가이드RNA(guide RNA), Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 가이드RNA(guide RNA) 및 Cas9(CRISPR associated protein 9)을 코딩하는 유전자를 포함하는, 벼의 불투명한 배유 표현형질 유도용 재조합 벡터.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 Fructose-2,6-phosphate kinase1 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2의 활성을 감소 또는 불활성화시키는 것을 특징으로 하는, 벼의 불투명한 배유 표현형질 유도용 재조합 벡터.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 Fructose-2,6-phosphate kinase1의 가이드RNA(guide RNA)는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 벼의 불투명한 배유 표현형질 유도용 재조합 벡터.

청구항 13

제10항에 있어서,

Fructose-2,6-phosphate kinase2의 가이드RNA(guide RNA)는 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 벼의 불투명한 배유 표현형질 유도용 재조합 벡터.

청구항 14

제6항의 방법으로 제조된 형질전환 식물체.

청구항 15

제6항에 따른 식물체의 종자.

청구항 16

제15항의 종자로부터 생산된 분말.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 분말은 건식제분에 의해 생산된 것인, 분말.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벼 유래 F2KP1 유전자 및 F2KP2 유전자의 이중 기능상실 돌연변이체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 우리나라는 가구 구조 개편과 편의성 추구 등 쌀 소비 환경이 급격히 변화함에 따라 가공용 쌀 수요가 계속 증가하여 주정용을 제외하더라도 연간 약 40만 톤이 가공용으로 소비되고 있다. 이 중 28만 톤이 쌀가루 형태로 이용되고 있으며 28만 톤 중 22.4만 톤이 가공업체가 자체적으로 제분을 하고 제품을 생산하는 형태로 소비되고 쌀가루로 직접 유통되는 규모는 5.6만 톤에 불과하여 가공식품 생산의 중간재인 쌀가루 제분산업의 규모가 매우 미약하다.

[0004] 쌀 가공산업 활성화를 위해서는 쌀가루도 밀가루처럼 대형마트나 백화점에서 유통이 되고, 또한 가공제품군별 품질기준에 따른 다양한 등급의 쌀가루가 공급되어 가공업체와 소비자들이 쉽게 구매하고 사용할 수 있는 기반이 마련되어야 한다. 그러나 쌀 낱알의 단단함(곡립경도) 때문에 전통적으로 사용해온 습식제분은 쌀가루 산업화의 가장 큰 제한요인으로 작용하고 있다. 물에 불린 후 분쇄하는 습식제분은 건식제분보다 비용이 높을 뿐 아니라 그 공정이 복잡하여 대량생산을 위한 설비 구축에도 큰 비용이 요구되기 때문이다.

[0005] 밥쌀용 쌀 수급불균형 문제 해결의 가장 적극적인 수단은 햅쌀 소비이다. 그러나 설비투자 및 기술개발 여력이 낮은 영세한 가공업체들은 습식제분의 높은 비용으로 인해 원가절감을 위해서는 햅쌀보다는 정부에서 제공하는 값싼 묵은쌀이나 저품질의 수입쌀을 선호하고 있는 실정이다. 따라서 가공산업 활성화를 통한 쌀 소비 확대를 위해서는 건식제분에 적합한 쌀가루 전용 품종 개발의 필요성이 꾸준히 제기되어 왔다.

[0006] 이에 본 발명자들은 벼에 F2KP1 유전자 및 F2KP2 유전자의 이중 기능상실 돌연변이를 유발하는 경우, 상기 이중 기능상실 돌연변이체에서 종자의 곡립경도, 손상전분 함량, 아밀로스 함량 및 전체 전분 함량을 유의하게 감소시키는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2011-0092142호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자의 발현을 억제하는 제제 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 건식제분용 식물체 생산용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 이중 기능상실 돌연변이를 유발하는 단계를 포함하는 건식제분용 형질전환 식물체 생산 방법을 제공하는 데 있다.
- [0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자의 가이드RNA(guide RNA), Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 가이드RNA(guide RNA) 및 Cas9(CRISPR associated protein 9)을 코딩하는 유전자를 포함하는 벼의 불투명한 배유 표현형질 유도용 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.
- [0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 건식제분용 형질전환 식물체 생산 방법으로 제조된 형질전환 식물체를 제공하는 데 있다.
- [0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 식물체의 종자를 제공하는 데 있다.
- [0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 종자로부터 생산된 분말을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자의 발현을 억제하는 제제 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 건식제분용 식물체 생산용 조성물을 제공한다.
- [0017] 이어서, 본 발명은 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 이중 기능상실 돌연변이를 유발하는 단계를 포함하는 건식제분용 형질전환 식물체 생산 방법을 제공한다.
- [0018] 나아가, 본 발명은 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자의 가이드RNA(guide RNA), Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 가이드RNA(guide RNA) 및 Cas9(CRISPR associated protein 9)을 코딩하는 유전자를 포함하는 벼의 불투명한 배유 표현형질 유도용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0019] 더하여, 본 발명은 상기 건식제분용 형질전환 식물체 생산 방법으로 제조된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공하는 데 있다.
- [0020] 마지막으로, 본 발명은 상기 형질전환 식물체의 종자로부터 생산된 분말을 제공하는 데 있다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따른 건식제분용 식물체 생산용 조성물은 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 이중 기능상실 돌연변이를 유발함으로써 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자 단일 기능상실 돌연변이체와 비교하여 배유 분상질 정도가 현저히 증가된 형질전환 벼를 생산할 수 있다. 또한, 상기 형질전환 식물체의 종자를 이용하여 비용이 저렴한 건식제분으로 쌀가루를 용이하게 가공할 수 있어 다양한 쌀 가공식품 제조에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, OSF2KP1과 OSF2KP2의 아미노산 서열 비교 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsF2KP1, OsF2KP2 유전자 발현 분석 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 저산소 스트레스 처리에 따른 OsF2KP1 및 OsF2KP2의 발현 검정 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, CRISPR/Cas 매개 *osf2kp1 osf2kp2* 이중 돌연변이(f2kp-d)의 유전형 모식도를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsF2KP1, OsF2KP2 단일 및 이중 돌연변이의 종자 배유 표현형 확인 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsF2KP1, OsF2KP2 단일 및 이중 돌연변이의 전분 관련 지표 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsF2KP1, OsF2KP2 단일 및 이중 돌연변이의 F2KP 효소 활성 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 벼 배유 전분합성 과정에서 F2KP 효소의 작용 기작을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0026] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0027] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.
- [0028] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.
- [0030] 일 측면에서, 본 발명은 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자의 발현을 억제하는 제제 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 건식제분용 식물체 생산용 조성물에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자는 *Oryza sativa* 유래일 수 있으며, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 1의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 Fructose-2,6-phosphate kinase1 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자는 *Oryza sativa* 유래일 수 있으며, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 2의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 Fructose-2,6-phosphate kinase2 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유전자의 발현을 억제하는 제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide), siRNA, shRNA, miRNA, PNA(protein nucleic acid), ribozyme, CRISPR/Cas9, T-DNA 및 DNAzyme로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 명세서에서 사용된 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"이란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직

하계는 10 내지 40 염기이다.

- [0035] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55, 1995). 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.
- [0036] 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-테아자구아닌, N6 (6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.
- [0037] 본 명세서에서 사용된 용어, "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 방법 또는 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.
- [0038] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 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 구조 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, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 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(stem-loop) 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 짝을 이루는 데 지장이 없는 길이이면 특별히 한정되지 않는다.
- [0039] 본 명세서에서 사용된 용어, "shRNA"는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드를 의미하며, in vivo 상에서 스템-루프 구조를 이루고 있다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.
- [0040] 본 명세서에서 사용된 용어, "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 RNA 분자를 의미한다. miRNA는 세포 내에서 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.
- [0041] 본 명세서에서 사용된 용어, "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 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequenceselective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol. 254: pp1497-1500]). PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다.
- [0042] PNA는 상보적인 염기서열의 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 아마이드 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.
- [0043] 본 명세서에서 사용된 용어, "리보자임(ribozyme)"은 리보자임의 서열에 대해서 완전히 또는 부분적으로 상동성

인 서열을 갖는 핵산 분자를 분해할 수 있는 촉매적 RNA 분자이다. 표적 RNA와 특이적으로 짝을 이루고, 특정의 위치에서 포스포디에스테르 골격을 분해시킴으로써 표적 RNA를 기능적으로 불활성화시키는 RNA 리보자임을 코드화한 리보자임 이식유전자를 디자인할 수 있다. 이러한 분해를 수행함에 있어서, 리보자임은 그 자체가 변화되지 않으며, 따라서 재순환하여 다른 분자를 분해시킬 수 있다. 상기 리보자임은 리보자임 서열을 통합시킨 RNA 올리고뉴클레오타이드의 형태로 세포에 대해 직접 표적화될 수 있거나, 원하는 리보자임 RNA를 코드화한 발현 벡터로서 세포 내에 도입될 수 있다. 리보자임은 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대해서 기술된 것과 대체로 동일한 방식으로 사용 및 적용될 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 용어, “CRISPR/Cas9”은 크리스퍼(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 유전자 가위라 불리는 게놈 편집 방법으로, 특정 염기서열에 특이적으로 결합하는 RNA(gRNA)와 특정한 염기서열을 자르는 가위 역할인 Cas9 nuclease로 구성되며, CRISPR/Cas9 시스템으로 불린다. 이러한 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하면 세포나 동물에 플라스미드(Plasmid) DNA를 도입하여 특정 유전자의 기능을 억제할 수 있는 녹아웃(knockout)이 가능하다.

[0045] 본 명세서에서 사용된 용어, “T-DNA”는 Agrobacterium 종의 Ti(tumor-inducing) 플라스미드의 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 20,000 bp 길이로, 이들의 삽입에 의하여 타겟 유전자를 붕괴시킴으로써 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis)를 일으키는 데에 사용되며, 삽입된 T-DNA 서열은 돌연변이를 일으킬 뿐 아니라 타겟 유전자를 표지하기도 한다.

[0046] 본 명세서에서 사용된 용어, “DNAzyme”은 단일 가닥 RNA를 절단하는 촉매 DNA 분자로, 표적 RNA 서열에 대하여 매우 선택적이고 이로써 전령 RNA를 표적으로 하여 특정 유전자를 하향 조절하는 데 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 종자의 불투명한 배유(opaque endosperm) 표현 형질을 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 식물체는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물 또는 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쪽갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물이 될 수 있으며, 바람직하게는 단자엽 식물, 더욱 바람직하게는 벼일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 본 명세서에서 사용된 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.

[0051] 일 측면에서, 본 발명은 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 이중 기능상실 돌연변이를 유발하는 단계를 포함하는 건식제분용 형질전환 식물체 생산 방법에 관한 것이다.

[0052] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 이중 기능상실 돌연변이를 유발하는 단계는 Fructose-2,6-phosphate kinase1 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2의 활성을 감소 또는 불활성화시키는 것일 수 있다.

[0053] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 기능상실 돌연변이는 표적 유전자의 1개 이상의 일부 염기를 치환 또는 결실하여 이루어지는 것일 수 있다. 예를 들어 전장 DNA 중 0.1% 이상의 염기를 치환 또는 결실하여 이루어지는 것일 수 있다.

[0054] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 기능상실 돌연변이는 CRISPR/Cas9 시스템에 의해 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 일례로, CRISPR/Cas9 시스템은 특정 유전자를 RNA-가이드 엔도뉴클레아제에 의해 유전적으로 조작할 수 있다. 상기 유전적인 조작은 특정 유전자를 구성하는 핵산서열 내 PAM(Protospacer-adjacent Motif) 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 3bp 내지 25bp의 염기서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입; 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환; 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입 중 하나 이상의 핵산의 변형을 포함할 수 있다. 또한, 상기 PAM 서열은 Cas

단백질의 유래 미생물에 따라 상이할 수 있다.

- [0056] 또한, 상기 기능상실 돌연변이는 CRISPR/Cas9 통한 유전자 편집 외에도, T-DNA와 같은 외래유전자를 이용하거나, 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.
- [0057] 본 명세서에서 사용된 용어, "형질전환"은, 식물 숙주가 아그로박테리아 또는 각종 화학적 또는 물리적 방법 중 하나를 이용한 DNA의 도입에 의해 유전적으로 변형되도록 만드는 공정을 대체로 지칭한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "식물 숙주"는 식물의 임의의 세포, 조직, 기관 또는 자손을 포함하는 식물을 지칭한다. 많은 적합한 식물 조직 또는 식물세포가 형질전환될 수 있으며, 이로 제한되지는 않지만, 원형질, 체세포배(somatic embryo), 화분, 잎, 묘목, 줄기, 가피(calli), 기는 줄기(stolon), 미소피경, 및 싹을 포함할 수 있다. 식물 조직은 또한, 유성 또는 무성으로 생성된 여부를 떠나, 그러한 식물, 씨드, 자손, 번식체의 임의의 클론 및 절단물 또는 씨드와 같은 이들의 임의의 후손을 지칭한다.
- [0058] 본 명세서에서 사용된 용어, "식물세포"는, 온전한 전체 식물 또는 배양 매질 또는 버퍼 중 현탁액 내 또는 완충액 또는 매질 또는 한천 상, 시험관 내 조직 배양에서 성장한 분리된 형태 중 어느 하나, 또는 예를 들어 식물 조직, 식물 기관 또는 전체 식물과 같은 고도의 조직화된 단위의 일부로서, 살아있는 식물의 개별 단위를 지칭한다.
- [0059] 또한, 상기 형질전환은 통상적으로 사용되는 재조합 벡터를 모두 사용하여 이루어질 수 있으나, 아그로박테리움의 도입을 통하여 이루어지는 것이 바람직하다. 상기에서 아그로박테리움의 종류는 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명에서 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나, 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 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.
- [0062] 일 측면에서, 본 발명은 Fructose-2,6-phosphate kinase1 유전자의 가이드RNA(guide RNA), Fructose-2,6-phosphate kinase2 유전자의 가이드RNA(guide RNA) 및 Cas9(CRISPR associated protein 9)을 코딩하는 유전자를 포함하는 비의 불투명한 배유 표현형질 유도용 재조합 벡터에 관한 것이다.
- [0063] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터는 Fructose-2,6-phosphate kinase1 및 Fructose-2,6-phosphate kinase2의 활성을 감소 또는 불활성화시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터는 손상전분의 함량을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Fructose-2,6-phosphate kinase1의 가이드RNA(guide RNA)는 Fructose-2,6-phosphate kinase1를 코딩하는 유전자의 3번째 엑손을 표적하는 것일 수 있고, 바람직하게는 3번째 엑손의 5'-TACTGACATCAGGGATTCCC-3' 서열을 표적하는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 본 발명의 일 실시예에 있어서, Fructose-2,6-phosphate kinase2의 가이드RNA(guide RNA)는 Fructose-2,6-phosphate kinase1를 코딩하는 유전자의 3번째 엑손을 표적하는 것일 수 있고, 바람직하게는 3번째 엑손의 5'-TGACCTAGCTGCTAGTTGGA-3' 서열을 표적하는 것일 수 있으며, 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터는 벡터가 도입된 형질전환 식물체의 종자의 곡립경도, 손상전분 함량, 아밀로스 함량 또는 전체 전분 함량을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 일 측면에서, 본 발명은 상기 건식제분용 형질전환 식물체 생산 방법으로 제조된 형질전환 식물체 및 이의 종자

에 관한 것이다.

[0072] 일 측면에서, 본 발명은 상기 종자로부터 생산된 분말에 관한 것이다.

[0073] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 분말은 건식제분에 의해 생산된 것일 수 있다.

[0075] 본 발명에서 제공하는 종자는 건식제분에 의한 쌀가루 생산능이 우수하므로, 쌀가루를 이용한 다양한 식품의 제조에 제한 없이 사용될 수 있다.

[0076] 종래의 벼 품종은 종자의 경도가 높아서 밀을 대상으로 하는 통상의 건식제분기에 적용할 경우, 균질한 밀도의 쌀가루를 제조하기가 용이하지 않고, 균질한 밀도의 쌀가루를 제조하기 위해서는 많은 시간과 비용이 소모된다는 단점이 있었다.

[0077] 그러나, 본 발명의 형질전환 벼는 불투명한 배유 표현형질을 나타내어 종래의 벼 품종에 비해 분상질립 비율이 현저히 높아 통상의 건식제분기에 적용하여도 우수한 품질의 쌀가루를 제조할 수 있다.

[0079] 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.

[0081] <실시예 1> 벼 F2KP 동형단백질 OSF2KP1, OSF2KP2 특성 분석

[0082] 1-1. 벼 F2KP 동형단백질 아미노산 서열 분석

[0083] 애기장대 유전체 데이터베이스 TAIR(<http://www.arabidopsis.org>)로 부터 기보고된 애기장대 F2KP의 단백질 서열을 확보한 후 NCBI BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 벼 F2KP 동형단백질을 분석하였다.

[0084] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 벼에는 두 종류의 F2KP 동형단백질 F2KP1(Fructose-2,6-phosphate kinase1), F2KP2(Fructose-2,6-phosphate kinase2)가 존재하며 두 단백질은 아미노산 서열 상 64.56%의 매우 높은 유사도를 나타냄을 확인하였다. 또한, 두 단백질 모두 전분 결합 도메인과 6-Phosphofructo-2-kinase 도메인을 보유하고 있는 것으로 나타났다.

[0086] 1-2. *OsF2KP1*, *OsF2KP2* 유전자 발현 검정

[0087] NCBI GEO database에 공개된 public RNA-sequencing 자료를 기반으로 개발된 벼 전사체 데이터베이스, CAFRI-Rice (<https://cafri-rice.khu.ac.kr>)를 이용하여 *OsF2KP1*, *OsF2KP2* 유전자의 전사체 발현을 생물정보학적으로 분석하였다.

[0088] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 두 유전자 모두 벼의 모든 기관에서 높은 발현을 보이는 것으로 확인되었으며, 특히 *OsF2KP1*은 잎, 줄기 등 지상부에서, *OsF2KP2*는 종자에서 상대적으로 더 높게 발현하는 것으로 나타났다.

[0090] 1-3. 저산소 스트레스 처리에 따른 *OsF2KP1*, *OsF2KP2*의 발현 분석

[0091] 기존 보고에 따르면, 벼, 보리 등의 종자 발달 과정에서 종자의 중심부로 갈수록 산소 농도가 크게 감소하여 저산소 스트레스에 노출되는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 종자 중심부에서는 미토콘드리아 매개 산소 호흡이 저해되고 ATP의 합성이 제한되므로, 기존의 ATP 활용 방식이 아닌 inorganic pyrophosphate(PPi) 매개 전분합성 유전자에 의해 대사가 이루어진다.

[0092] 따라서, 벼의 초엽에서 저산소 스트레스 처리에 따른 *OsF2KP1*, *OsF2KP2*의 발현을 전사체 수준에서 검정하였다. 전사체 발현은 저산소 처리구 및 대조구 식물의 초엽에서 전장 mRNA를 추출하고, 이를 역전사효소를 이용하여 cDNA(complementary DNA)로 제합성한 후 RT-qPCR(Reverse transcription-quantitative polymerase chain

reaction)을 수행하여 검정하였다.

[0093] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 *OsF2KP1*은 저산소 처리 시 발현이 감소하는 반면 *OsF2KP2*의 경우 저산소 조건에서 발현이 크게 증가한 것을 확인하였다.

[0094] 이러한 결과는 종자의 중심부에 해당하는 전분층에서는 *OsF2KP1* 보다 *OsF2KP2*가 높은 발현을 보인다는 것을 의미한다.

[0096] <실시예 2> 형질전환 돌연변이를 이용한 배유 표현형 돌연변이 확인

[0097] 한편, 도 2의 발현 분석에서 *OsF2KP1*와 *OsF2KP2* 모두 종자에서 상당량 발현하는 것으로 나타남에 따라, *OsF2KP1* 및 *OsF2KP2* 이중 돌연변이에서 기존 특허로 출원된 *OsF2KP2* 돌연변이의 불투명한 배유와 비교하여 해당 표현형에 변화가 있는지 확인하기 위해, *Oryza sativa* 유래 F2KP1 유전자(*OsF2KP1*) 및 *Oryza sativa* 유래 F2KP2 유전자(*OsF2KP2*) 유전자가 이중 기능상실된 형질전환 벼를 생산하였다(도 4 참조).

[0098] 구체적으로, CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 동진(Dongjin) 벼 품종에서 *OsF2KP1* 및 *OsF2KP2* 유전자의 3번째 엑손의 PAM 표적 부위 주변에 이중으로 돌연변이를 유발한 기능상실 돌연변이체는 *f2kp-d1* 및 *f2kp-d2*로 명명하였다. *OsF2KP1* 유전자에 대해서는 세 번째 엑손의 5' - TACTGACATCAGGGATTCCC (GGGAATCCCTGATGTCAGTA) - 3' 을 표적서열로, *OsF2KP2* 유전자는 세 번째 엑손의 5' - TGACCTAGCTGCTAGTTGGA - 3' 을 표적서열로 하여 sgRNA를 제작하였다.

[0099] CRISPR/Cas9 시스템에서 protospacer adjacent motif (PAM)을 찾고 off-target effect를 피하기 위해 CRISPRdirect program (Naito et al., 2015)을 이용하여 가능한 표적서열을 스크리닝하였다. *OsF2KP1* 및 *OsF2KP2* 유전자 이중 돌연변이를 위한 sgRNA는 Golden-gate cloning 방법을 이용하여 tRNA-*OsF2KP1* sgRNA-tRNA-*OsF2KP2* sgRNA 형태의 DNA 조각을 합성한 후 multi-site CRISPR vector인 pRGEB32(Xie et al., 2015)에 클로닝 하였다. 본 발명에서 사용된 가이드RNA 서열은 하기 표 1에 나타내었으며, 표적서열은 대문자, backbone 가이드RNA 서열은 소문자로 나타내었다. 표 1에 기재된 두 개의 sgRNA와 Cas9을 동시에 발현하는 CRISPR/Cas9 운반체는 아그로박테리움 매개 형질전환법(Jeon et al., 2000)을 이용하여 야생형 자포니카 품종인 동진(Dongjin)에 도입하였다. 그 결과 얻은 서로 다른 T0 개체에 대하여 세대 진전 후 CRISPR/Cas9 운반체가 제거되면서 두 유전자에 대한 돌연변이가 발생한 2개 계통, *f2kp-d1*과 *f2kp-d2*를 선별하였다.

표 1

[0101]

유전자	guide RNA	서열번호
<i>OsF2KP1</i>	TACTGACATCAGGGATTCCCgtttttagagctagaaatagcaagtta aaataaggctagtcggttatcaacttgaaaaagtgccaccgagtcg gtgc	3
<i>OsF2KP2</i>	TGACCTAGCTGCTAGTTGGAgttttagagctagaaatagcaagtta aaataaggctagtcggttatcaacttgaaaaagtgccaccgagtcg gtgc	4

[0103] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, *OsF2KP1* 및 *OsF2KP2* 이중 돌연변이체(*f2kp-d1* 및 *f2kp-d2*)의 종자는 종자 배유 대부분의 영역에 걸쳐 불투명한 배유 표현형이 나타났다. *OsF2KP1* 단일 돌연변이체(*f2kp1-1*)의 종자의 경우 야생형 동진벼 종자와 차이가 없고 *OsF2KP2* 단일 돌연변이체(*f2kp2-2*, *f2kp2-3*, *f2kp2-4*)의 종자는 종자 중심부에만 불투명 배유 표현형을 보이는 결과를 고려하였을 때, *OsF2KP1* 및 *OsF2KP2*의 이중 기능상실 돌연변이를 유발하는 경우 단일 유전자의 기능상실 돌연변이에 비해 배유 분상질 정도가 현저히 상승한다는 것을 알 수 있다.

[0105] <실시예 2> *OsF2KP1* 및 *OsF2KP2*의 이중 기능상실 돌연변이체의 전분 관련 지표 분석

[0106] *OsF2KP1* 및 *OsF2KP2*의 이중 기능상실 돌연변이가 벼의 종자에 미치는 영향을 확인하기 위해, 이중 기능상실 돌

연변이체 종자의 곡립경도, 손상전분 함량, 아밀로스 함량, 전체 전분 함량, 아밀로펙틴 사슬 분포 등의 전분 관련 지표를 측정하였다.

[0107] 곡립경도는 Zwick Roell 사의 Z 0.5를 이용하여 종자 배유의 파쇄점(breakage point)을 측정하여 결정되었으며, 손상전분 함량, 아밀로스 함량 및 전체 전분 함량은 각각 Megazyme 사의 K-SDAM, K-AMYL 및 K-TSTA assay kit를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. 아밀로펙틴 사슬 분포는 종자를 갈아 0.1% NaOH 용액에 담근 후 정제수로 세척하여 종자 전분을 추출한 후, Ryoo et al. (2007)에 기술된 high performance anion exchange chromatography(HPAEC) 방법을 이용하여 측정하였다.

[0108] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 곡립경도의 경우 *f2kp-d*에서 야생형에 비해 약 70~80%의 큰 감소를 보였으며, 동일 조건에서 30~40% 가량 감소된 *f2kp2* 단일 돌연변이보다도 유의미한 수준으로 감소하였다(도 6a). 손상전분 함량의 경우 8~10% 수준인 야생형에 비해 *f2kp-d* 이중 돌연변이에서는 4~6% 수준으로 감소하였으며, 이는 *f2kp2* 단일 돌연변이와 비슷한 수준을 나타내었다(도 6b). 아밀로스 함량의 경우 *f2kp-d*는 약 19% 수준을 보이며 22~23%인 야생형에 비해 유의미한 수준의 감소를 보였으며, 20~21% 수준인 *f2kp2* 단일 돌연변이보다 낮은 것으로 나타났다(도 6c). 종자 100g 당 전체 전분 함량의 경우, *f2kp-d* 돌연변이에서 야생형 및 *f2kp2* 단일 돌연변이에 비해 1~2g 가량 감소하는 것으로 나타났다(도 6d). 아밀로펙틴 사슬 분포의 경우 *f2kp-d* 및 *f2kp2* 돌연변이에서 야생형에 비해 DP5-13의 짧은 사슬은 증가하였고, DP14-18 및 DP20-30의 중간 사슬은 감소하는 것으로 나타났다(도 6e).

[0109] 벼의 경우 제분 후 손상전분 함량이 10%를 초과하는 경우 제빵 품질이 현저히 떨어지며, 4~6%일 때 가장 제빵에 적합한 것으로 알려져 있다(Qin et al., Journal of Cereal Science, 2021). 따라서 이러한 결과는 *OsF2KP1* 및 *OsF2KP2*의 이중 기능상실 돌연변이가 *OsF2KP2* 단일 돌연변이와 같이 제빵에 적합한 4~6% 수준의 손상전분비를 유지하면서도 곡립경도는 현저히 감소하여 *OsF2KP2* 단일 돌연변이보다 건식제분에 매우 용이하다는 것을 의미한다.

[0111] <실시예 3> F2KP 활성 분석

[0112] *OsF2KP* 유전자 돌연변이에서 배유 표현형 및 전분 관련 지표들이 현저한 변화를 보임에 따라, 효소 결합법을 이용하여 배유에서 F2KP 단백질 활성을 측정하였다.

[0113] 구체적으로, PFP(Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase) 효소의 활성을 직접적으로 매개하는 F2KP 효소의 특성을 고려하여, Park et al. (2008)에 기술된 바와 같이 PPI-dependent PFP의 활성 변화를 측정함으로써 F2KP의 활성을 측정하였다. 40 mg의 곱게 간 종자에 25 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 100 mM F-6-P, 1 mM NADH, 0.5 U aldolase, 1 U triosephosphate isomerase, 1 U glycerophosphate dehydrogenase가 포함된 완충용액을 처리한 assay mixture를 제작한 후 10 mM pyrophosphate를 넣어 F2KP 효소 반응을 시작하였다. 이후 Santa Cruz 사의 F2,6BP(Fructose 2,6-bisphosphate)를 이용하여 PFP 활성과 F2,6BP 농도 간의 상관관계를 분석하여 F2KP 활성을 결정하였다.

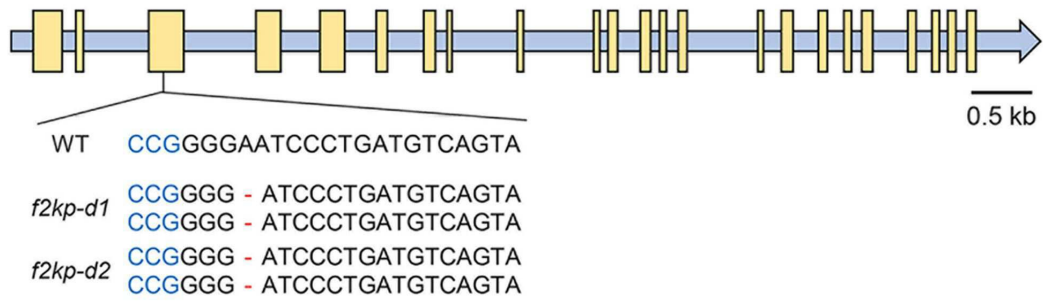
[0114] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 *f2kp-d* 이중 돌연변이체는 야생형에 비해 F2KP 활성이 66~75% 가량 감소된 것으로 나타났으며, 이는 45~53% 감소된 *f2kp2* 단일 돌연변이체보다 유의미하게 낮은 수치이다.

[0115] 따라서 *OsF2KP* 이중 돌연변이체의 심한 불투명 배유 표현형은 F2KP 활성의 현저한 감소와 직접적으로 연관된 것으로 판단된다. 도 8은 일련의 결과를 바탕으로 벼 종자 배유 전분합성 과정에서 F2KP의 작용기작을 나타낸 도이다.

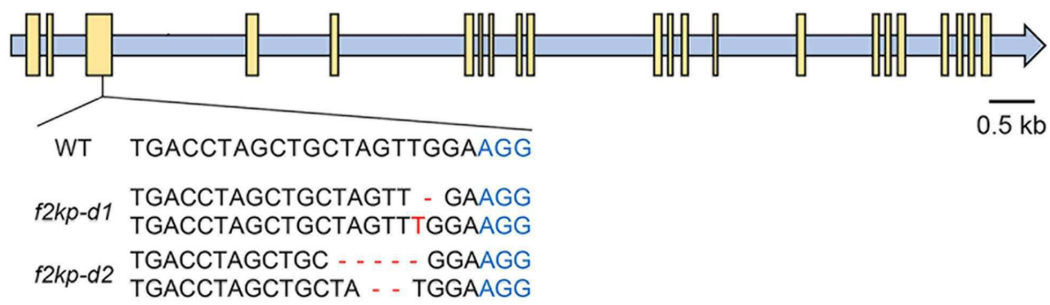
[0117] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면4

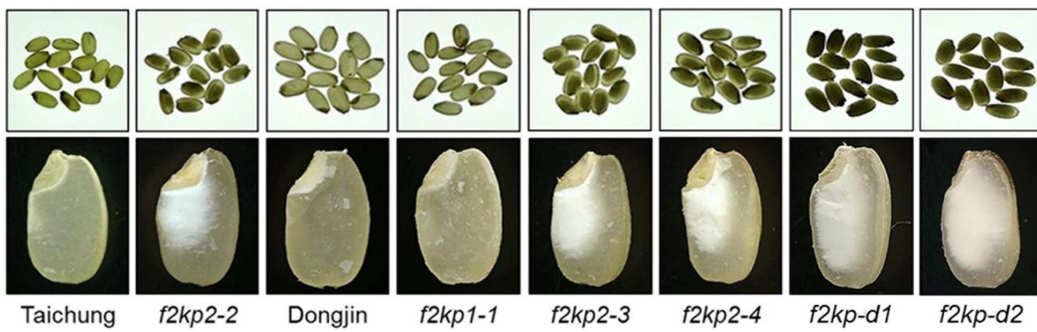
OsF2KP1



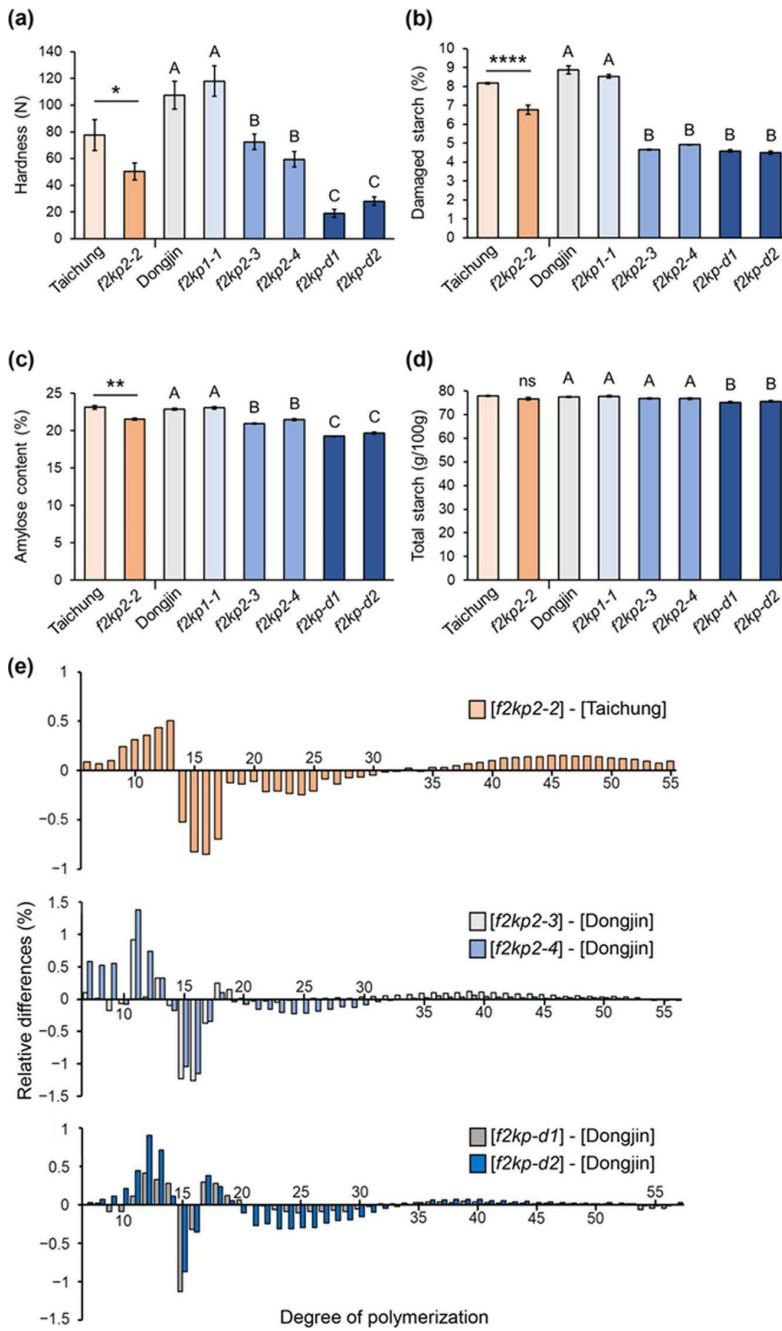
OsF2KP2



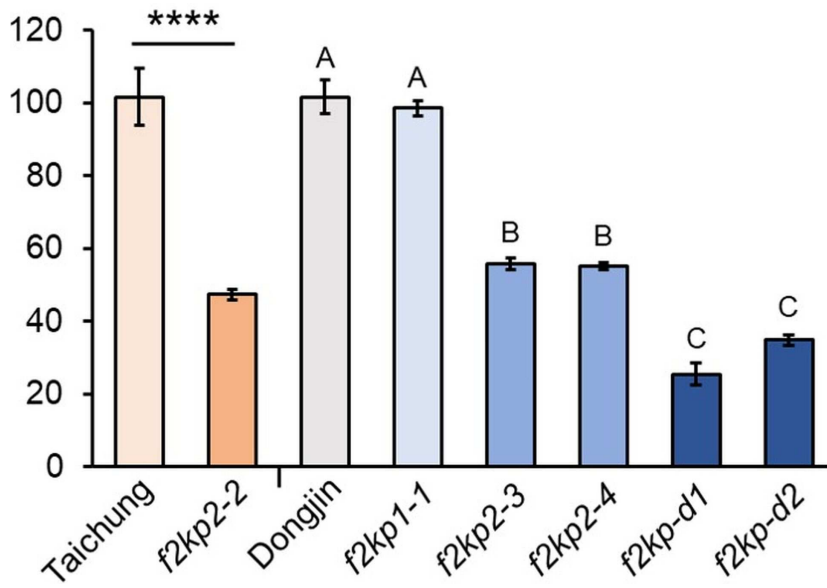
도면5



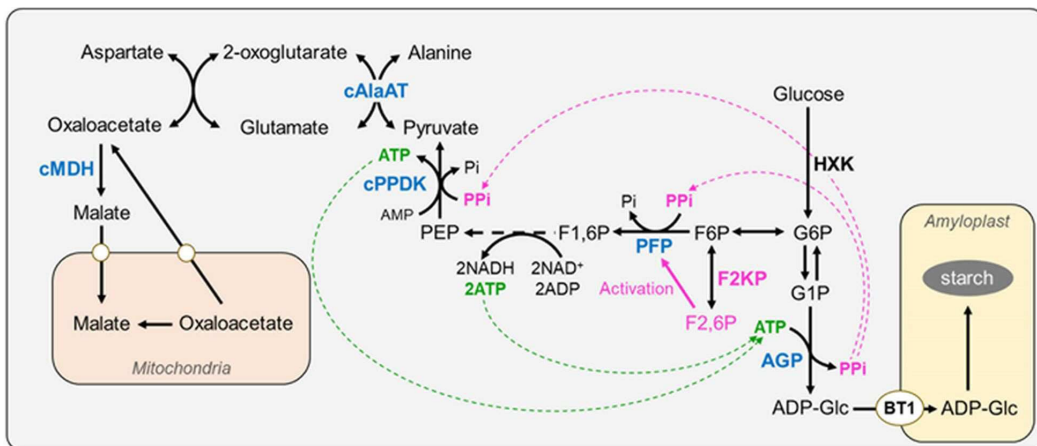
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.