(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 11 월 3 일 (03.11.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/175351 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004311

(22) 국제출원일: 2015 년 4 월 29 일 (29.04.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(71) 출원인: **서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 151-742 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: **김주곤 (KIM, Ju-Kon)**; 232-916 강원도 평창군 대화면 평창대로 1447-1, 315 동 202 호, Gangwon-do (KR). **정하린 (JUNG, Harin)**; 232-916 강원도 평창군 대화면 평창대로 1447 서울대학교 평창캠퍼스 주거동 323-301 호, Gangwon-do (KR).

(74) 대리인: **최규환 (CHOI, Kyu Whan)**; 302-868 대전시 서구 한밭대로 745, 12 층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

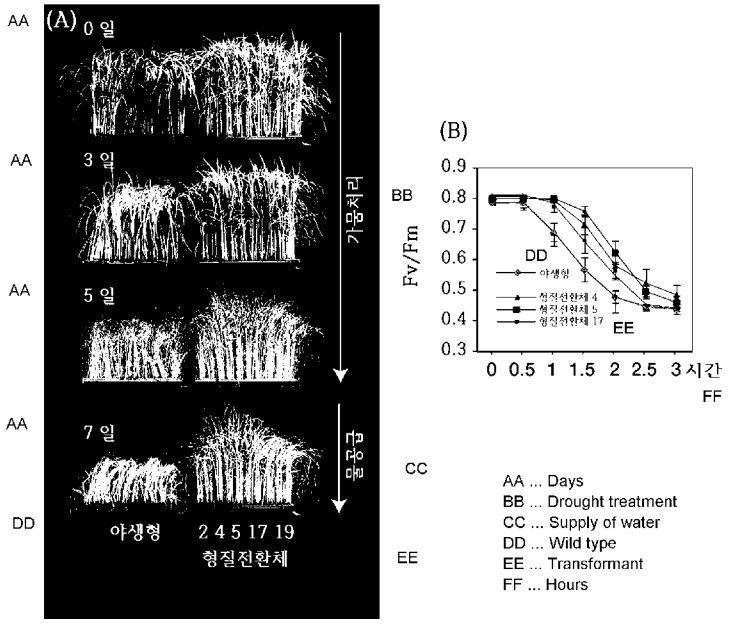
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

WO 2016/175351 A1

(54) Title: RICE-DERIVED OSIAA6 GENE FOR INCREASING DROUGHT STRESS RESISTANCE OF PLANT AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 식물의 가뭄 스트레스 내성을 증가시키는 벼 유래의 Ｏｓ ｌ ＡＡ６유전자 및 이의 용도



(57) **Abstract**: Disclosed are: a method for controlling the resistance of a plant to environmental stress, comprising a step of transforming plant cells with a recombinant vector including a gene coding for a rice-derived Oryza sativa Aux/IAA 6 (OsIAA6) protein; a method for producing a transgenic plant body of which the resistance of a plant to environmental stress is controlled, comprising a step of transforming plant cells with the recombinant vector including a gene coding for the OsIAA6 protein; a transgenic plant body produced by the method and of which the resistance to environmental stress is controlled; and seeds thereof.

(57) **요약서**: 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 조절하는 방법, 상기 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 식물의 가뭄 스트레스 내성을 증가시키는 벼 유래의 OsIAA6 유전자 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 식물의 가뭄 스트레스 내성을 증가시키는 벼 유래의 *OsIAA6* 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 조절하는 방법, 상기 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다.

배경기술

[2] 가뭄 스트레스는 전세계적으로 작물 생산에 가장 심각한 영향을 미치는 요인 중 하나이다. 가뭄 조건에 식물을 노출시키면, 많은 스트레스 관련 유전자가 유도되며, 이의 산물은 스트레스에 유도된 손상에 대한 세포 보호물질로서 기능하는 것으로 생각된다. 스트레스 관련 유전자의 발현은 특이적 전사인자에 의해 대개 조절되며, 이는 벼 및 애기장대의 경우 게놈 전체 유전자 수의 약 6%를 차지한다.

[3] AUX/IAA(옥신(auxin)/인돌아세트산(indoleacetic acid)) 유전자는 단백질의 발현이 식물 호르몬 옥신에 의해서 엄격하게 조절되는 단백질 패밀리를 코딩한다. 식물 호르몬 옥신은 세포 분열, 세포 팽창 및 분화, 배의 패터닝 (patterning), 맥관구조 또는 다른 조직, 원뿌리 및 곁뿌리 또는 줄기 분열 조직의 성장 조절과 같은 다양한 과정에 관련한다. 일반적으로 AUX/IAA 단백질은 4개의 보존된 아미노산 서열 모티프 (도메인 I, II, III 및 IV) 및 핵 위치 신호 서열을 갖는다. 도메인 I 및 II는 degradation 도메인으로 옥신신호를 인지하여 AUX/IAA 단백질을 분해하는데 역할을 한다. 도메인 III 및 IV는 단백질-단백질 상호작용을 하는 dimerization 도메인으로 AUX/IAA 단백질과 homodimer 혹은 ARF 단백질과 heterodimer를 형성한다고 알려져 있다. AUX/IAA 단백질은 옥신-반응 유전자의 발현을 조절하는 옥신 반응 인자 (ARFs)의 음성 조절자 (negative regulator)로서 ARF 활성을 억제한다. 옥신이 활성화된 상태에서, AUX/IAA 단백질은 옥신-SCFTIR1 복합체와 함께 상호작용을 통해 유비퀴틴화 되고, 그 후에 프로테아좀 작용에 의해서 분해된다. AUX/IAA 단백질의 역할의 개요 및 활성은 Reed에 의해서 보고되었다 (Trends in Plant Science 6, 420-425, 2001). 벼 (Oryza sativa Aux/IAA 6)에서 초기 옥신-반응 AUX/IAA 유전자

패밀리의 구조 및 발현 분석은 최근에 Jain 등에 의해서 보고되었다(Funct Integr Genomics. 2006 Jan;6(1):47-59). 벼는 총 25개의 ARF 유전자와 31개의 Aux/IAA 유전자가 존재하며 이들의 다양한 결합에 의하여 식물 전반의 발달과정이 옥신에 의하여 조절된다. 가뭄, 염, 저온의 비생물성 스트레스 처리시 발현이 증가하는 OsIAA6 유전자를 분리하고, 상기 유전자의 가뭄 저항성에 대한 기능을 분석하고자 한다.

[4] 한편, 한국등록특허 제0742194호에서는 '환경 스트레스 저항성 조절 유전자를 이용하여 식물체의 환경 스트레스 저항성을 증가시키는 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1427180호에서는 '식물의 가뭄 스트레스 내성을 증가시키는 벼 유래의 OsCTR1 유전자 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 식물의 가뭄 스트레스 내성을 증가시키는 벼 유래의 OsIAA6 유전자 및 이의 용도에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 벼 유래 OsIAA6 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하여 *OsIAA6* 유전자가 과발현되는 벼 형질전환 식물체를 제작하였고, 상기 *OsIAA6* 과발현 형질전환 벼 식물체가 가뭄 스트레스 처리 시 야생형 식물체에 비해 가뭄 스트레스에 대한 내성이 증가된 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[6] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 조절하는 방법을 제공한다.

[7] 또한, 본 발명은 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

[8] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[9] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

발명의 효과

[10] 본 발명에 따르면, 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자가 과발현되는 식물체는 가뭄 스트레스 조건에서 야생형에 비해 스트레스 내성이 증가된다. 따라서, 본 발명의 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자는 가뭄 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 개발에 유용하게 이용될 수 있으므로, 산업적으로 매우

유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[11] 도 1은 벼 식물체에 가뭄, 염 또는 저온의 스트레스 처리 시 *OsIAA6* 유전자의 발현 수준 변화를 확인한 결과이다.

[12] 도 2는 벼의 생장호르몬인 옥신의 아날로그인 NAA(naphthalene-1-acetic acid)을 식물체에 처리하였을 때, *OsIAA6* 유전자의 발현 수준 변화를 확인한 결과이다.

[13] 도 3은 *OsIAA6* 과발현 형질전환 식물체(*PGD1:OsIAA6*)에서의 *OsIAA6* 유전자의 발현 수준 변화를 확인한 결과이다.

[14] 도 4는 *OsIAA6* 과발현 형질전환 식물체(*PGD1:OsIAA6*)와 야생형 식물체의 가뭄 스트레스 저항성을 비교한 결과로, (A) 가뭄 스트레스 처리와 물 재공급(rewatering) 후의 식물체의 모습을 보여주는 사진이며, (B) 가뭄 스트레스 처리에 따른 Fv/Fm 값 변화를 분석한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[15] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 조절하는 방법을 제공한다.

[16] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법은 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 과발현시켜 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.

[17] 본 발명에서 "환경 스트레스"란 식물체의 성장 또는 생산성을 저하시키는 외부적인 요인을 말하며 크게 생물학적 스트레스(biotic stress)와 비생물학적 스트레스(abiotic stress)로 대별된다. 생물학적 스트레스로는 대표적으로 병원균을 들 수 있으며 비생물학적 스트레스로는 고농도의 염, 가뭄(건조), 저온, 고온 및 산화 스트레스 등이 포함된다. "환경 스트레스 내성"이란 상기와 같은 환경 스트레스에 의한 식물체의 성장 저하 또는 생산성의 저하가 억제되거나 지연되는 형질을 말한다.

[18] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 환경 스트레스는 가뭄 스트레스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[19] 본 발명에 따른 OsIAA6 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체의 환경

스트레스 내성을 조절하는 활성을 의미한다.

[20] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 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 세포내 재도입된 것이다.

[21] 본 발명에서, 상기 *OsIAA6* 유전자 서열은 재조합 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다.

[22] 본 발명의 *OsIAA6* 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보좀 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[23] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[24] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin),

하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자, aadA 유전자 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[25] 본 발명의 재조합 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS, 히스톤 프로모터, Clp 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[26] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[27] 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포(예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다.

[28] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[29] 또한, 본 발명은 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[30] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법은 벼 유래 *OsIAA6* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 과발현시켜 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.

[31] 바람직하게는, 상기 *OsIAA6* 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[32] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 환경 스트레스는 가뭄 스트레스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[33] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는

단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefiaciens*)에 의해 매개 될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[34] 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다.

[35] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[36] 바람직하게는, 상기 형질전환 식물체 및 이의 종자는 환경 스트레스에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자이다.

[37] 상기 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갓무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 단자엽 식물이며, 더욱 바람직하게는 벼 식물체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[38] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는, 식물체의 환경 스트레스 내성 조절용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 *OsIAA6* 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하며, 상기 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 환경 스트레스 내성, 바람직하게는 가뭄 스트레스 내성을 증가시킬 수 있는 것이다.

[39] 또한, 본 발명은 식물체의 환경 스트레스 내성을 조절하기 위한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자의 용도를 제공한다. 상기 *OsIAA6* 단백질을 코딩하는 유전자는 바람직하게는 식물체의 가뭄 스트레스 내성을 증가시키는데 이용될 수 있다.

[40]

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

[42]

[43] **재료 및 방법**

[44] **플라스미드 구축 및 벼의 형질전환**

[45] *OsIAA6* (AK068600)와 전장 cDNA는 벼('일미' 품종)에서 추출한 총 RNA를 주형으로 하고, *OsIAA6* 정방향(5'- caccatggaagaagggtccaacaaaa -3'; 서열번호 3) 및 *OsIAA6* 역방향(5'- ttagaccctagcagtagctcca -3'; 서열번호 4) 프라이머를 이용하여

증폭하였다. 증폭된 각각의 전장 cDNA는 게이트웨이 시스템(Invitrogen, 미국)을 이용하여 *PGD1* 프로모터를 가지고 있는 p700 벡터로 삽입하였다. *PGD1:OsIAA6* 벡터는 아그로박테리움 매개 공동 배양 방법(Jang et al., 1999, Mol. Breeding 5:453-461)을 통해 식물체 내로 도입하였다.

[46]

[47] **스트레스 및 옥신 아날로그 (NAA; naphthalene-1-acetic acid) 처리**

[48] 비생물적 스트레스에 대한 반응에 있어서 *OsIAA6* 유전자의 발현 경향을 분석하기 위해서, 비형질전환(NT, '일미' 품종) 벼 식물체를 비닐 하우스 내의 토양에서 4주간 키웠다. 4주령 비형질전환 식물체를 가뭄 스트레스 처리를 위해 식물체 전체를 3시간 동안 공기 건조시켰다. 또한, 염 스트레스를 위해서 식물체 전체를 200mM 염화나트륨 용액으로 옮겨 24시간 두었고, 저온 스트레스의 처리를 위해서는 식물체 전체를 4℃ 저온 챔버에 넣고 24시간 두었다.

[49] 식물체에 옥신 아날로그 처리를 위하여 비형질전환(NT, '일미' 품종) 벼 식물체를 챔버에서 6일 동안 키운 후 식물체를 100uM 농도의 NAA가 들어있는 MS 배지로 옮겨 24시간 처리하였다.

[50]

[51] **실시간 정량적 역전사 중합효소연쇄반응(Real-Time Quantitative RT-PCR)**

[52] 비생물적 스트레스 및 옥신 아날로그(NAA; naphthalene-1-acetic acid) 처리 식물체의 잎 조직을 떼어내어 얼린 후, 얼린 잎 및 뿌리 조직을 액체 질소를 이용하여 분쇄하고 Qiagen RNeasy plant mini kit(Qiagen, 미국)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA의 1㎍을 Superscript II cDNA 합성 키트(Invitrogen, 미국)를 사용한 첫 번째 가닥 cDNA 합성에 사용하였다. 유전자 발현 수준을 분석하기 위해서, Mx3000p 실시간 PCR 장비 및 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG system(Invitrogen, 미국)을 사용하여 정량적 PCR을 수행하였다. 벼의 유비퀴틴 전사체를 표준화 지표로 사용하였고, *OsIAA6* 유전자 특이 프라이머는 3' UTR과 3' 엑손 부위에서 제작하였다. 정량적 RT-PCR 수행을 위해 사용한 프라이머는 하기 표 1과 같다.

[53]

[54] 표 1

[Table 1]

유전자명		염기서열 정보 (5'→3')
OsIAA6	정방향	AGC ACC AGT GGT TGG TTG GCC (서열번호 5)
	역방향	CCC AAC CAG CAT CCT GTC TCC T (서열번호 6)
*OsUbi*1	정방향	ATG GAG CTG CTG CTG TTC TA (서열번호 7)
	역방향	TTC TTC CAT GCT GCT CTA CC (서열번호 8)

[55]

[56] **가뭄 스트레스에 대한 표현형 분석**

[57] *PGD1:OsIAA6* 형질전환 식물체를 비형질전환 식물체와 함께 토양에서 4주 동안 키운 후, 토양으로부터 물을 제거하여 가뭄 스트레스를 처리하였다. 가뭄 스트레스 처리 5일 후에, 물을 재공급하고 *PGD1:OsIAA6* 형질전환 식물체 및 비형질전환 식물체의 가뭄 스트레스에 의한 시각적인 증상을 이미지를 촬영하여 관찰하였다.

[58]

[59] **펄스 진폭 변조(PAM, Pulse-Amplitude Modulation) 실험**

[60] *PGD1:OsIAA6* 형질전환 식물체 3 라인을 비형질전환 식물체와 함께 2주 동안 토양에서 키운 후, 각 식물체로부터 잎을 수집하여 10분 동안 암 순응시켰다. PAM 분석을 위해서, 성장 챔버 내에서 시간 경과 방식으로 가뭄 조건을 처리하고, 각 지시된 시간에 펄스 변조 형광광도계(mini-PAM, Walz, 독일)를 사용하여 잎의 위쪽 표면으로부터 배출되는 엽록소 형광을 감지하여 Fv/Fm 값을 측정하였다. Fv/Fm 값은 광계II의 활성을 나타낸다.

[61]

[62] **실시예 1. 비생물적 스트레스 조건에서 *OsIAA6* 유전자의 발현 경향 분석**

[63] 가뭄 스트레스를 포함한 비생물적 스트레스에 대한 반응으로 *OsIAA6* 유전자의 발현 경향이 어떻게 변화하는지 확인하기 위해서 가뭄, 고염 및 저온 스트레스를 비형질전환 벼에 처리하였다. 그 결과, *OsIAA6* 유전자의 발현은 스트레스 무처리 대조구에 비해 가뭄 스트레스 시 6배, 고염 스트레스 시 4배 및 저온 스트레스 시 2.3배 발현양이 증가된 것을 확인하였다(도 1).

[64]

[65] **실시예 2. 옥신 처리에 의한 *OsIAA6* 유전자의 발현 분석**

[66] 옥신은 식물의 생장 및 발달을 조절하는 식물의 주요 호르몬 중 하나이다. 옥신반응은 식물체 내 옥신의 양을 정확하게 인지하여 신호전달체계를 통하여 ARF유전자의 발현을 조절하는데, Aux/IAA 단백질이 ARF 단백질의 음성적 조절자(negative regulator)로 식물체 내 옥신양에 따른 신호전달체계를 세밀하게 조절한다. 벼에 존재하는 31개의 Aux/IAA 유전자 중 비생물적 스트레스 조건에서 현저하게 증가하는 *OsIAA6* 유전자가 옥신 반응을 하는지 확인하기 위하여 6일 생장시킨 야생형 벼에 옥신 아날로그인 NAA를 100uM로 24시간 동안 처리하였다. 그 결과, *OsIAA6* 유전자는 무처리 대조구에 비해 약 2.7배 발현 증가를 보였다(도 2). 이상의 결과로 벼의 비생물적 스트레스 조건에서 현저히 증가하는 *OsIAA6* 유전자가 옥신반응을 한다는 것을 확인하였다.

[67]

[68] **실시예 3. *OsIAA6* 유전자 과발현에 의한 가뭄 저항성 검증**

[69] 전술한 실시예 1을 통해 가뭄 스트레스 조건에서 *OsIAA6* 유전자가 강하게 발현 유도되는 것을 확인하였다. 이에 *OsIAA6* 유전자의 가뭄 저항성에 대한 잠재적인

기능을 확인하기 위해, *OsIAA6* 과발현 형질전환 벼 식물체를 제작하고, 과발현체에서 *OsIAA6* 유전자의 발현 양상을 확인하였다(도 3). 또한 5 라인의 과발현체를 대상으로 가뭄저항성을 확인하기 위하여 가뭄 스트레스를 처리하였다. 가뭄 스트레스 처리 3일 후, 야생형 비형질전환 식물체는 잎의 말림 및 시들음과 같은 가뭄 유도 손상의 약한 증상들을 보여주었다. 가뭄 스트레스 처리 시간의 증가와 함께, 야생형 비형질전환 식물체의 증상은 심각해졌으며, 가뭄 처리 5일째에 가뭄 유도에 의한 강한 손상 증상을 나타내었다. 비형질전환 식물체의 잎은 모두 말라버렸으며, 물을 재공급하여도 가뭄 스트레스 유도 손상으로부터 식물체는 회복되지 않았다(도 4 A). 하지만, *OsIAA6* 과발현 형질전환 식물체는 가뭄 스트레스에 대한 강한 저항성을 보여주었다. *OsIAA6* 과발현 형질전환 식물체는 가뭄 스트레스 처리 3일 후에도 잎의 손상이 야생형 비형질전환 식물체보다 적었다. 가뭄처리 5일째에는 비형질전환체와 OsIAA6 과발현 형질전환 식물체 모두 가뭄에 의하여 잎의 마름증상이 심하였지만 비형질전환 식물체에 비하여 식물체의 줄기부분이 단단하게 유지가 되고 있으며 더욱이 물 공급을 재개하자 가뭄 스트레스 유도 손상으로부터 회복되었다. 상기의 결과들을 통해 *OsIAA6* 유전자가 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 증진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[70] 가뭄 저항성에 있어서 *OsIAA6*의 기능을 확인하기 위해서, *OsIAA6* 과발현 형질전환 식물체의 독립적인 3개 라인을 사용하여 펄스 증폭 변조(PAM, Pulse-Amplitude Modulation) 시험을 수행하였다. PAM 분석의 Fv/Fm 값은 식물에 있어서 비생물적 스트레스의 영향을 관찰하는데 사용되는데, 가뭄 스트레스 처리에 의해 비형질전환 식물체는 Fv/Fm 값의 강한 감소를 나타내었다. 야생형 비형질전환 식물체에서 스트레스 무처리 시 Fv/Fm 값은 0.8이었으나, 가뭄 스트레스 처리 1시간 이후부터 Fv/Fm 값의 감소를 보이기 시작하였고, 스트레스 처리 시간의 증가와 함께 감소세가 가속화되는 결과를 보여주었다(도 4B, 야생형). 반면에, 비형질전환 식물체와는 달리 *OsIAA6* 과발현 형질전환 식물체들은 가뭄 스트레스에 의한 Fv/Fm 값의 감소가 지연되는 결과를 나타내었다. 3개의 *OsIAA6* 과발현 형질전환 식물체들은 가뭄 스트레스 처리 2시간까지 야생형 비형질전환 식물체보다 높은 값을 유지하였다. 이상의 결과는 *OsIAA6*의 과발현이 가뭄에 대한 식물체의 저항성을 증진시킴을 뒷받침하였다.

청구범위

[청구항 1] 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 조절하는 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 식물세포에서 과발현시켜 식물의 환경 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 OsIAA6 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 환경 스트레스는 가뭄 스트레스인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 5] 벼 유래 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및
상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 OsIAA6(Oryza sativa Aux/IAA 6) 단백질을 코딩하는 유전자를 식물세포에서 과발현시켜 환경 스트레스에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체를 제조하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 OsIAA6 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 환경 스트레스는 가뭄 스트레스인 것을 특징으로 하는 방법.

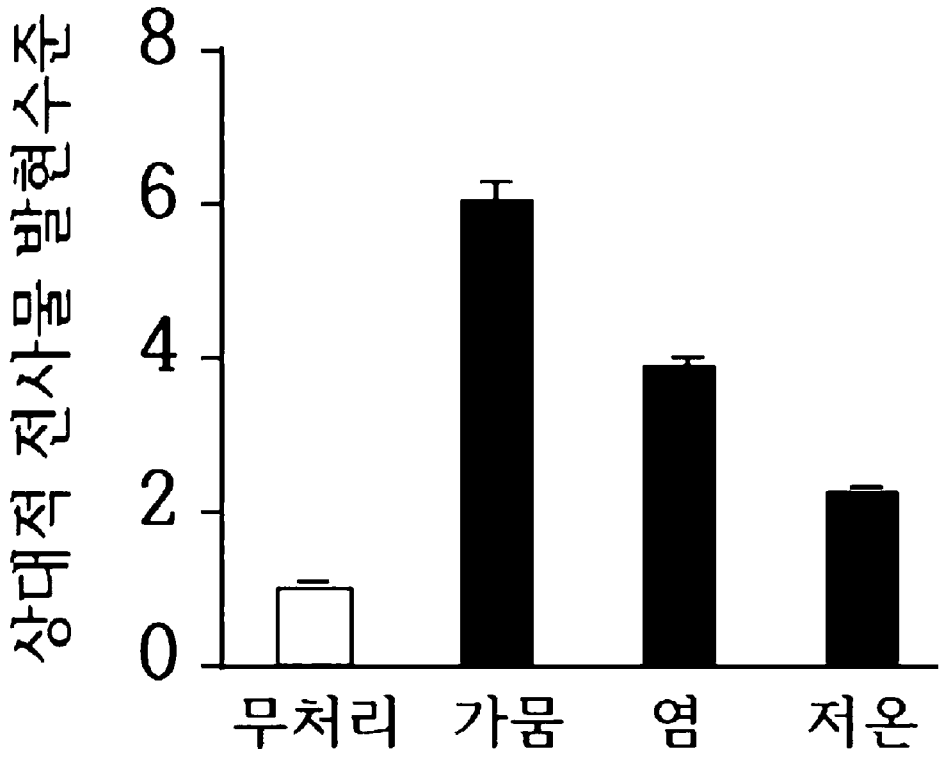
[청구항 9] 제5항의 방법에 의해 제조된 환경 스트레스에 대한 내성이 조절된 형질전환 식물체.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 식물체는 환경 스트레스에 대한 내성이 증가된 것을 특징으로 하는 식물체.

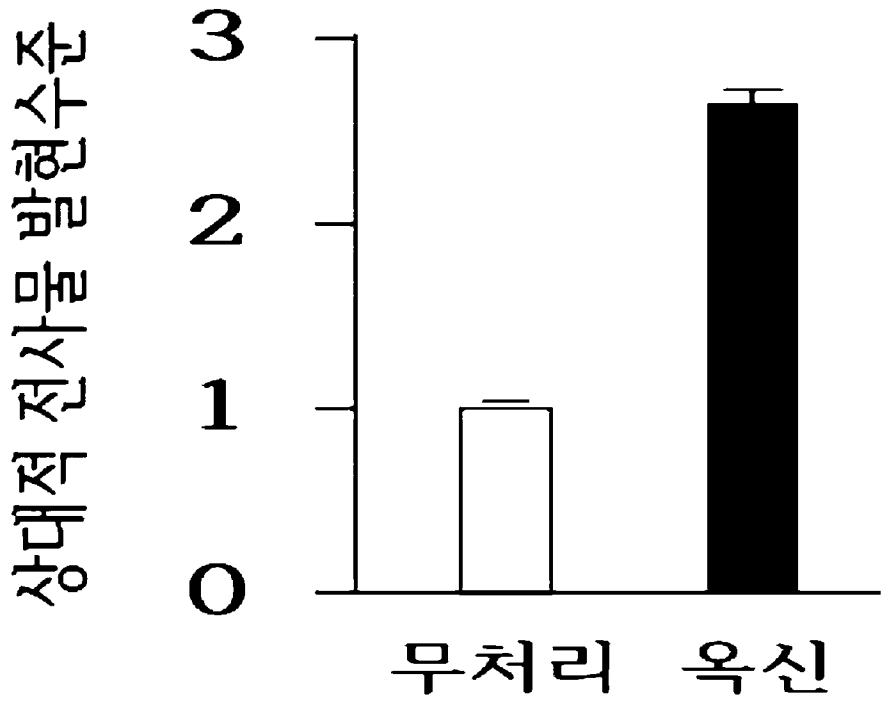
[청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 식물체는 단자엽 또는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

[청구항 12] 제9항에 따른 형질전환 식물체의 형질전환된 종자.

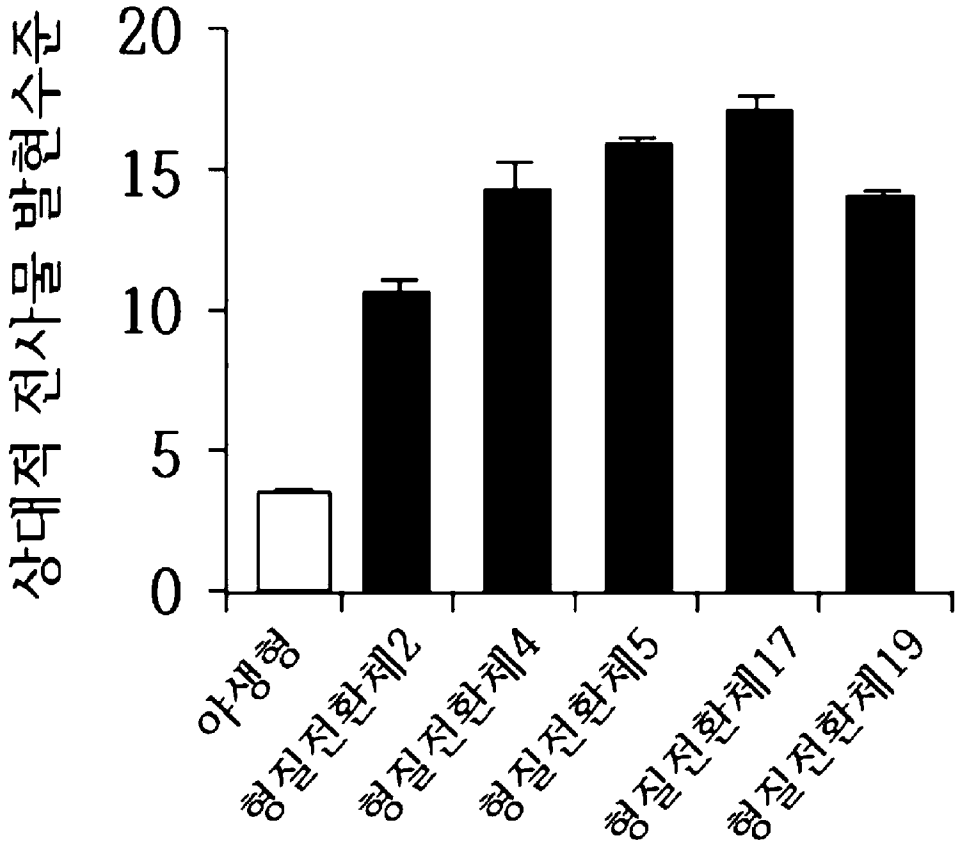
[Fig. 1]



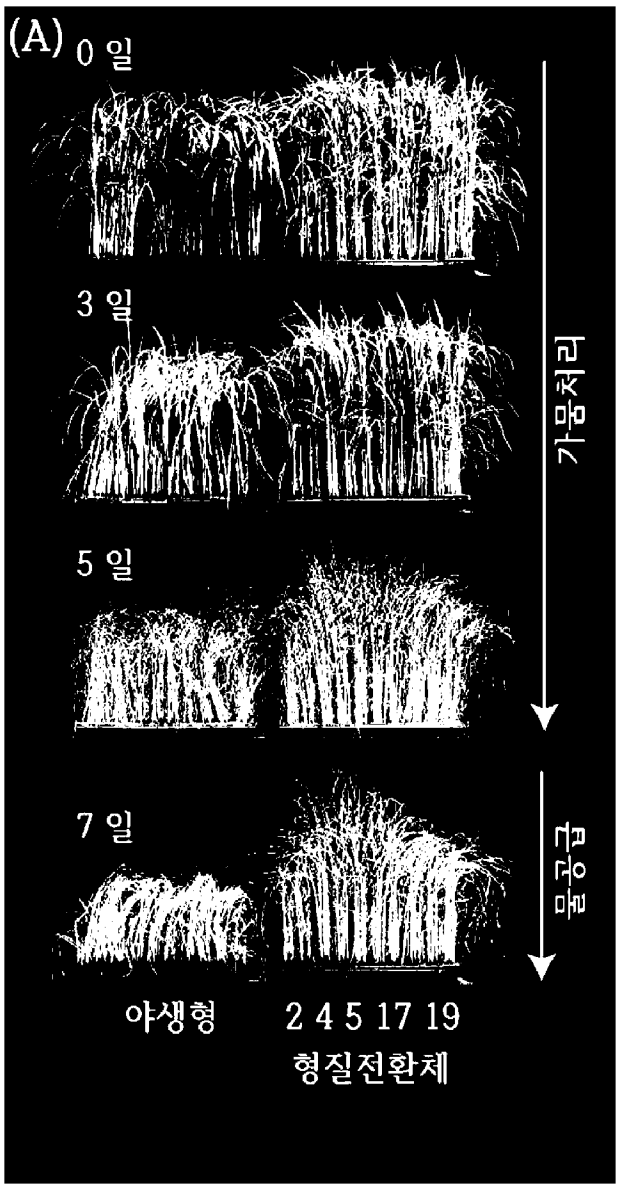
[Fig. 2]

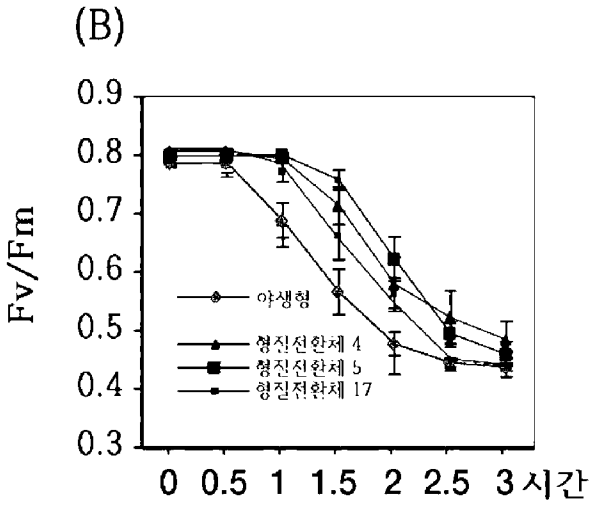


[Fig. 3]


상대적 전사물 발현수준
20
15
10
5
0
야생형
형질전환체2
형질전환체4
형질전환체5
형질전환체17
형질전환체19

[Fig. 4]


(A)
0 일
3 일
5 일
7 일
가뭄처리
물공급
야생형 2 4 5 17 19
형질전환체


(B)
Fv/Fm
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
야생형
형질전환체 4
형질전환체 5
형질전환체 17
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 시간

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/004311

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/82(2006.01)i, C07K 14/415(2006.01)i, A01H 5/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/82; C12N 15/63; C12N 5/10; A01H 1/00; A01H 5/10; C12N 15/85; C07K 14/415; A01H 5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: OsIAA6(Oryza savita AUX/IAA 6), conversion of formation, over-expression, environmental stress, drought stress tolerance, stress resistance

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2012-0034588 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH. et al.) 12 April 2012 See claims 1, 3-4, 8, 11, 18; paragraphs [0161], [0315]-[0317], [0396], [0465]-[0468], [0480]-[0483], [0547]-[0551]; and table 10.	1-12
A	SONG, Yaling et al., "Comprehensive Expression Profiling Analysis of OsIAA Gene Family in Developmental Processes and in Response to Phytohormone and Stress Treatments", Planta, 26 November 2008, vol. 229, pages 577-591 See page 584, left column, line 43-right column, line 16; and page 589, right column, lines 20-32.	1-12
A	SONG, Yaling et al., "Ectopic Overexpression of an AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA) Gene OsIAA4 in Rice Induces Morphological Changes and Reduces Responsiveness to Auxin", International Journal of Molecular Sciences, 28 June 2013, vol. 14, pages 13645-13656 See the entire document.	1-12
A	US 2012-0151629 A1 (MCCAIG, Bonnie C. et al.) 14 June 2012 See the entire document.	1-12
A	US 2012-0115232 A1 (KANEMAKI, Masato et al.) 10 May 2012 See the entire document.	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 DECEMBER 2015 (28.12.2015)	**29 DECEMBER 2015 (29.12.2015)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/004311

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0034588 A	12/04/2012	AR 076483 A1	15/06/2011
		AU 2010-243730 A1	24/11/2011
		CA 2760429 A1	04/11/2010
		CN 102459614 A	16/05/2012
		DE 112010002842 T5	27/09/2012
		EP 2424994 A1	07/03/2012
		EP 2424994 B1	12/08/2015
		KR 10-2015-0046788 A	30/04/2015
		MX 2011011453 A	18/11/2011
		US 2012-0102599 A1	26/04/2012
		WO 2010-124953 A1	04/11/2010
US 2012-0151629 A1	14/06/2012	AR 077965 A1	05/10/2011
		CA 2770572 A1	03/03/2011
		CN 102482682 A	30/05/2012
		DE 112010003389 T5	14/06/2012
		EP 2470661 A1	04/07/2012
		WO 2011-023571 A1	03/03/2011
US 2012-0115232 A1	10/05/2012	JP 05605658 B2	15/10/2014
		WO 2010-125620 A1	04/11/2010

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/004311

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/82(2006.01)i, C07K 14/415(2006.01)i, A01H 5/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/82; C12N 15/63; C12N 5/10; A01H 1/00; A01H 5/10; C12N 15/85; C07K 14/415; A01H 5/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: OsIAA6(Oryza savita AUX/IAA 6), 형질전환, 과발현, 환경 스트레스, 가뭄 스트레스 내성, 스트레스 저항성

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2012-0034588 A (바스트 플랜트 사이언스 게엠베하 등) 2012.04.12 청구항 1, 3-4, 8, 11, 18; 단락 [0161], [0315]-[0317], [0396], [0465]-[0468], [0480]-[0483], [0547]-[0551]; 및 표 10 참조.	1-12
A	SONG, YALING 등, 'Comprehensive expression profiling analysis of OsIAA gene family in developmental processes and in response to phytohormone and stress treatments', Planta, 2008.11.26., 229호, 페이지 577-591 페이지 584, 좌측컬럼, 라인 43- 우측컬럼, 라인 16; 및 페이지 589, 우측컬럼, 라인 20-32 참조.	1-12
A	SONG, YALING 등, 'Ectopic Overexpression of an AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA) Gene OsIAA4 in Rice Induces Morphological Changes and Reduces Responsiveness to Auxin', International Journal of Molecular Sciences, 2013.06.28., 14권, 페이지 13645-13656 전체 문헌 참조.	1-12
A	US 2012-0151629 A1 (MCCAIG, BONNIE C. 등) 2012.06.14 전체 문헌 참조.	1-12
A	US 2012-0115232 A1 (KANEMAKI, MASATO 등) 2012.05.10 전체 문헌 참조.	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2015년 12월 28일 (28.12.2015)	2015년 12월 29일 (29.12.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/004311

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0034588 A	2012/04/12	AR 076483 A1	2011/06/15
		AU 2010-243730 A1	2011/11/24
		CA 2760429 A1	2010/11/04
		CN 102459614 A	2012/05/16
		DE 112010002842 T5	2012/09/27
		EP 2424994 A1	2012/03/07
		EP 2424994 B1	2015/08/12
		KR 10-2015-0046788 A	2015/04/30
		MX 2011011453 A	2011/11/18
		US 2012-0102599 A1	2012/04/26
		WO 2010-124953 A1	2010/11/04
US 2012-0151629 A1	2012/06/14	AR 077965 A1	2011/10/05
		CA 2770572 A1	2011/03/03
		CN 102482682 A	2012/05/30
		DE 112010003389 T5	2012/06/14
		EP 2470661 A1	2012/07/04
		WO 2011-023571 A1	2011/03/03
US 2012-0115232 A1	2012/05/10	JP 05605658 B2	2014/10/15
		WO 2010-125620 A1	2010/11/04