(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0018731
(43) 공개일자 2024년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 1/02* (2006.01)
A01H 6/46 (2018.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12Q 1/6895* (2018.01)
G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8289 (2013.01)
A01H 1/02 (2024.01)
(21) 출원번호 10-2022-0096158
(22) 출원일자 2022년08월02일
심사청구일자 2022년08월02일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정기홍
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 경희대학교
홍우종
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 경희대학교
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

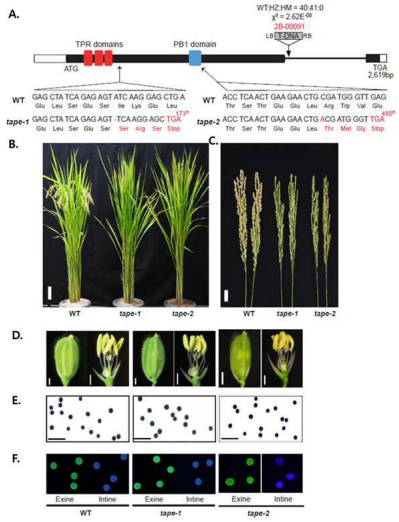
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **Os09g03890 유전자를 이용한 웅성불임 벼의 제조방법, 벼의 웅성불임 유도용 조성물 및 웅성불임 벼**

(57) 요 약

본 발명은 웅성불임 제조방법 및 이로부터 제조된 웅성불임 벼에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 *Os09g03890* 유전자가 돌연변이되어 발현 억제 및 기능이 억제되는 경우, 화분 발아 및 화분관 신장이 감소되어 웅성불임이 야기된다. 따라서 본 발명에 따른 *Os09g03890* 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.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A01H 6/4636 (2022.05)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12Q 1/6895 (2018.05)
G01N 33/56961 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/141 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
(72) 발명자
문선옥
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 경희대학교
김의정
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 경희대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395072806
과제번호 PJ016610022022
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대농작물신육종기술개발
연구과제명 유전자교정 기술을 이용한 벼 변이집단 개발 및 분석 거점 구축(2공동)
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2022.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711162785
과제번호 2021R1C1C2091377
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 벼의 화분관 발달에 관련된 세포소기관 이동 메커니즘 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2021.09.01 ~ 2026.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

벼에서 *Os09g03890* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 단계는 *Os09g03890* 유전자의 일부 염기를 결손 또는 삽입시켜 이루어지는 것인, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

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

청구항 4

제1항에 있어서,

Os09g03890 유전자의 발현이 억제된 벼를 모본으로 하여, 웅성 가임의 벼와 교배시키는 단계;를 더 포함하는 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 *Os09g03890* 유전자의 발현 억제는 *Os09g03890* 유전자의 508번째 위치의 염기를 결손시켜 이루어지는 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 508번째 위치의 염기는 아데닌(A)인 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 508번째 위치의 염기가 결손된 *Os09g03890* 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 *Os09g03890* 유전자의 발현 억제는 *Os09g03890* 유전자의 1429번째 위치에 아데닌(A)을 삽입하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 1429번째 위치에 아데닌(A)이 삽입된 *Os09g03890* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 10

Os09g03890 유전자의 발현이 억제된, 웅성불임 벼.

청구항 11

Os09g03890 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 제제는 *Os09g03890* 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acid) 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물.

청구항 13

Os09g03890 유전자 발현 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법.

청구항 14

Os09g03890 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 제제는 상기 *Os09g03890* 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브인 것인, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물.

청구항 16

제 14항에 있어서,

상기 제제는 상기 *Os09g03890* 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머인 것인, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 *Os09g03890* 유전자를 이용한 웅성불임 벼의 제조방법, 벼의 웅성불임 유도용 조성물 및 웅성불임 벼에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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 타페튬(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 영양세포에서 유래된 극 성장 화분관(pollen tube, PT)을 생산하며 두 개의 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 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 *Os09g03890* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 웅성불임 벼의 제조방법을 제공한다.

[0016] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os09g03890* 유전자의 발현이 억제된, 웅성불임 벼를 제공한다.

[0017] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os09g03890* 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물을 제공한다.

[0018] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os09g03890* 유전자 발현 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법을 제공한다.

[0019] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os09g03890* 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 *Os09g03890* 유전자의 발현 억제 및 기능이 억제된 웅성불임 벼의 제조방법 및 이로부터 제조된 웅성불임 벼에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, *Os09g03890* 유전자의 발현 억제 및 기능이 억제된 벼에서 화분 발아 및 화분관 신장이 감소되어 웅성불임이 야기되는 것을 확인하였다. 본 발명에 따른 *Os09g03890* 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.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 *TAPE*(*Os09g03890*) 유전자 동형접합 돌연변이체(*tape-1* 또는 *tape-2*)의 생성 및 표현형(phenotype)을 분석한 결과로, 도 1(A)는 *TAPE* 유전자 구조 및 동형접합 돌연변이체의 결실 및 삽입 부위를 나타낸 도이며, 검은색과 흰색 영역은 각각 엑손(exon) 및 번역되지 않은 영역(untranslated region)을 나타내고, 회색 상자는 *TAPE*에 삽입된 T-DNA 단편을 나타낸다. X^2 옆의 숫자는 야생형(Wild-type, WT): 이형접합체(heterozygous, HZ): 동형접합체(homozyhous, HM)의 예측 비율(predicted ratio) 1:2:1과 비교한 X^2 테스트 결과의 p값을 의미한다. 더불어 빨간색 문자는 변경된 아미노산과 함께 돌연변이체(*tape-1* 및 *tape-2*)에 대한 염기서열의 결손 또는 삽입을 나타낸다. 도 1(B) 및 도 1(C)는 WT와 돌연변이체(*tape-1* 및 *tape-2*)의 표현형을 나타내는 이미지이며, 도 1(B)의 바(Bar)는 10 cm를 나타내고, 도 1(C)의 바는 2cm를 나타낸다. 도 1(D)는 WT와 돌연변이체(*tape-1* 및 *tape-2*)의 소수(spikelet) 및 꽃 부분(floret)의 형태를 나타낸 이미지이며, 바는 2mm를 나타낸다. 도 1(E) 및 도 1(F)는 화분의 전분 함량(starch content), 엑신 층(exine layer) 및 인틴 층(intine layer)을 확인한 결과로, 도 1(E)는 I_2-KI 용액으로 염색한 결과이고, 도 1(F)는 칼코플루오르 화이트(calcofluor white)로 염색한 결과이다. 도 1(E)에 있어서 바는 200㎛을 나타낸다.

도 2는 야생형 및 돌연변이체의 생체외(In vitro) 및 생체내(In vivo) 화분 발아를 확인한 것으로, 도 2(A) 및 도 2(B)는 WT와 돌연변이체 화분의 생체외 발아를 확인한 결과이다. 바는 200㎛을 나타낸다. 도 2(C) 내지 도 2(E)는 수분(pollination) 2시간 후 생체내 발아를 확인한 결과이다. 바는 200㎛을 나타낸다. 도 2(F) 및 도 2(G)는 WT와 돌연변이체의 완전히 신장된 화분관을 확대한 이미지이다. 바는 200㎛을 나타낸다. 도 2(H)는 상기 도 2(F) 및 도 2(G)에서 확인한 화분관 길이를 정량한 결과이다. 이에 있어, 최소 150개의 화분관의 길이에 대해 정량하였다. ***는 스튜던트 t-검정(student's t-test)에서 계산된 p-값<0.001을 나타낸다.

도 3은 *TAPE* 유전자의 기능적 역할을 확인한 결과로, 도 3(A)는 TAPE 유전자 구조 및 미오신XI(myosinXI) 결합 분석에 사용된 베이트(bait) 영역을 나타낸 도이며, 주황색 점선 영역은 옥수수(*Zea mays* L.)의 상동체(homolog)에 해당하는 베이트 영역을 나타낸다. 도 3(B)는 Y2H(yeast two-hybrid) 분석에 사용된 *TAPE* 베이트의 자가 활성화를 확인한 결과이다. 뮤린(murine) p53을 함유하는 베이트 벡터 및 SV40 큰-T항원(T-antigen)을 갖는 베이트 벡터를 양성대조군으로 사용하였고, 빈 벡터를 음성 대조군으로 사용하였다.

도 4는 TAPE 유전자(*Os09g03890*) 기능 결실 벼(*tape*)의 화분관 발달 기작에 대한 모식도를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명자들은 웅성불임이 유도된 벼를 제조하기 위하여 다양한 연구를 수행하던 중, *Os09g03890*이 화분 발아 및 화분관 신장에 관여하는 유전자임을 확인하고, *Os09g03890* 유전자의 발현을 억제하여 웅성불임 벼를 제조할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0026] 따라서 본 발명은 벼에서 *Os09g03890* 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 "*Os09g03890*"는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 유전자를 의미할 수 있으나, 이와 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

[0029] 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 *Os09g03890*과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 의미할 수 있다. 본 발명에 있어서 상기 *Os09g03890* 유전자는 "*TAPE* 유전자"로 명명될 수 있다.

[0030] 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 *Os09g03890* 유전자의 발현을 억제하여 유도되는 것일 수 있다.

[0031] 본 발명에서 상기 단계는 *Os09g03890* 유전자의 1bp 이상의 일부 염기를 결손 또는 삽입하여 이루어지는 것일 수 있으며, 예를 들어 전장 DNA 중 10%, 구체적으로는 0.01% 이상의 염기를 결손 또는 삽입하여 이루어지는 것일 수 있다. 더불어 상기 단계는 당 분야에 공지된 다양한 유전자 편집 방법에 의해 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 T-DNA 삽입 또는 CRISPR-Cas9에 의한 유전자 편집에 의해 이루어질 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 *Os09g03890* 유전자의 발현 억제는 *Os09g03890* 유전자의 508번째 위치의 염기를 결손시켜 이루어지는 것일 수 있다. 상기 508번째 위치의 염기는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 유전자의 38번째 위치의 ATG(개시코돈)의 A를 첫번째 염기로 하는 것을 특징으로 한다. 상기 508번째 위치의 염기서열은 아데닌(A)일 수 있으며, 상기 508번째 위치의 아데닌(A)이 결손된 *Os09g03890* 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 *Os09g03890* 유전자의 발현 억제는 *Os09g03890* 유전자의 1429번째 위치에 아데닌(A)을 삽입하여 이루어지는 것일 수 있다. 상기 1429번째 위치의 염기는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 유전자의 38번째 위치의 ATG(개시코돈)의 A를 첫번째 염기로 하는 것을 특징으로 한다. 상기 1429번째 위치에 아데닌(A)이 삽입된 *Os09g03890* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0034] 또한 상기 단계는 T-DNA 삽입에 의해 이루어지는 것일 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 *Os09g03890* 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이체를 모본(자성 기증자(female donor)으로 사용하여 웅성가임의 벼와 교배시킨 경우, 정상형의 자손과 이형접합형 자손의 분리 비율이 1 : 1임을 확인하였다. 따라서 *TAPE*가 웅성-배우자 유전자 전달에 필수적임을 확인하였다. 본 발명에서 상기 T-DNA가 *Os09g03890* 유전자에 삽입되는 위치는 특별한 제한이 있는 것은 아니며, 본 발명의 일실시예에서는 *Os09g03890* 유전자의 1번 엑손과 인트론 부위에 삽입되었다. 보다 구체적으로 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 유전자의 38번째 위치의 ATG(개시코돈)의 A를 첫번째 염기로 하여 1890bp 내지 2447bp에 삽입되었다.

[0035] 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.

[0036] 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.

[0037] 더불어 본 방법은 *Os09g03890* 유전자의 발현이 억제된 벼를 모본으로 하여, 웅성 가임의 벼와 교배시키는 단계;를 더 포함할 수 있다. 이와는 반대로 *Os09g03890* 유전자의 발현이 억제된 벼를 부본으로 하여, 야생형 모분과 교배시키는 단계를 추가로 포함하게 되면 웅성불임의 벼를 제조할 수 없다.

[0038] 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.

[0039] 더불어 본 발명은 *Os09g03890* 유전자의 발현이 억제된, 웅성불임 벼를 제공한다.

[0040] 상기 벼는 자포니카(Japonica)형, 인디카(Indica)형 및 자바니카(Javanica)형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며 모든 벼 품종에 적용 가능하다.

[0041] 상기 벼의 웅성불임은 가역적인 것일 수 있다. 즉, 상기 웅성불임의 벼의 임성은 정상적인 *Os09g03890* 유전자의 도입에 의해서 회복될 수 있다.

[0042] 또한 본 발명은 *Os09g03890* 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물을 제공한다.

[0043] 상기 제제는 *Os09g03890* 유전자 또는 mRNA에 직접 또는 간접적으로 결합하여 *Os09g03890*의 발현을 억제할 수 있는 물질을 의미한다.

[0044] 예를 들어 상기 제제는 *Os09g03890* 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, 상기siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acid) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 *Os09g03890* 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하여 *Os09g03890* 단백질 합성을 위한 번역을 억제할 수 있다.

[0045] 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 넉다운 방법이다.

[0046] 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 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, 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.

[0047] 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.

[0048] 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 유전

자 발현을 억제시킨다.

[0049] 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.

[0050] 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.

[0051] 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.

[0052] 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 올리고뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(trans의 cation), 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.

[0053] 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-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.

[0054] 더불어 본 발명은 *Os09g03890* 유전자 발현 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법을 제공한다.

[0055] 상기 *Os09g03890* 유전자 발현 여부를 측정하는 단계에 있어서, 대상 벼의 *Os09g03890* 유전자의 발현 여부를 측정하여 그 발현이 억제된 경우 상기 대상 벼가 웅성불임인 것으로 판정할 수 있다.

[0056] 상기 웅성불임성을 확인하는 방법은 상기 *Os09g03890* 유전자의 mRNA 수준 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하여 이루어지는 것일 수 있다.

[0057] 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

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 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 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.

[0059] 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 블럿팅(Northern blotting), DNA 칩 분석법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은

아니다.

[0060] 상기 단백질의 수준은 별도의 제제를 이용하여 측정할 수 있다. 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 예를 들어 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 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.

[0062] 본 발명에 있어서, 상기 "앱타머"는 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앱타머는 그 염기서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앱타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 앱타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있으나 이들에 한정되지 않는다.

[0063] 상기 단백질의 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블럿(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbentassay), 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.

[0064] 또한 본 발명은 *Os09g03890* 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물을 제공한다.

[0065] 상기 제제는 상기 *Os09g03890* 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 상기 제제는 상기 *Os09g03890* 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 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.

[0070] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0072] **실시예 1. CRISPR/Cas을 사용한 TAPE 유전자(*Os09g03890*) 돌연변이체의 제작**

[0073] **1-1. 식물 및 성장 조건**

[0074] 야생형 벼(Wild-type(WT), (*Oryza sativa* L. spp. *japonica* cv. Dongin과 Hwayoung)와 형질전환 계통을 성장 챔버(growth chamber)에서 28℃/25℃(낮/야간), 16시간/8시간(명(light)/암(dark)) 및 습도 80% 조건으로 2주간 재배한 후 논으로 옮겼다. 분리 분석(segregation analysis) 및 상호 교차(reciprocal crossing)를 위하여 이형 접합체(heterozyhous, HZ) 돌연변이를 사용하였다. 종자를 CO_2 인큐베이터에서 무라시게(Murashige) 및 스쿠그(Skoog) 배지로 2주동안 재배하고 성장 챔버로 옮겼다.

[0076] **1-2. *TAPE* 유전자(*Os09g03890*) T-DNA 삽입 돌연변이체**

[0077] *TAPE*의 T-DNA 돌연변이체(2B-00091; cv. Hwayoung)는 경희대학교 종자은행에서 입수하였다. 상기 T-DNA는 *TAPE* 유전자의 1번 엑손과 인트론 부위에 삽입되었다. 보다 구체적으로 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 유전자의 38번째 위치의 ATG(개시코돈)의 A를 첫번째 염기로 하여 1890bp 내지 2447bp에 삽입되었다.

[0079] **1-3. CRISPR/Cas을 사용한 *TAPE* 유전자(*Os09g03890*) 돌연변이체의 제작**

[0080] T-DNA가 삽입된 돌연변이는 동형접합 자손을 생산할 수 없으므로, T_0 세대에서 CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 동형접합체 돌연변이를 제작하였다. CAFRI-Rice 및 CRISPRdirect 웹 소프트웨어를 사용하여 *TAPE*(*Os09g03890*)의 2개의 KO 돌연변이(*tape-1* 및 *tape-2*)를 생성하기 위한 가이드 RNA(Guide RNA, gRNA)를 설계하였다. gRNA에 해당하는 올리고머(Oligomer)는 어닐링하였고, BsaI 처리된 pRGEB32 이원 벡터(binary vector)(Addgene 플리스미드 번호: 63142)에 연결하였다. 이때 클로닝에 사용한 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0081]

TAPE_sCAS1_F	GGCAGGAGCTATCAGAGAGTATCA	CRISPR/Cas9 (*tape-1*)
TAPE_sCAS1_R	AAACTGATACTCTCTGATAGCTCC	CRISPR/Cas9 (*tape-1*)
TAPE_sCAS2_F	GGCACCTCAACTGAAGAACTGCGA	CRISPR/Cas9 (*tape-2*)
TAPE_sCAS2_R	AAACTCGCAGTTCTTCAGTTGAGG	CRISPR/Cas9 (*tape-2*)

[0082] 안정적인 형질전환을 위하여 공지된 아그로박테리움 매개 공동 배양 방법(Agrobacterium-mediated co-cultivation method)을 이용하여 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*, *A. tumefaciens*) LBA4404로 형질전환시켰다.

[0083] 아그로박테리움 컴피턴트 셀(*Agrobacterium tumefaciens* LB4404) 50㎕와 1㎍의 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.

[0084] 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-아세토시린곤을 포함하는 배지에서 배양하였다.

[0085] 아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 세척한 후 N6D 고체배지 하에서 1차(하이그로마이신(hygromycin) 30 mg/L), 2차 (하이그로마이신 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.

[0086] 재분화된 형질전환 식물체 잎의 DNA를 추출 후, 하기 표 2의 TAPE_Seq_F와 TAPE_Seq_R 프라이머를 이용하여 PCR을 통한 염기서열 증폭한 후 시퀀싱 분석을 통하여 염기서열의 돌연변이가 일어난 식물체를 선발하였다.

표 2

[0087]

TAPE_Seq1_F	GTAATGATGATGCAGTCCTG	Sequencing (*tape-1*)
TAPE_Seq1_R	TTCTGCACATGGTTGTTCCC	Sequencing (*tape-1*)
TAPE_Seq2_F	GAAAGGTATGCCAACGGCAG	Sequencing (*tape-2*)
TAPE_Seq2_R	TTCTTTTCACCGCCATGCCT	Sequencing (*tape-2*)

[0089] **실시예 2. *TAPE* 돌연변이체의 특성 분석 방법**

[0090] **2-1. 식물 표현형(phenotyping) 및 화분 발아(pollen germination) 분석**

[0091] WT와 *tape-1* 및 *tape-2*를 수확하기 전에 COOLPIX P900s 카메라(Nikon, Tokyo, Japan)를 사용하여 사진을 찍었고, 개화 단계(anthesis stage)에서 이들 식물의 소수(spikelet)를 수집하고 SZX61 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 이미지화하였다.

[0092] 화분 형태를 관찰하기 위하여, 화분립(pollen grain)을 핀셋으로 수집한 후 내부 및 외부 세포벽 층에서 전분 함량을 확인하기 위하여 염색하였다. 간략하게, 1% I_2-KI 용액을 이용하여 전분을 염색하고 0.1% 칼코플루오르 화이트(calcofluor white) 및 0.001% 아우로민 O 용액(auromine O solution)을 사용하여 인틴 층(intine layer) 및 엑신 층(extine layer)을 각각 염색하였다.

[0093] 염색된 화분은 브라이트 필드(bright field), 울트라-바이올렛(ulter-violet(UV)) 및 플루오레세인 이소티오사이네이트 채널(fluorescein isothiocyanate channel)이 있는 BX61 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 확인하였다.

[0094] 화분 발아 분석을 통해 열개(dehiscent) 꽃밥(anther)로부터 방출된 화분립을 당 분야에 공지된 방법으로 액체 또는 고체 화분 발아 배지(pollen germination media)를 이용해 수집하였다. ImageJ 소프트웨어를 사용하여 150개 이상의 화분립에 대해 화분관(pollen tube, PT) 길이와 화분 발아율(pollen germination ratio)를 측정하였다. 암술(pistil)에서 PT 신장(elongation)을 관찰하기 위하여 암술을 아닐린 블루 용액(aniline blue solution)을 이용해 염색하였다. 간략하게, 수분(pollination) 2시간 후에 암술을 수집하고 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 K_2HPO_4(pH 8.5)에 포함)로 1시간 동안 암흑에서 염색하였다. 염색된 암술은 UV 채널 아래에서 관찰하였다.

[0096] **2-2. 효모 이중잡종체계(Yeast two-hybrid, Y2H) 분석**

[0097] TAPE 유전자 CDS의 4-561bp, 1252-1488 bp, 및 1726-2619 bp 단편을 증폭하고 EcoRI/BamHI 분해 pGBKT7 벡터로 클로닝하여 GAL4 DNA 결합 도메인 융합 베이트(bait)(각각 Bait A, B 및 C)를 생성하였다. 자가 활성화 테스트(self-activation test)를 위하여, 구조체를 효모 AH109로 형질전환하였다. 상기 베이트-효모 형질전환체(bait-yeast transformants)는 최소한의 SD(synthetic defined) 배지에서 성장하지 않아, 전사 활성제(transcriptional actibator) 기능이 부족함을 확인하였다.

[0098] 베이트 A와 B는 Y2H 스크리닝 분석에 사용하였다. 상기 Y2H 스크리닝 분석은 벼 꽃밥 cDNA 라이브러리를 사용하여 판바이오넷 회사(Panbionet Corp, (Pohang, Republic of Korea))에서 수행하였다.

[0099] TAPE가 미오신XI(myosinXI)에 결합할 수 있는지 확인하기 위하여, 베이트 C를 이용하여 Y2H 분석을 수행하였다. 미오신XI(LOC4330906)의 GTD를 GAL4 활성화 도메인과 융합하였다. SD 배지에는 류신(leucine), 트립토판(tryptophan) 및 히스티딘(histidine)이 결여되어 있으며(SD-LWH), 5mM의 3-AT(3-Amino-1,2,4-triazole)를 포함하는 선택배지(selection media)를 사용하였다.

[0101] **실시예 3. *TAPE* 식별 및 벼 웅성-배우자(male-gamete) 전달(transmission)에 미치는 영향 확인**

[0102] 벼에서 웅성-배우자 유전자 전달과 관련된 유전자를 확인하기 위하여, 공지된 627개의 후기 화분 선호 유전자(late pollen preferred genes)에 대한 대규모 TDNA 돌연변이 스크리닝을 수행했다(Plant Mol. Biol. 2018, 96, 17-34. 참고). 그 결과 동형접합 식물(homozygous plant)이 없는 이형접합 식물(heterozyhous plant (TAPE/*tape*) 및 WT의 1 : 1 분리비율(segregation ratio)를 보이는, 상기 실시예 1-2의 T-DNA 삽입주(2B-00091)을 확인하였다. 이 라인(line)은 3개의 TPR과 PB1 도메인 사이에 위치한 *TAPE*의 1번 엑손과 인트론 부위에 T-DNA를 가지고 있다(도 1A).

[0103] 또한 *TAPE*/*tape* 식물을 사용하여 배우자 전달 결함을 유발하는 성별을 결정하기 위하여 상호 교차 분석(reciprocal crossing analysis)를 수행하고 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0104]

Genotype of parents		Genotype of progenies			Expected ratio	Observed ratio	χ^2 test (1:1:0)
♀	♂	*TAPE/TAPE* (WT)	*TAPE/tape* (+/-)	*tape/tape* (-/-)	WT:(+/-):(-/-)	WT:(+/-):(-/-)	P-value
TAPE/TAPE	*TAPE/tape*	19	0	0	1:1:0	19:0:0	$1.307E^{-05}$
TAPE/tape	*TAPE/TAPE*	28	42	0	1:1:0	2:3:0	0.09

[0105] 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, T-DNA 삽입된 돌연변이 *TAPE/tape* 식물을 부본(웅성 기증자(male donor)로 사용하여 WT와 교배시켰을 때 *TAPE/tape*(이형접합체) 자손(progenies)이 없는 *TAPE/TAPE* 자손(WT)만 발생하는 것을 확인하였다. 대조적으로 *TAPE/tape* 식물을 모본(자성 기증자(female donor)으로 사용한 경우, *TAPE/TAPE*와 *TAPE/tape* 자손의 분리 비율이 거의 1:1이었다.

[0106] 이를 통해 *TAPE*가 웅성-배우자 유전자 전달에 필수적인 유전자임을 확인하였다.

[0108] **실시예 4. *TAPE* 돌연변이의 불임(sterile) 표현형 및 PT 길이 확인**

[0109] T-DNA 인덱싱된 라인(T-DNA indexed line)에서 *TAPE*의 동형접합 돌연변이를 얻을 수 없었기 때문에, 표현형을 조사하기 위해 CRISPR/cas9 시스템을 사용하여 두 개의 독립적인 동형 접합 돌연변이(*tape-1* 또는 *tape-2*라 명시)를 생성하였다(도 1A 참고).

[0110] 상기 독립적인 동형 접합 돌연변이에서 불임 표현형을 관찰하여 도 1B 및 도 1C에 나타내었다. 일부 종류의 불임 표현형은 꽃밥의 발달 결함과 화분 성숙 과정의 결함으로 인해 발생한다고 알려져 있으므로, 성숙 단계에서 꽃밥과 화분의 형태와 내부 특징을 확인하여 도 1D 내지 도 1F에 나타내었다.

[0111] 도 1D에 나타낸 바와 같이, WT와 돌연변이체인 *tape-1* 및 *tape-2*의 꽃밥은 정상적으로 발달되어 노란색을 나타냈으므로, 꽃밥에 결함이 일어나지 않았음을 확인하였다.

[0112] 더불어 화분의 전분 축적과 벽 형성을 확인하기 위해, 전분을 염색하고 인틴(intine) 및 엑신(exine) 층을 염색하여 도 1E 및 도 1F에 나타내었다.

[0113] 그 결과, *TAPE* 돌연변이체인 *tape-1*과 *tape-2*의 불임 표현형은 성숙기에 있는 꽃밥과 화분의 결함으로 인한 것이 아님을 확인하였다.

[0114] 또한 화분 발아 분석(pollen germination assay)을 수행하여 WT와 *tape-1* 사이의 PT 표현형을 확인하였다. 그 결과 *tape-1*은 짧은 PT를 가짐을 확인하였다(도 2A 및 도 2B). 수정 2시간후 WT, *tape-1* 및 *tape-2*의 암술을 이용한 생체내 발아 분석에서도 *tape-1* 및 *tape-2*의 짧은 PT가 관찰되었다(도 2C 내지 도 2E).

[0115] *tape-1* 및 *tape-2*의 PT는 암술머리(stigma)에 부착 및 발아되었지만 WT와는 달리 암술대(style)의 전송 트랙(transmitting track)에는 도달하지 못했다. WT와 *tape-1*의 PT를 확대한 결과, *tape-1*의 PT에 짧지만 손상되지 않은 화분관이 있음을 확인하였다(도 2F 및 도 2G 참고). WT와 *tape-1* 간의 PT 길이를 정량 비교하였다. 그 결과, WT와 *tape-1* 간에 PT 길이에 통계적으로 유의한 차이가 있음을 확인하였다(도 2H 참고).

[0117] **실시예 4. *TAPE* 유전자의 기능적 역할 확인**

[0118] 한편, 옥수수(Zea mays L.)에서 미오신XI 모터 단백질인 Opaque1이 *TAPE* 상동체 중 하나인 ZmHIP에 결합하는 것으로 보고된 바 있다. 이를 기반으로 벼의 Opaque1과 가장 가까운 상동체인 미오신XI의 GTD와 TAPE간의 결합을 확인하였다. *TAPE*의 C-말단으로 구성된 베이트(도 3A 참고)를 사용하여 Y2H 분석을 수행하였다. 그 결과, 베이트는 자체 활성화 효과를 나타내지 않았으나(도 3B), 선택 배지에서 미오신XI의 GTD와의 상호 작용을 확인하였다(도 3C).

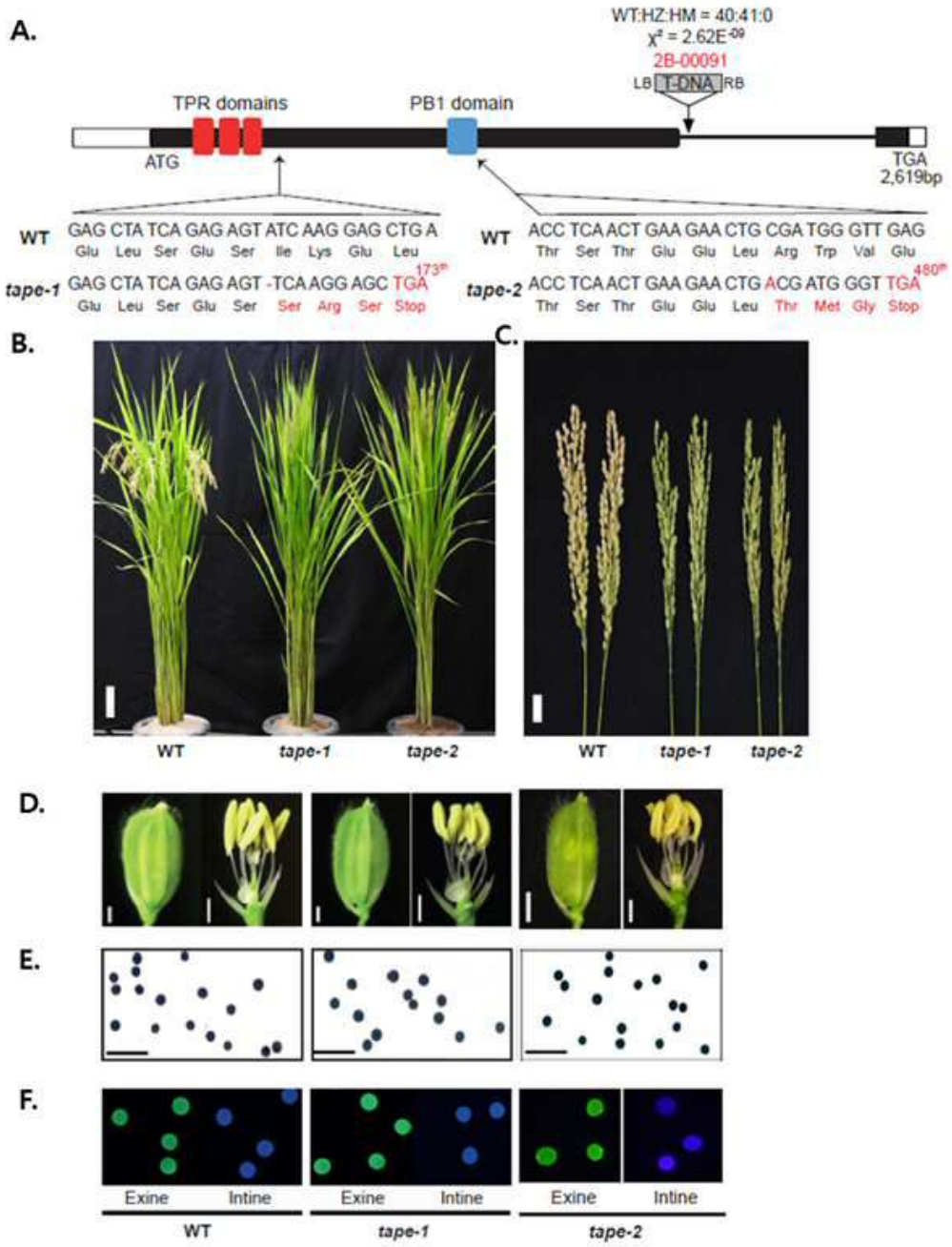
[0119] 상기에서 확인한 바를 기반으로 한 *TAPE* 유전자(*Os09g03890*) 기능 결실 벼(*tape*)의 화분관 발달 기작에 대한 모식도를 도 4에 나타내었다.

[0120] 본 발명에 따르면 *TAPE*는 마이오신 XI의 결합단백질로서 화분관 발달과정에서 소포체와 결합단백질의 정상적인 수송을 매개하는 것으로 확인되었다.

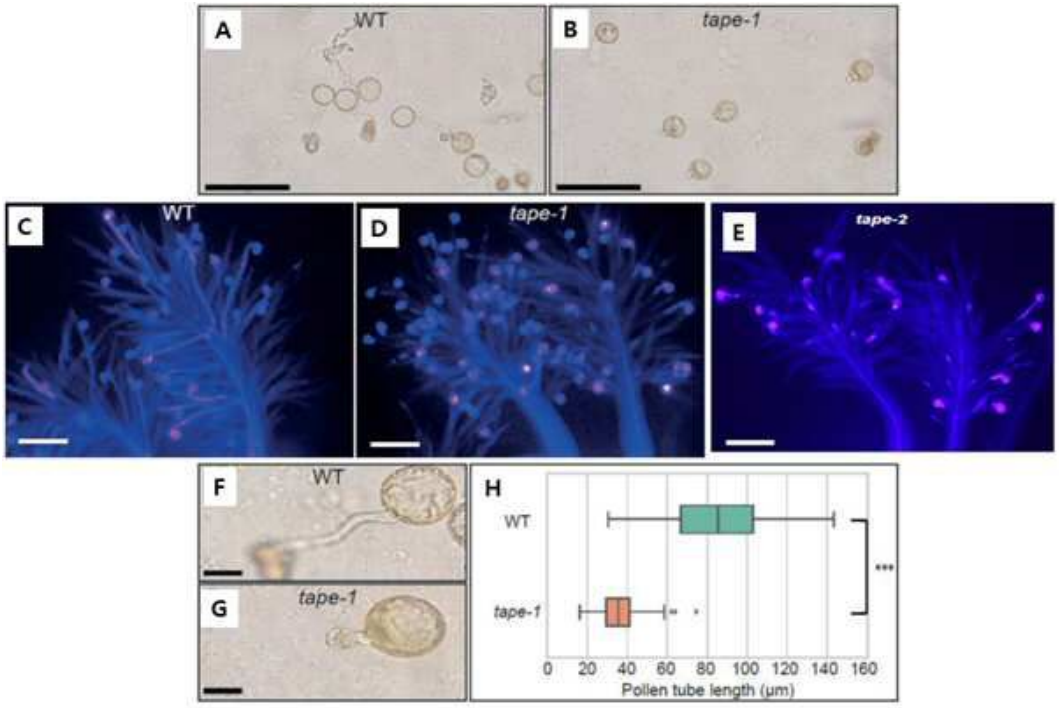
[0122] 종합적으로 본 발명은 *TAPE* 유전자(*Os09g03890*) 기능을 결실시킨 벼의 웅성불임 동형접합 돌연변이체를 제조하였으며, 이를 통해 상기 *TAPE* 유전자의 발현 및/또는 기능이 억제되는 경우, 화분관 발아 및 신장이 감소되어 웅성불임이 야기되는 것을 확인하였다.

도면

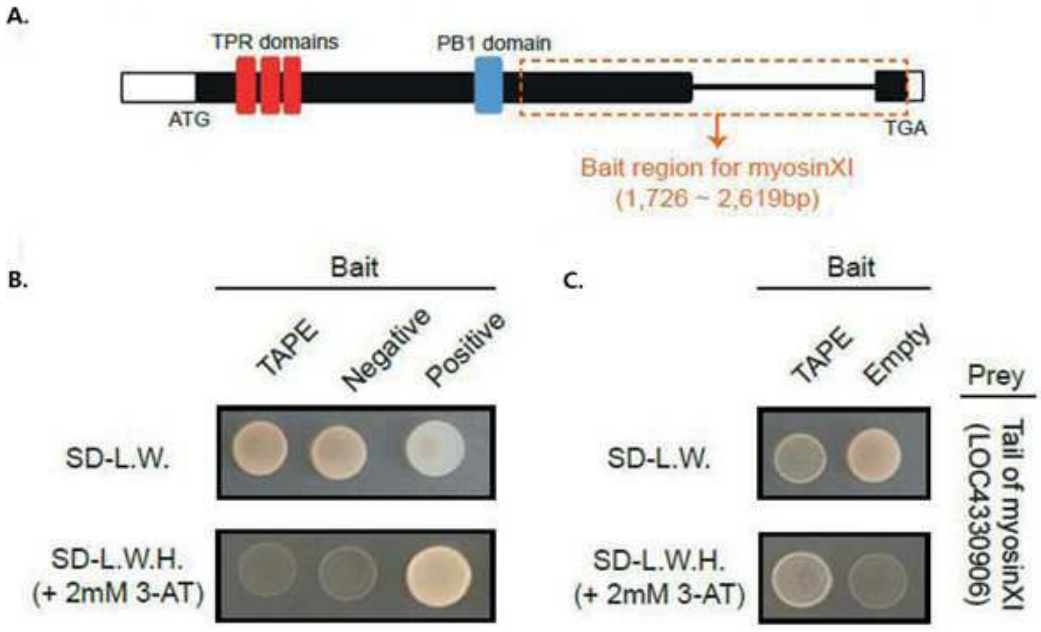
도면1



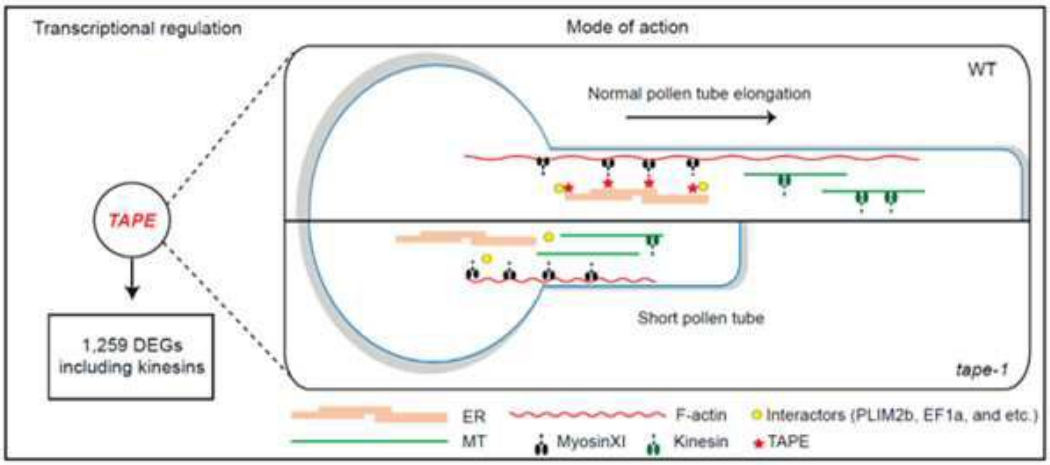
도면2


A
WT
B
tape-1
C
WT
D
tape-1
E
tape-2
F
WT
G
tape-1
H
WT
tape-1
0 20 40 60 80 100 120 140 160
Pollen tube length (μm)
***

도면3


A.
TPR domains
PB1 domain
ATG
TGA
Bait region for myosinXI
(1,726 ~ 2,619bp)
B.
Bait
TAPE
Negative
Positive
SD-L.W.
SD-L.W.H.
(+ 2mM 3-AT)
C.
Bait
TAPE
Empty
Prey
Tail of myosinXI
(LOC4330906)
SD-L.W.
SD-L.W.H.
(+ 2mM 3-AT)

도면4


Transcriptional regulation
Mode of action
WT
Normal pollen tube elongation
TAPE
1,259 DEGs
including kinesins
Short pollen tube
tape-1
ER
MT
F-actin
MyosinXI
Interactors (PLIM2b, EF1a, and etc.)
Kinesin
TAPE

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.