(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 3 월 20 일 (20.03.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/042335 A1

(51) 국제특허분류:
A01N 63/00 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
A01G 7/06 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/004183

(22) 국제출원일: 2013 년 5 월 10 일 (10.05.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0101641 2012 년 9 월 13 일 (13.09.2012) KR

(71) 출원인: **포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION)** [KR/KR]; 790-784 경상북도 포항시 남구 효자동 산 31 포항공과대학교내, Gyeongsangbuk-do (KR).

(72) 발명자: **황일두 (HWANG, Il Doo)**; 790-751 경상북도 포항시 남구 지곡로 155 교수아파트 8 동 502 호, Gyeongsangbuk-do (KR). **류호진 (RYU, Ho Jin)**; 376-873 충청북도 보은군 산외면 백석 1 구 456-3, Chungcheongbuk-do (KR). **배원실 (BAE, Won Sil)**; 790-751 경상북도 포항시 남구 지곡로 102 낙원아파트 5 동 203 호, Gyeongsangbuk-do (KR).

(74) 대리인: **특허법인 이룸 (ERUUM PATENT LAW FIRM)**; 135-851 서울시 강남구 대치동 1005-8 보성빌딩 5 층, Seoul (KR).

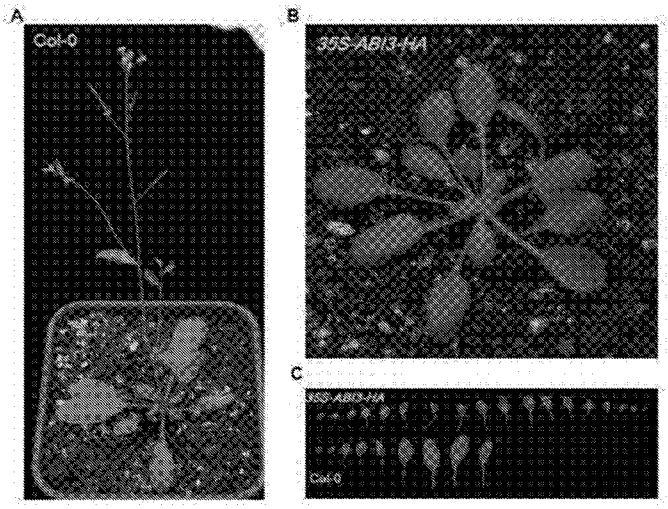
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, 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, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: COMPOSITION COMPRISING GENE CODING FOR ABI3 PROTEIN FOR CONTROLLING FLOWERING OF PLANTS

(54) **발명의 명칭** : ＡＢＩ３단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 개화 조절용 조성물



(57) **Abstract**: A composition comprising an ABI3 gene of the present invention and a method for delaying the flowering of plants using the composition have a strong effect on delaying the flowering of plants. In the previously known method for delaying the flowering of plants, since flowering is delayed by silencing the expression of a gene for promoting flowering, it is difficult to control the degree of delay in flowering. Also, since a gene silencing method such as RNAi is used, it is not easy to produce an actual transgenic plant and thus it is difficult to use for industry. However, the ABI3 gene of the present invention acts in a manner which delays flowering when expression increases, and thus it is easy to control the degree of delay in flowering and to produce a transgenic plant. Thus, it is expected that the present invention can be effectively applied to increase the productivity of crops by delaying flowering time or blocking flowering in plants of which vegetative tissue or leaves are used.

(57) **요약서**:

[다음 쪽 계속]

WO 2014/042335 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명의 *ABI3* 유전자를 포함하는 조성물 및 이를 이용하여 식물의 개화를 지연시키는 방법은 강력한 식물의 개화 지연 효과를 가진다. 기존에 밝혀진 개화 지연 방법의 경우 개화를 촉진하는 유전자의 발현을 침묵시켜 개화를 지연시키는 방식으로 작용하므로 개화 지연 정도의 조절이 어려웠으며, RNAi 등 유전자 침묵 방법을 이용해야 하므로 실제 형질전환 식물을 생산하는 것이 쉽지 않아 산업에 이용하기 힘들었다. 그러나 본 발명의 *ABI3* 유전자는 발현을 증가시키는 경우에 개화를 지연시키는 방식으로 작용하므로 개화 지연 정도 조절 및 형질전환 식물 생산이 용이하다. 따라서 영양조직이나 잎을 이용하는 식물들에서 개화시기를 늦추거나 개화가 일어나지 않게 하여 농작물의 생산성을 증가시키는 데 중요하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: ＡＢＩ 3 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 개화 조절용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 ABI3 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 개화 조절용 조성물 및 이를 이용하여 식물체의 개화를 지연 또는 억제시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 식물의 개화는 영양생장에서 생식생장으로의 변화의 기점이 되는 과정으로서 농업적으로 많은 중요성을 지닌다. 식물의 잎이 식용으로 이용되는 엽채류의 경우 (예: 깻잎, 상추 등과 같은 채소류) 개화가 일어나게 되면 더 이상 영양생장이 일어나지 못하고 모든 에너지가 열매를 맺는 과정에 집중되기 때문에 농가에서는 인위적인 일장조건 및 환경변화를 통해 개화를 늦추는 작업에 많은 노동력을 투자해야 한다. 또한 뿌리 및 줄기에 축적되는 영양조직을 이용하는 작물의 경우에도 (예: 감자, 마늘, 양파, 고구마, 무 등) 개화가 일어나게 되면 더 이상 뿌리조직으로의 양분저장이 일어나지 않게 된다. 따라서 이러한 식물들에서 개화시기를 늦추거나 개화가 일어나지 않게 할 수 있다면 농가의 노동력을 절감시킬 수 있을 것이고, 식물의 영양생장기간이 증가되어 농작물 수확량을 증가시킬 수 있을 것이다.

[3] 식물의 개화는 다양한 신호전달이 모여 이뤄지는 아주 복잡한 식물의 발달 프로그램이다. 이러한 신호에는 빛, 수분, 온도, 그리고 식물호르몬에 의해 조절되는 것이 최근 알려져 있다. 식물호르몬 지베렐린의 개화 촉진 효과에 대해서 잘 알려져 있으며, 최근 브라시노스테로이드 역시 개화를 촉진하는 것으로 보고된 바 있다(Domagalska et al., 2010, Plos one, 5:11 1-8). 반면 ABA(Abscisic acid, 앱시스산)는 이들 두 호르몬과 상보적인 역할을 수행하여 개화를 지연시키는 것으로 보고되었다(Domagalska et al., 2010, Plos one, 5:11 1-8). ABA는 식물이 스트레스상황에서 이들을 극복하기 위해 필요로 하는 많은 반응들을 매개하는 호르몬으로 알려져 있다. 이러한 ABA의 개화 지연 효과는 스트레스 상황에서 식물이 개화를 하지 않는 특성과 잘 일치하는 부분이다. 하지만 이들 호르몬의 신호전달이 어떻게 개화를 조절하는지에 대한 분자수준에서의 연구는 거의 전무한 상태이다.

[4] 최근 모델식물 애기장대를 이용한 분자유전학 발전을 통해 개화에 관여하는 많은 유전자들이 동정되었다. 하지만 대부분 유전자의 발현이 침묵되었을 경우 개화를 지연시킬 수 있는 개화의 양성적 조절인자들이다. 예를 들면 미국특허 제6,225,530호에는 애기장대로부터 분리한 식물의 개화시기 조절 유전자 *FT* (flowering locus T), 상기 *FT*에 의해 코딩되는 폴리펩티드 및 FT 유전자를

이용하여 식물의 개화시기를 조절하는 방법이 개시되어 있다. FT는 florigen으로도 알려져 있다. 다양한 개화조절요인들이 복합한 상호작용을 통해 FT의 발현을 조절하게 되는데, 빛, 온도, 광주기 등과 같은 외부 신호와, 영양 상태, 호르몬 등과 같은 내부 신호가 개화에 관여하며, 개화 경로는 크게 광주기 경로, 춘화 경로, 지베렐린 (GA, gibberellin) 경로, 내재적 경로로 나누어진다. *FT*의 발현이 증가되게 되면 개화가 촉진되게 되고, *FT*의 발현이 억제되면 개화의 시기가 지연되는 현상이 일어나게 된다. 따라서 *FT*를 이용하여 개화시기를 지연시키기 위해서는 RNAi기술이나 microRNA기술을 이용하여 유전자의 침묵을 일으켜야 하는데, 이러한 기술들은 식물내에 존재하는 비슷한 유전정보를 지니는 다른 유전자들도 함께 침묵시킬 수 있는 부작용이 있을 수 있다는 큰 단점이 있어 실제 적용이 쉽지 않은 상황이다.

[5] 본 발명자들은 애기장대로부터 개화시기 조절 메커니즘과 관련이 있는 유전자를 연구하던 중, ***AB A I*** *nsensitive 3 (ABI3)* 유전자가 애기장대 식물체에 과발현 되었을 경우 식물의 개화를 지연시키는 효과가 있다는 것을 발견하였다. 또한 *ABI3* 과발현시 브라시노스테로이드 신호전달 강화에 의한 개화 촉진효과도 극복할 수 있다는 것을 발견하였다.

[6] *ABI3* 유전자는 식물의 종자가 발아를 억제하는 ABA 신호전달을 양성적으로 조절하는 것으로 기존 연구에서 보고되어진바 있다 (Giraudat et al., 1992, Plant Cell, 4:1251-1261). *ABI3*는 종자발아에서 ABA신호를 매개하는 양성적 조절 전사인자 *ABI5*의 전사를 직접적으로 유도하는 것으로 알려져 있다 (Lopez-Molina et al., 2002, Plant journal, 32: 317-328). 하지만 본 발명에서 발견한 개화지연효과는 지금까지 발견되지 않은 *ABI3* 유전자의 새로운 효과이다.

[7] 따라서 본 발명자들은 *ABI3* 유전자를 포함하는 조성물 및 이를 이용하여 개화를 지연시키는 방법 등에 관한 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, ABI3 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 식물체의 개화 지연 또는 개화 억제용 조성물 및 이를 이용하여 식물체에서 *ABI3* 유전자를 과발현시켜 식물체의 개화를 지연 또는 억제시키는 방법 등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다. 또한 본 발명은 *ABI3* 유전자를 과발현시키거나 발현을 억제시킨 형질전환 식물체 또는 식물세포를 이용하여 개화시기 조절 유전자 또는 단백질을 선별하는 방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[9] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[10] 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함하는, 식물체의 개화 지연 또는 개화 억제용 조성물을 제공한다. 여기서 서열번호 3의 아미노산 서열은 ABI3 단백질을 구성한다.

[11] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 염기 서열은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기 서열인 것을 특징으로 한다. 서열번호 1은 *ABI3* 유전자의 gDNA sequence이고, 서열번호 2는 *ABI3* 유전자의 cDNA sequence이다. 한편, 코돈의 축퇴성으로 인해, 염기서열에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 따라서 본 발명에서 이용되는 염기서열은 첨부한 서열목록에 기재된 서열번호 1, 2의 염기서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.

[12] 상기에서 "개화 지연"이란 온도, 낮과 밤의 길이 등 재배 조건이 동일한 경우에 있어서 야생형 식물체의 개화 시기보다 늦은 경우를 의미한다.

[13] 또한 본 발명은 ABI3 단백질을 코딩하는 염기 서열이 삽입된 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 개화 지연 또는 개화 억제용 조성물을 제공한다. 이와 같은 식물체, 식물의 일부 또는 식물 세포의 형질전환에 사용되는 벡터의 종류에는 특별한 제한이 없고, 식물의 형질전환에 통상적으로 사용되는 벡터를 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로 pCB302ES, pGA1611 류의 벡터를 사용할 수 있다.

[14] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 재조합벡터는 ABI3 단백질을 코딩하는 염기 서열이 식물에서 작용가능한 강프로모터 및/또는 인핸서와 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 한다. 그러나 *ABI3* 유전자 발현을 촉진할 수 있는 서열의 종류는 이에 한정되지 않으며, 그 외 연결된 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있는 리더 서열, 전사 개시 서열, 전사종결 서열, 복제 개시점, 리보솜 결합 부위 등을 모두 포함할 수 있다.

[15] 상기 "작동 가능하게 삽입한다"는 것은 어떤 유전자의 전사 및/또는 번역이 영향을 받도록 삽입한다는 것을 의미한다. 예컨대 어떠한 프로모터가 그와 함께 삽입된 유전자의 전사에 영향을 준다면 그 유전자는 작동 가능하게 삽입된 것이다.

[16] 프로모터 서열은 유도성 프로모터(inducible promoter sequence)와 구조성 프로모터(constitutive promoter sequence) 모두 사용가능하다. 구조성 프로모터로는 예컨대 CaMV 프로모터, CsVMV 프로모터, Nos 프로모터 등을 들 수 있고, 유도성 프로모터(유도 인자의 존재로 인하여 그에 연결된 유전자의 발현이 활발해지는 것을 가능하게 하는 프로모터)로서는, 예컨대, 구리 이온에 의해 활성화되는 효모 메탈로티오네인 프로모터(Mett 등, Proc.Natl. Acad. Sci., U.S.A., 90:4567, 1993), 치환 벤젠설폰아미드에 의해 활성화되는 In2-1 및 In2-2 프로모터(Hershey 등, Plant Mol. Biol., 17:679, 1991), 글루코코르티코이드에 의해 조절되는 GRE 조절 서열(Schena 등, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 88:10421, 1991), 에탄올 조절성 프로모터(Caddick 등, Nature Biotech., 16:177, 1998), 리뷸로스 비스-포스페이트 카르복실라제(ssRUBISCO)의 소 서브유니트에서

유래한 광조절성 프로모터(Coruzzi 등, EMBO J., 3:1671, 1984; Broglie 등, Science, 224:838, 1984), 만노핀 신타제 프로모터(Velten 등, EMBO J., 3:2723, 1984), 노팔린 신타제(NOS) 및 옥토핀 신타제(OCS) 프로모터, 열 충격 프로모터(Gurley 등, Mol. Cell. Biol., 6:559, 1986; Severin 등, Plant Mol. Biol., 15:827, 1990) 등을 들 수 있다. 그러나 프로모터의 종류는 이에 한정되지 않는다.

[17] 한편, 상기 재조합 벡터는 선별 마커 유전자를 추가적으로 포함할 수 있다. 여기서 "마커 유전자"란 그러한 마커 유전자를 포함하는 형질전환체의 선별을 가능하게 하는 형질을 암호화하는 유전자를 의미한다. 마커 유전자는 항생물질 내성 유전자일 수 있고 제초제 내성 유전자일 수도 있다. 적합한 선별 마커유전자의 예로는 아데노신 데아미나제의 유전자, 디히드로폴레이트 리덕타제의 유전자, 하이그로마이신-B-포스포트랜스퍼라제의 유전자, 티미딘 키나제의 유전자, 크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제의 유전자, 포스핀노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자 등을 들 수 있다. 그러나 선별 유전자 마커의 종류는 이에 한정되지 않는다.

[18] 또한 본 발명은 상기 조성물로 형질전환된 식물체를 제공한다. 구체적으로 상기 식물체에는 경작지 등의 잡초 식물류, 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류, 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용작물류, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튤립을 포함하는 화훼류, 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스 등을 포함하는 사료작물류 등을 들 수 있으나, 식물의 종류는 이에 한정되지 않는다.

[19] 본 발명의 조성물을 과채류나 화훼류 식물체의 개화를 시장 상황 및 기상 상황 등에 맞추어 지연 조절하는 데 이용할 수 있다. 예를 들어 곡류의 경우에는 파종 후 개화시기까지의 발달시간을 기준으로 하여 조생종, 중생종 및 만생종(late variety)의 세 가지 품종으로 나뉘어지는데, 조생종 품종의 경우에는 식물이 성숙할 수 있는 기간이 짧아 수확량이 적으나, 일찍 수확 또는 출하할 수 있는 이점이 있고 만생종 품종의 경우에는 그 반대의 이점이 있으므로, 본 발명의 조성물을 이용하여 조생종을 출하할 것인지 만생종을 출하할 것인지 여부를 결정할 수 있다.

[20] 본 발명의 조성물을 가장 일반적으로 적용시킬 수 있는 식물체는 개화가 일어나면 잎, 줄기가 급속하게 노화되어 시장 가치가 크게 떨어지는경엽채류 채소, 또는 개화가 일어나면 영양조직인 비늘이나 뿌리 등의 생장이 급격히 감소하는 인경채류 및 근채류 채소이다. 경엽채류 채소로는 깻잎, 상추, 배추, 양배추, 청경채, 시금치, 쑥갓, 갓, 미나리, 파슬리, 치커리, 셀러리, 열무, 파, 죽순 및 아스파라거스 등이 될 수 있다. 인경채류 채소로는 마늘 또는 양파가 있다.

근채류 채소에는 무, 당근, 우엉, 고구마, 마, 및 감자 등이 있다.

[21] 본 발명은

[22] (A) 상기 조성물로 식물체를 형질전환시키는 단계; 및

[23] (B) 상기 형질전환된 식물체가 *ABI3* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는, 식물체의 개화를 지연시키거나 억제시키는 방법을 제공한다.

[24] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은 개화 지연 표현형이 유발된 식물체를 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[25] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (A)단계는 ABI3 단백질을 코딩하는 염기서열을 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계, 이러한 재조합 발현벡터를 아그로박테리움 박테리아에 형질전환시키는 단계, 및 이러한 형질전환된 아그로박테리움 박테리아로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[26] 또한 본 발명은 *ABI3* 유전자를 과발현시키거나 발현을 억제시킨 형질전환 식물체 또는 식물세포를 이용하여 개화시기 조절 유전자 또는 단백질을 선별하는 방법을 제공한다.

[27] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은 *ABI3* 유전자를 과발현시키거나 발현을 억제시킨 형질전환 식물체 또는 식물세포에 후보물질을 처리한 다음 *ABI3* 유전자의 활성 또는 발현에 미치는 영향을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[28] 본 발명의 *ABI3* 유전자를 포함하는 조성물 및 이를 이용하여 식물의 개화를 지연시키는 방법은 강력한 식물의 개화 지연 효과를 가진다. 기존에 밝혀진 개화 지연 방법의 경우 개화를 촉진하는 유전자의 발현을 침묵시켜 개화를 지연시키는 방식으로 작용하므로 개화 지연 정도의 조절이 어려웠으며, RNAi 등 유전자 침묵 방법을 이용해야 하므로 실제 형질전환 식물을 생산하는 것이 쉽지 않아 산업에 이용하기 힘들었다. 그러나 본 발명의 *ABI3* 유전자는 발현을 증가시키는 경우에 개화를 지연시키는 방식으로 작용하므로 개화 지연 정도 조절 및 형질전환 식물 생산이 용이하다.

도면의 간단한 설명

[29] 도 1A 및 도 1B는 각각 야생형 컬럼비아 애기장대(Col-0)와 *ABI3*를 과발현시킨 애기장대를 32일간 키운 후 대표적인 성장 정도를 보인 1개체를 선발하여 개화가 일어난 상태를 촬영한 사진이다. 도 1C는 도 1A, 도 1B의 식물에 개화가 일어나기까지 나온 잎을 분리하여 촬영한 사진이다.

[30] 도 2는 야생형 애기장대와 *ABI3* 과발현 애기장대를 각 100개체씩 키워서 측정한 통계 결과로서, 도 2A는 개화시기를 측정한 것이고, 도 2B는 개화에 필요한 잎 수를 나타낸 것이다.

[31] 도 3은 *bes1-D* 돌연변이 애기장대가 야생형인 En-2보다 개화가 빨리 일어나고 개화시까지 나온 잎의 수가 더 적음을 나타낸 도이다. 하지만 또 다른

브라시노스테로이드 촉진 돌연변이체인 *bzr1-1D*의 경우는 개화가 지연되고 있음을 나타내는 도이다. En-2, Col-0 품종은 각각 bes1-D와 bzr1-1D의 대조군으로 사용하였다.

[32] 도 4A 및 도 4B는 *bes1-D* 돌연변이 애기장대에 *ABI3, ABI5* 유전자를 각각 도입한 경우 각 단백질의 발현량을 western blotting으로 확인한 도이다. *ABI3* 발현량은 4 개체, *ABI15* 발현량은 총 5 개체 중 2 개체에서높게 나타나 이를 도면에 표시하였다.

[33] 도 5는 *bes1-D* 식물체, *bes1-D ABI5* 식물체, *bes1-D ABI3* 식물체에서 발아 후 25 일째에 개화가 일어났는지 여부를 촬영한 도이다. 도 4에서 *ABI5* 발현이 높은 것으로 확인한 식물체를 사용하였다.

[34] 도 6은 *bes1-D ABI3* 식물체가 *bes1-D* 돌연변이로 인해 개화시기가 빨라진 현상을 극복한 것을 나타낸 그래프이다. 도 4에서 *ABI5* 발현이 높은 것으로 확인한 식물체를 사용하였다.

[35] 도 7은 *bes1-D ABI3* 식물체가 *bes1-D* 돌연변이로 인해 개화시까지 나온 잎의 수가 적어진 현상을 극복한 것을 나타낸 도이다. 도 4에서 *ABI5* 발현이 높은 것으로 확인한 식물체를 사용하였다.

[36] 도 8은 *ABI3*를 과발현시킨 식물체를 45일간 생육시킨 후 노화지연 여부를 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[37] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[38]

[39] **실시예 1. 실험 재료 및 실험방법**

[40] **1-1. 식물재료 및 성장 조건**

[41] 본 발명에 사용된 모든 애기장대 야생형 품종은 컬럼비아(Col-0)와 En-2 품종이다.

[42] 본 발명에서 사용된 BES1 유전자에 돌연변이가 생겨 브라시노스테로이드 신호전달이 촉진되어 있는 식물체인 *bes1-D*(Yin et al., 2002. Cell. 109: 181-191)는 서울대학교 생명과학부 최성화 교수 연구실로부터 분양을 받았다. 이 *bes1-D* 품종이 En-2 품종을 background로 하고 있기 때문에, *bes1-D* 품종을 사용한 실시예에서는 En-2 품종을 대조군으로 하였다.

[43] *ABI3*와 *ABI5* 유전자가 과발현된 애기장대식물은 H. Sommer가 이전에 기술한 방법을 통해 얻었다(Masiero, S. et al., 2004. Development 131: 5981-5990). 간단히 이 형질전환식물체 제작방법을 설명하면, *ABI3*와 *ABI5* 유전자를 포함하는 식물형질전환용 vector (pCB302ES)를 아그로박테리움에 주입한 후 OD600: 0.7 Abs 까지 키운 후 애기장대 꽃에 이 아그로박테리움을 감염시키는 방법을

사용하였다 (Floral dip methods).

[44] 식물은 장일 (LD) 조건 [16/8시간 (light/dark)- 빛은 120 μmol m-2s-1 강도로 제공]으로 23℃온도에서 토양에서 성장시켰다.

[45]

[46] **1-2. 개화시기 측정 방법**

[47] 식물의 개화 시기는 적어도 15개의 식물들에서 꽃이 형성된 시점(화아 분화가 일어난 시점)까지 1차 잎의 평균 갯수 및 소요된 날짜로써 표시하였다.

[48]

[49] **1-3. *ABI3* DNA**

[50] 기존의 실험들에서는 *ABI3*의 cDNA (*cABI3*)를 이용하여 과발현 식물체를 제작하였는데, 본 발명에서는 *ABI3* 유전자의 인트론이 포함되어 있는 genomic DNA (*gABI3*)를 사용하였다. 즉 본 발명에서 사용된 gABI3를 이용하여 과발현 형질전환 식물체를 제작했을 경우 개화가 늦어지는 표현형이 나타나는 것을 의미한다.

[51] 본 발명을 위해 gDNA를 사용한 이유는 다음과 같다. 다세포 진핵생물의 유전자는 인트론과 실제 단백질을 코팅하는 엑손으로 이뤄져 있는데, splicing과정에서 여러 가지 환경 및 변화에 따라 인트론의 일부가 엑손에 첨부되는 alternative splicing 과정을 통해 같은 loci에서 유전자가 발현이 되더라도 단백질의 아미노산 구성에 차이가 나타나는 여러 가지 형태의 유전자가 발현되는 것으로 알려져 있다. 따라서 gDNA를 과발현 시키게 되면 식물의 발달과정에서 특이적으로 나타나는 모든 형태의 alternative 유전자들의 발현을 예상할 수 있기 때문에 유전자의 특성을 연구하는데 더욱 정확한 정보를 제공할 것으로 예상하였다.

[52]

[53] **<u>실시예 2. ABI3 과발현 애기장대와 야생형 애기장대의 개화시기 비교</u>**

[54] **2-1. 생육 32일째에 개화여부 및 개화에 필요한 잎 수 확인**

[55] *ABI3* 유전자를 과발현시킨 애기장대와 야생형 애기장대를 각각 100개체씩 생육시켜 32일 후에 확인하였다.

[56]

[57] **(1) 개화여부 확인**

[58] 도 1A는 야생형 컬럼비아 애기장대(Col-0)를 실시예 1-3의 조건 하에서 32일간 키웠을 경우 대표적인 성장 정도를 보인 1개체를 선발하여 개화가 일어난 상태를 촬영한 사진이다. 도 1B는 도 1A와 같은 조건에서 32일간 키운 *ABI3* 유전자 과발현 애기장대(*35S-ABI3-HA*) 중 대표적인 성장 정도를 보인 1개체를 선발하여 촬영한 사진이다. 도 1B에 나타난 바와 같이, *ABI3* 과발현 애기장대는 야생형 애기장대에 비해 개화가 상당히 지연되었으며, 이와 같이 32일이 지나도록 꽃이 피지 않은 형질전환체는 전체의 12% (100개체 중 12개)로 나타났다. 이러한 12%의 개체는 60일이 지나도록 꽃이 피지 않았다.

[59]

[60] **(2) 잎 수 확인**

[61] 도 1C는 도 1A의 식물체와 도 1B의 식물체의 잎을 발생한 순서대로 배열하여 촬영한 사진이다. 도 1C에 나타난 바와 같이, 야생형 애기장대의 경우 꽃이 필 때까지 형성된 잎은 9장이지만, *ABI3* 과발현 애기장대는 잎이 18장이 형성되었을 때 (파종 후 32일까지 형성한 잎의 수)도 개화가 유도되지 않았다.

[62]

[63] **2-2. 개화시기 및 개화에 필요한 잎 수 비교**

[64] **(1) 개화시기 확인**

[65] 야생형 애기장대와 *ABI3* 과발현 애기장대를 각 100개체씩 키워서 개화시기를 측정하였다. 결과는 도 2A에 나타내었다. 도 2A에 나타난 바와 같이, 야생형 애기장대가 꽃이 피는데 걸린 시간은 20일 : 14개체, 21일 : 24개체, 22일 : 52개체, 23일 : 10개체, 24일 : 5개체로 측정되었다. 반면에 ABI3 유전자 과발현 애기장대의 경우는 20일 : 1개체, 21일 : 5개체, 22일 : 14개체, 23일 : 26개체, 24일 : 16개체, 25일 : 9개체, 26일 : 6개체, 27일 : 11개체로 나타났고, 12개체의 경우 꽃이 피지 않고 계속 잎을 형성시키는 영양생장기간이 지속 되는 것을 확인하였다.

[66]

[67] **(2) 잎 수 확인**

[68] 또한 개화에 필요한 잎의 수도 측정하였다. 결과는 도 2B에 나타내었다. 도 2B에 나타난 바와 같이, 야생형 애기장대의 경우 개화시 잎의 수는 9장 : 41개체, 10장 : 49개체, 11장 : 6개체, 12장 : 4개체로 측정되었다. 반면에 *ABI3* 유전자 과발현 애기장대의 경우는 잎의 수 10장 : 2개체, 11장 : 7개체, 12장 : 33개체, 13장 : 21개체, 14장 : 22개체, 15장 : 3개체로 측정되었다.

[69] 실시예 2-1, 2-2의 결과로부터, *ABI3* 유전자가 과발현된 경우 야생형에 비하여 개화 시기가 지연되며 개화시까지 나온 잎의 수가 현저히 증가됨을 알 수 있었다.

[70]

[71] **<u>실시예 3. *ABI3* 발현이 브라시노스테로이드 신호전달의 효과를 상쇄하는지 여부 확인</u>**

[72] 브라시노스테로이드 신호전달이 촉진되어 있는 돌연변이체인 *bes1-D*에서는 개화가 촉진된다. 도 3은 *bes1-D* 돌연변이 애기장대가 야생형 En-2보다 개화가 빨리 일어나고 개화시까지 나온 잎의 수가 더 적음을 보여주고 있다. 한편 *bzr1-D*는 BES1 유전자와 매우 유사한 유전자 BZR1의 돌연변이체로 *bes1-D*와 마찬가지로 브라시노스테로이드 신호전달이 촉진된 식물체이다. 그러나 *bes1-D* 만이 개화가 촉진되고, *bzr1-D*는 개화가 지연되는 것을 도 3에서 확인할 수 있다.

[73] 따라서 *bes1-D* 돌연변이 애기장대에 *ABI3* 유전자를 과발현시키는 경우 개화촉진 효과를 상쇄할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 하기의 실험을

수행하였다.

[74]

[75] **3-1. *ABI3* 유전자, *ABI5* 유전자를 과발현시킨 *bes1-D* 돌연변이 애기장대의 준비**

[76] **(1) 형질전환 애기장대 식물체에서 ABI3 발현 분석**

[77] *ABI5*는 *ABI3*유전자에 의해 직접적으로 발현이 유도되는 유전자이다. *ABI3*의 종자발아억제 효과는 *ABI5*의 발현을 유도하면서 일어나는 현상이라고 알려져 있으므로, *ABI3*에 의해 개화가 지연되는 이유가 *ABI5*의 발현이 증가되어 일어나는지 여부를 확인해보기 위해 *ABI5*를 과발현시킨 경우도 함께 확인하였다.

[78] *bes1-D* 식물체에 *ABI3* 유전자 및 *ABI5* 유전자를 도입한 후 발현을 확인하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.

[79] 10개의 아미노산으로 구성된 HA(Hemagglutinin) epitope tag을 *ABI3* 또는 *ABI5* 유전자의 C-말단 부위에 결합시켜 *bes1-D* 식물체에 도입하였다. 식물체에서 단백질의 발현량은 anti-HA monoclonal antibody (Roche)를 이용하여 western-blotting 을 통해 확인하였다. 비슷한 양의 단백질 추출액을 실험에 이용한 것을 확인하기 위해 Actin 단백질 발현량을 control로 사용하였다. 이 때 control로 사용한 Actin 단백질의 발현량은 anti-actin monoclonal antibody (MP Biomedical)를 이용하여 확인하였다.

[80] 도면상에서, *bes1-D* 식물체에 *AB13-HA*를 도입한 식물체는 *bes1-D 35S-ABI3-HA*로 표기하였고, *AB15-HA*를 도입한 식물체는 *bes1-D 35S-ABI5-HA*로 표기하였다.

[81] #는 식물체의 라인을 의미한다. 여기서 라인은 각각 독립적인 형질전환 식물체를 뜻한다. 동일한 형질전환용 벡터를 사용하는 경우에도 식물의 유전체속에 과발현시키고자 하는 유전자가 무작위로 끼어들어가게 된다. 따라서 각각의 독립적인 형질전환식물체는 식물의 유전체에서 유전자가 삽입된 위치가 달라져 유전자의 발현량이 서로 달라지게 된다. 따라서 적어도 2개이상의 독립적인 형질전환 식물체를 확보하여 비교를 함으로써 그 유전자의 기능을 확인하고자 한 것이다.

[82] 도 4A에 ABI3의 단백질 발현량이 많은 4개의 라인을 표시하였다.

[83] 도 4B에 ABI5 단백질이 발현량이 많은 라인들을 표시하였다. 그 중 #12와 #18에서 ABI5 단백질이 발현이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

[84]

[85] **3-2. *bes1-D* 애기장대, *bes1-D ABI3* 애기장대, *bes1-D ABI5* 애기장대의 개화 비교**

[86] **(1) 발아 후 25일 째 비교**

[87] 실시예 3-1에서 ABI3 단백질 발현량이 많은 4개체(#3, #4, #5, #6) 및 ABI5 단백질 발현량이 가장 많은 #12의 식물체를 이용하여 하기의 실험을

수행하였다.

[88] 발아 후 25일째에 *bes1-D, bes1-D ABI5,* 그리고 *bes1-D ABI3* 애기장대를 관찰하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, *bes1-D*와 *bes1-D ABI5*식물체에서는 개화가 일어났지만, *bes1-D ABI3*식물체의 경우는 모두 개화가 일어나지 않았다. 특히 ABI3 가 가장 많이 발현된 애기장대 5번 식물체(#5)의 경우 개화가 일어나지 않고 지속적으로 영양생장이 일어났다(도5). 이로부터 *ABI3*에 의해 종자발아 억제가 일어날 때와 달리, 개화 지연에는 *ABI5*가 관여하지 않는 것을 알수 있었다.

[89]

[90] **(2) 개화시기 비교**

[91] 도 5의 결과에 대한 통계적인 결과를 얻기 위해 *bes1-D* 돌연변이체 , *bes1-D* ABI5 그리고 *bes1-D ABI3* 형질전환 애기장대 homozygote 식물체를 흙에 심은 후 발아에서 개화까지 걸리는 시간을 측정하였다. 도4에서 선발된 각 독립적인 형질전환 식물체 (외래단백질의 발현이 강하게 나타난 형질전환 식물체) 모두를 실험에 이용하였다 (통계처리를 위해 사용된 각 독립적인 형질전환 식물체의 개수는 14개 이다).

[92] 도 6과 7에서 나타난 바와 같이, *bes1-D* 돌연변이에 의한 개화촉진효과가 *ABI3* 과발현에 의해서만 상쇄되었을 뿐, *ABI5*의 과발현은 *bes1-D*의 개화촉진효과를 상쇄시키지 못하였다. 이러한 결과는 *ABI3*만이 식물의 개화를 지연시킬 수 있는 효과를 보일 수 있음을 의미한다.

[93]

[94] **(3) 개화에 필요한 잎 수 비교**

[95] *bes1-D, bes1-D ABI5* 그리고 *bes1-D ABI3* 애기장대를 각각 14개체를 파종하여 개화시까지 나온 잎의 수를 관찰하였다. 결과는 총 14개체의 평균값으로 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, *bes1-D* 돌연변이에 의해 적은 수의 잎이 나온 상태에서 개화가 이루어졌으나, 이 효과는 *ABI3* 과발현에 의해 상쇄되었다.

[96]

[97] **실시예 4. *ABI3* 과발현 돌연변이체의 노화지연 확인**

[98] 식물이 개화가 진행되게 되면 영양생장기간을 멈추고 생식생장기간을 통해 노화가 진행되게 된다. 따라서 *ABI3* 과발현에 의해 개화가 지연되는 경우 영양생장기간이 연장되어 식물의 노화가 지연된다는 것을 확인하였다.

[99] *ABI3*를 과발현시킨 식물체를 45일간 생육시킨 후 노화지연 여부를 확인하였다. 도 8에서 *ABI3*를 과발현시킨 식물체(총 4개의 선발된 형질전환 식물체 중 *ABI3*유전자가 가장 많이 발현된 #5 과 #6을 이용함)가 *bes1-D* 식물체보다 노화가 지연된 것을 알 수 있다.

[100]

[101] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지

않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 잇을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

산업상 이용가능성

[102] 영양조직이나 잎을 이용하는 식물들에서 개화시기를 늦추거나 개화가 일어나지 않게 하여 농작물의 생산성을 증가시키는 데 중요하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

서열목록 Free Text

[103] <110> POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION

[104]

[105] <120> Composition for controlling flowering time comprising gene

[106] encoding ABI3 protein

[107]

[108] <130> PCT01743

[109]

[110] <150> KR 10-2012-0101641

[111] <151> 2012-09-13

[112]

[113] <160> 3

[114]

[115] <170> KopatentIn 2.0

[116]

[117] <210> 1

[118] <211> 2870

[119] <212> DNA

[120] <213> Artificial Sequence

[121]

[122] <220>

[123] <223> ABI3 gDNA

[124]

[125]

[126] <400> 1

[127] atgaaaagct tgcatgtggc ggccaacgcc ggagatctgg ctgaggattg tggaatactc 60

[128]

[129] ggtggagacg ctgatgatac tgttttgatg gatggaattg atgaagttgg tagagagatc 120

[130]

[131] tggttagatg accatggagg agataataat catgttcatg gtcatcaaga tgatgatttg 180

[132]

[133] attgttcatc atgacccttc aatcttctat ggagatctcc caacgcttcc tgatttccca 240

[134]

[135] tgcatgtcgt cttcatcatc gtcttcaaca tctccagctc ctgtcaacgc aatcgtctcc 300

[136]

[137] tcagcctctt cttcttcggc agcttcttcc tccacttcct cagctgcttc ttgggctata 360

[138]

[139] ttgagatcag atggagaaga tccgactcca aaccaaaacc aatacgcatc aggaaactgt 420

[140]

[141] gacgactctt ctggtgcatt gcaatccaca gcttccatgg agattccatt agacagcagt 480

[142]

[143] caaggttttg gttgcggcga aggcggtggt gattgcattg atatgatgga gactttcggg 540

[144]

[145] tacatggatc tacttgatag caacgagttc tttgacacct cagctatatt tagccaagac 600

[146]

[147] gacgacacgc aaaaccctaa cttgatggac caaacccttg agagacaaga agaccaggtc 660

[148]

[149] gttgttccga tgatggagaa taacagtggt ggagacatgc aaatgatgaa ttcttccttg 720

[150]

[151] gaacaggacg atgatctcgc tgctgtgttt ttggagtggc taaagaacaa caaggagact 780

[152]

[153] gtgtcggctg aggatttgag gaaagtaaag ataaagaaag ctacgattga atcagcggca 840

[154]

[155] agaagactag gcggtggtaa agaagcgatg aagcagcttt taaagctgat tcttgaatgg 900

[156]

[157] gtccaaacta atcacttaca aagaagacgc accaccacca ccaccaccaa cctctcttat 960

[158]

[159] caacaatcat tccaacaaga tccatttcaa aaccctaacc ctaataacaa caacctaatc 1020

[160]

[161] ccaccgtccg accaaacctg tttctcacct tcaacatggg ttcctccacc accacaacaa 1080

[162]

[163] caagcttttg tctcggaccc gggttttgga tacatgcctg ctccaaacta tccgccacag 1140

[164]

[165] ccagagttcc ttcctttact tgaatctcca ccgtcatggc caccaccacc acagtctggt 1200

[166]

[167] cccatgccac atcaacaatt ccccatgccg ccaacctcgc agtataatca atttggagat 1260

[168]

[169] ccaacaggtt tcaatggata caacatgaat ccgtaccaat atccttatgt tcctgcagga 1320

[170]

[171] caaatgagag atcagagatt actccgtttg tgttcctcag caactaaaga ggcaagaaag 1380

[172]

[173] aaacggatgg cgagacagag gaggttcttg tctcatcacc acagacataa caacaacaac 1440

[174]

[175] aacaacaaca acaataatca gcagaaccaa acccaaatcg gagaaacctg tgccgcggtg 1500

[176]

[177] gctccacaac ttaaccccgt ggccacaacc gccacgggag ggacctggat gtattggcct 1560

[178]

[179] aatgtcccgg cagtgccgcc tcaattaccg ccagtgatgg agactcagtt acctaccatg 1620

[180]

[181] gaccgagctg gctcagcttc tgctatgcca cgtcagcagg tggtaccaga tcgccggcag 1680

[182]

[183] gtagacatgc acaatcatct ttctcattgt ttattcttta atttagcaat actcgaatag 1740

[184]

[185] tttgtgtaat tgcaccactc gtttggtttg atgaagaagc taaagatttt acatgtgttt 1800

[186]

[187] tttttgataa aatgtgaatc ggaagattat acatttgcaa tggaaatgaa atgattttga 1860

[188]

[189] tctttttggt ttgattttag ggatggaaac cagaaaagaa tttgcggttt ctcttgcaga 1920

[190]

[191] aagtcttgaa gcaaagcgac gtgggtaacc tcggaaggat cgttttgcca aaagtaattt 1980

[192]

[193] ttcttctaat ttcttgtagc ctttgctttc cattttctaa aaaaggttca atgtttgtgt 2040

[194]

[195] aaaaatattg tcaagttttt attttatttt tactcttatt ggttaagtta tattttactg 2100

[196]

[197] aatttttatt ttttttagaa agaagctgag acacacttgc cggagctaga ggcaagagac 2160

[198]

[199] ggcatctctc tggccatgga agacatcgga acctctcgtg tttggaacat gcgctacagg 2220

[200]

[201] taactgatta tgatgctaac atgttaacat tgattctttt tataaaaaca attcgtgtat 2280

[202]

[203] tttgtcaaaa attggaactc gaccaaaatg ttttttcggt tatttaattg tcttcttaaa 2340

[204]

[205] ttggttttgc aggttttggc ctaacaacaa aagcaggatg tatctcctcg agaacaccgg 2400

[206]

[207] tacgtttttg aaaatgtacc cgttaataat tttcctttct tttggtttgt ttgttctctt 2460

[208]

[209] gtaattattg ttgtggacgc atacatatct aattttcctt gaaattacgt ttacaggcga 2520

[210]

[211] ttttgtgaaa accaatgggc tccaagaagg tgatttcata gtcatatact ccgacgtcaa 2580

[212]

[213] atgtggcaaa tatgtaagag aagcatcaca atatttttct atacttttca ttagtattta 2640

[214]

[215] actctcatca ttacttttgt tggtatttat cttgtcataa ttaattgaga ataatattat 2700

[216]

[217] gacagttgat acgaggggtt aaagtaagac aaccgagcgg acaaaagccg gaggccccac 2760

[218]

[219] cgtcgtcagc agctacgaag agacaaaaca agtcgcaaag gaacataaac aataactctc 2820

[220]

[221] cgtcggcgaa tgtggtggtc gcttcaccaa cttctcaaac tgttaaatga 2870

[222]

[223]

[224] <210> 2

[225] <211> 2163

[226] <212> DNA

[227] <213> Artificial Sequence

[228]

[229] <220>

[230] <223> ABI3 cDNA

[231]

[232]

[233] <400> 2

[234] atgaaaagct tgcatgtggc ggccaacgcc ggagatctgg ctgaggattg tggaatactc 60

[235]

[236] ggtggagacg ctgatgatac tgttttgatg gatggaattg atgaagttgg tagagagatc 120

[237]

[238] tggttagatg accatggagg agataataat catgttcatg gtcatcaaga tgatgatttg 180

[239]

[240] attgttcatc atgacccttc aatcttctat ggagatctcc caacgcttcc tgatttccca 240

[241]

[242] tgcatgtcgt cttcatcatc gtcttcaaca tctccagctc ctgtcaacgc aatcgtctcc 300

[243]

[244] tcagcctctt cttcttcggc agcttcttcc tccacttcct cagctgcttc ttgggctata 360

[245]

[246] ttgagatcag atggagaaga tccgactcca aaccaaaacc aatacgcatc aggaaactgt 420

[247]

[248] gacgactctt ctggtgcatt gcaatccaca gcttccatgg agattccatt agacagcagt 480

[249]

[250] caaggttttg gttgcggcga aggcggtggt gattgcattg atatgatgga gactttcggg 540

[251]

[252] tacatggatc tacttgatag caacgagttc tttgacacct cagctatatt tagccaagac 600

[253]

[254] gacgacacgc aaaaccctaa cttgatggac caaacccttg agagacaaga agaccaggtc 660

[255]

[256] gttgttccga tgatggagaa taacagtggt ggagacatgc aaatgatgaa ttcttccttg 720

[257]

[258] gaacaggacg atgatctcgc tgctgtgttt ttggagtggc taaagaacaa caaggagact 780

[259]

[260] gtgtcggctg aggatttgag gaaagtaaag ataaagaaag ctacgattga atcagcggca 840

[261]

[262] agaagactag gcggtggtaa agaagcgatg aagcagcttt taaagctgat tcttgaatgg 900

[263]

[264] gtccaaacta atcacttaca aagaagacgc accaccacca ccaccaccaa cctctcttat 960

[265]

[266] caacaatcat tccaacaaga tccatttcaa aaccctaacc ctaataacaa caacctaatc 1020

[267]

[268] ccaccgtccg accaaacctg tttctcacct tcaacatggg ttcctccacc accacaacaa 1080

[269]

[270] caagcttttg tctcggaccc gggttttgga tacatgcctg ctccaaacta tccgccacag 1140

[271]

[272] ccagagttcc ttcctttact tgaatctcca ccgtcatggc caccaccacc acagtctggt 1200

[273]

[274] cccatgccac atcaacaatt ccccatgccg ccaacctcgc agtataatca atttggagat 1260

[275]

[276] ccaacaggtt tcaatggata caacatgaat ccgtaccaat atccttatgt tcctgcagga 1320

[277]

[278] caaatgagag atcagagatt actccgtttg tgttcctcag caactaaaga ggcaagaaag 1380

[279]

[280] aaacggatgg cgagacagag gaggttcttg tctcatcacc acagacataa caacaacaac 1440

[281]

[282] aacaacaaca acaataatca gcagaaccaa acccaaatcg gagaaacctg tgccgcggtg 1500

[283]

[284] gctccacaac ttaaccccgt ggccacaacc gccacgggag ggacctggat gtattggcct 1560

[285]

[286] aatgtcccgg cagtgccgcc tcaattaccg ccagtgatgg agactcagtt acctaccatg 1620

[287]

[288] gaccgagctg gctcagcttc tgctatgcca cgtcagcagg tggtaccaga tcgccggcag 1680

[289]

[290] ggatggaaac cagaaaagaa tttgcggttt ctcttgcaga aagtcttgaa gcaaagcgac 1740

[291]

[292] gtgggtaacc tcggaaggat cgttttgcca aaaaaagaag ctgagacaca cttgccggag 1800

[293]

[294] ctagaggcaa gagacggcat ctctctggcc atggaagaca tcggaacctc tcgtgtttgg 1860

[295]

[296] aacatgcgct acaggttttg gcctaacaac aaaagcagga tgtatctcct cgagaacacc 1920

[297]

[298] ggcgattttg tgaaaaccaa tgggctccaa gaaggtgatt tcatagtcat atactccgac 1980

[299]

[300] gtcaaatgtg gcaaatattt gatacgaggg gttaaagtaa gacaaccgag cggacaaaag 2040

[301]

[302] ccggaggccc caccgtcgtc agcagctacg aagagacaaa acaagtcgca aaggaacata 2100

[303]

[304] aacaataact ctccgtcggc gaatgtggtg gtcgcttcac caacttctca aactgttaaa 2160

[305]

[306] tga 2163

[307]

[308]

[309] <210> 3

[310] <211> 720

[311] <212> PRT

[312] <213> Artificial Sequence

[313]

[314] <220>

[315] <223> ABI3 protein

[316]

[317]

[318] <400> 3

[319] Met Lys Ser Leu His Val Ala Ala Asn Ala Gly Asp Leu Ala Glu Asp

[320] 1 5 10 15

[321]

[322] Cys Gly Ile Leu Gly Gly Asp Ala Asp Asp Thr Val Leu Met Asp Gly
[323] 20 25 30
[324]
[325] Ile Asp Glu Val Gly Arg Glu Ile Trp Leu Asp Asp His Gly Gly Asp
[326] 35 40 45
[327]
[328] Asn Asn His Val His Gly His Gln Asp Asp Asp Leu Ile Val His His
[329] 50 55 60
[330]
[331] Asp Pro Ser Ile Phe Tyr Gly Asp Leu Pro Thr Leu Pro Asp Phe Pro
[332] 65 70 75 80
[333]
[334] Cys Met Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Pro Ala Pro Val Asn
[335] 85 90 95
[336]
[337] Ala Ile Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ser Thr
[338] 100 105 110
[339]
[340] Ser Ser Ala Ala Ser Trp Ala Ile Leu Arg Ser Asp Gly Glu Asp Pro
[341] 115 120 125
[342]
[343] Thr Pro Asn Gln Asn Gln Tyr Ala Ser Gly Asn Cys Asp Asp Ser Ser
[344] 130 135 140
[345]
[346] Gly Ala Leu Gln Ser Thr Ala Ser Met Glu Ile Pro Leu Asp Ser Ser
[347] 145 150 155 160
[348]
[349] Gln Gly Phe Gly Cys Gly Glu Gly Gly Gly Asp Cys Ile Asp Met Met
[350] 165 170 175
[351]
[352] Glu Thr Phe Gly Tyr Met Asp Leu Leu Asp Ser Asn Glu Phe Phe Asp
[353] 180 185 190
[354]
[355] Thr Ser Ala Ile Phe Ser Gln Asp Asp Asp Thr Gln Asn Pro Asn Leu
[356] 195 200 205
[357]
[358] Met Asp Gln Thr Leu Glu Arg Gln Glu Asp Gln Val Val Val Pro Met
[359] 210 215 220

[360]

[361] Met Glu Asn Asn Ser Gly Gly Asp Met Gln Met Met Asn Ser Ser Leu

[362] 225 230 235 240

[363]

[364] Glu Gln Asp Asp Asp Leu Ala Ala Val Phe Leu Glu Trp Leu Lys Asn

[365] 245 250 255

[366]

[367] Asn Lys Glu Thr Val Ser Ala Glu Asp Leu Arg Lys Val Lys Ile Lys

[368] 260 265 270

[369]

[370] Lys Ala Thr Ile Glu Ser Ala Ala Arg Arg Leu Gly Gly Gly Lys Glu

[371] 275 280 285

[372]

[373] Ala Met Lys Gln Leu Leu Lys Leu Ile Leu Glu Trp Val Gln Thr Asn

[374] 290 295 300

[375]

[376] His Leu Gln Arg Arg Arg Thr Thr Thr Thr Thr Thr Asn Leu Ser Tyr

[377] 305 310 315 320

[378]

[379] Gln Gln Ser Phe Gln Gln Asp Pro Phe Gln Asn Pro Asn Pro Asn Asn

[380] 325 330 335

[381]

[382] Asn Asn Leu Ile Pro Pro Ser Asp Gln Thr Cys Phe Ser Pro Ser Thr

[383] 340 345 350

[384]

[385] Trp Val Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln Ala Phe Val Ser Asp Pro Gly

[386] 355 360 365

[387]

[388] Phe Gly Tyr Met Pro Ala Pro Asn Tyr Pro Pro Gln Pro Glu Phe Leu

[389] 370 375 380

[390]

[391] Pro Leu Leu Glu Ser Pro Pro Ser Trp Pro Pro Pro Pro Gln Ser Gly

[392] 385 390 395 400

[393]

[394] Pro Met Pro His Gln Gln Phe Pro Met Pro Pro Thr Ser Gln Tyr Asn

[395] 405 410 415

[396]

[397] Gln Phe Gly Asp Pro Thr Gly Phe Asn Gly Tyr Asn Met Asn Pro Tyr

[398] 420 425 430

[399]

[400] Gln Tyr Pro Tyr Val Pro Ala Gly Gln Met Arg Asp Gln Arg Leu Leu

[401] 435 440 445

[402]

[403] Arg Leu Cys Ser Ser Ala Thr Lys Glu Ala Arg Lys Lys Arg Met Ala

[404] 450 455 460

[405]

[406] Arg Gln Arg Arg Phe Leu Ser His His His Arg His Asn Asn Asn Asn

[407] 465 470 475 480

[408]

[409] Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gln Gln Asn Gln Thr Gln Ile Gly Glu Thr

[410] 485 490 495

[411]

[412] Cys Ala Ala Val Ala Pro Gln Leu Asn Pro Val Ala Thr Thr Ala Thr

[413] 500 505 510

[414]

[415] Gly Gly Thr Trp Met Tyr Trp Pro Asn Val Pro Ala Val Pro Pro Gln

[416] 515 520 525

[417]

[418] Leu Pro Pro Val Met Glu Thr Gln Leu Pro Thr Met Asp Arg Ala Gly

[419] 530 535 540

[420]

[421] Ser Ala Ser Ala Met Pro Arg Gln Gln Val Val Pro Asp Arg Arg Gln

[422] 545 550 555 560

[423]

[424] Gly Trp Lys Pro Glu Lys Asn Leu Arg Phe Leu Leu Gln Lys Val Leu

[425] 565 570 575

[426]

[427] Lys Gln Ser Asp Val Gly Asn Leu Gly Arg Ile Val Leu Pro Lys Lys

[428] 580 585 590

[429]

[430] Glu Ala Glu Thr His Leu Pro Glu Leu Glu Ala Arg Asp Gly Ile Ser

[431] 595 600 605

[432]

[433] Leu Ala Met Glu Asp Ile Gly Thr Ser Arg Val Trp Asn Met Arg Tyr

[434] 610 615 620

[435]

[436] Arg Phe Trp Pro Asn Asn Lys Ser Arg Met Tyr Leu Leu Glu Asn Thr
[437] 625 630 635 640
[438]
[439] Gly Asp Phe Val Lys Thr Asn Gly Leu Gln Glu Gly Asp Phe Ile Val
[440] 645 650 655
[441]
[442] Ile Tyr Ser Asp Val Lys Cys Gly Lys Tyr Leu Ile Arg Gly Val Lys
[443] 660 665 670
[444]
[445] Val Arg Gln Pro Ser Gly Gln Lys Pro Glu Ala Pro Pro Ser Ser Ala
[446] 675 680 685
[447]
[448] Ala Thr Lys Arg Gln Asn Lys Ser Gln Arg Asn Ile Asn Asn Asn Ser
[449] 690 695 700
[450]
[451] Pro Ser Ala Asn Val Val Val Ala Ser Pro Thr Ser Gln Thr Val Lys
[452] 705 710 715 720
[453]

청구범위

[청구항 1] 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함하는, 식물체의 개화 지연 또는 개화 억제용 조성물.

[청구항 2] 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열이 삽입된 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 개화 지연 또는 개화 억제용 조성물.

[청구항 3] 제 2항에 있어서,
상기 재조합벡터는 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열이 식물에서 작용가능한 강프로모터 및/또는 인핸서와 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 4] 제 2항에 있어서,
상기 재조합벡터는 식물체의 형질전환 여부를 확인할 수 있게 하는 선별 마커 유전자를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 5] 제 1항 또는 제 2항에 있어서,
상기 염기 서열은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기 서열인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 6] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 조성물을 이용하여 형질전환된 식물체.

[청구항 7] 제 6항에 있어서,
상기 식물체는 경엽채류, 인경채류, 또는 근채류인 것을 특징으로 하는, 식물체.

[청구항 8] 제 6항에 있어서,
상기 경엽채류는 깻잎, 상추, 배추, 양배추, 청경채, 시금치, 쑥갓, 갓, 미나리, 파슬리, 치커리, 셀러리, 열무, 파, 죽순 및 아스파라거스로 이루어진 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는, 식물체.

[청구항 9] 제 6항에 있어서,
상기 인경채류는 마늘 또는 양파인 것을 특징으로 하는, 식물체.

[청구항 10] 제 6항에 있어서,
상기 근채류는 무, 당근, 우엉, 고구마, 마, 및 감자로 이루어진 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는, 식물체.

[청구항 11] (A) 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 조성물로 식물체를 형질전환시키는 단계; 및
(B) 상기 형질전환된 식물체가 *ABI3* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는, 식물체의 개화를 지연 또는 억제시키는 방법.

[청구항 12] 제 11항에 있어서,

개화 지연 표현형이 유발된 식물체를 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

[청구항 13] 제 11항에 있어서,
상기 (A)단계는 서열번호 3의 아미노산 서열을코딩하는 염기 서열을 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계, 이러한 재조합 발현벡터를 아그로박테리움 박테리아에 형질전환시키는 단계, 및 이러한 형질전환된 아그로박테리움 박테리아로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 방법.

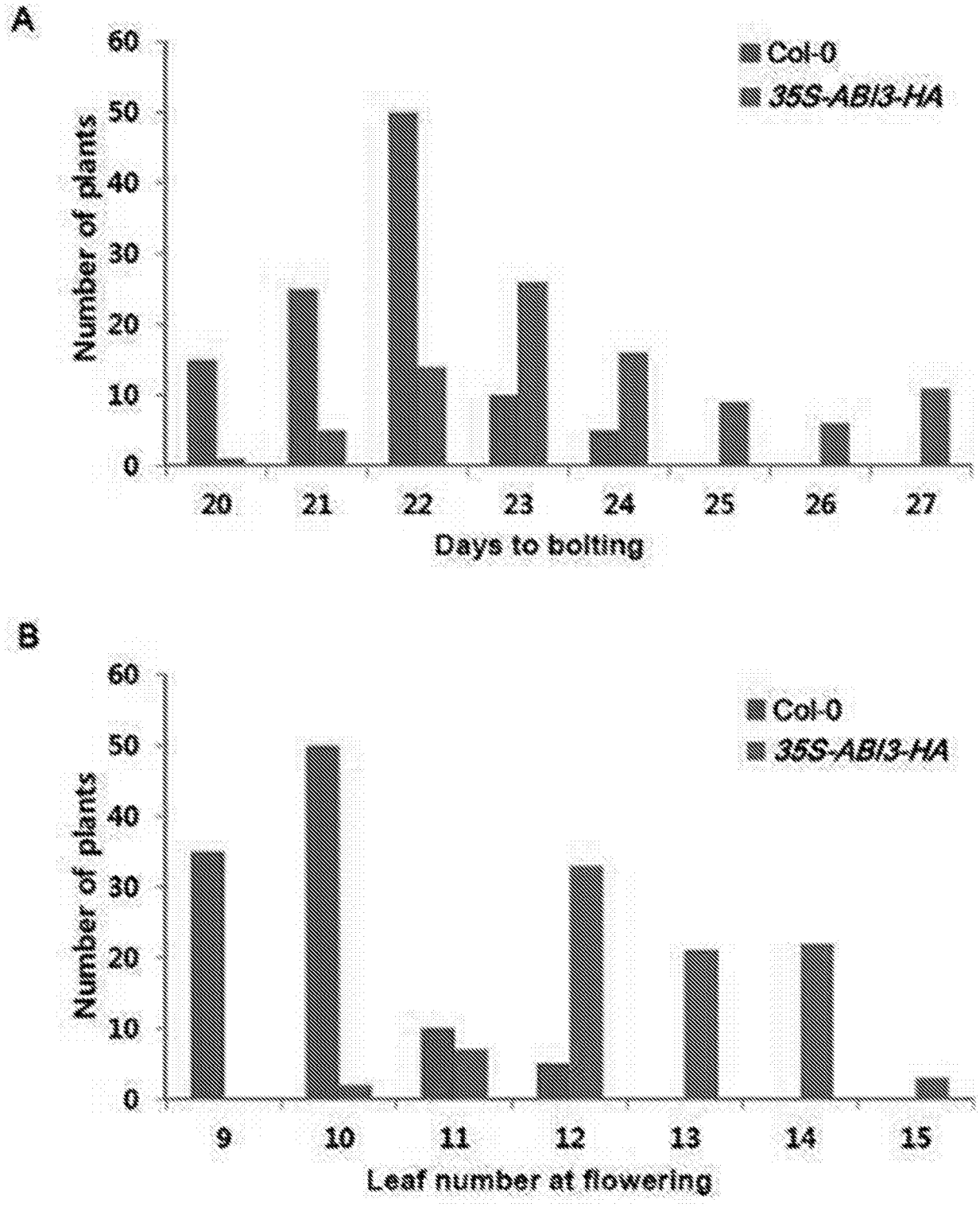
[청구항 14] *ABI3* 유전자를 과발현시키거나 발현을 억제시킨 형질전환 식물체 또는 식물세포를 이용하여 개화시기 조절 유전자 또는 단백질을 선별하는 방법.

[청구항 15] 제 14항에 있어서,
상기 방법은 *ABI3* 유전자를 과발현시키거나 발현을 억제시킨 형질전환 식물체 또는 식물세포에 후보물질을 처리한 다음 *ABI3* 유전자의 활성 또는 발현에 미치는 영향을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

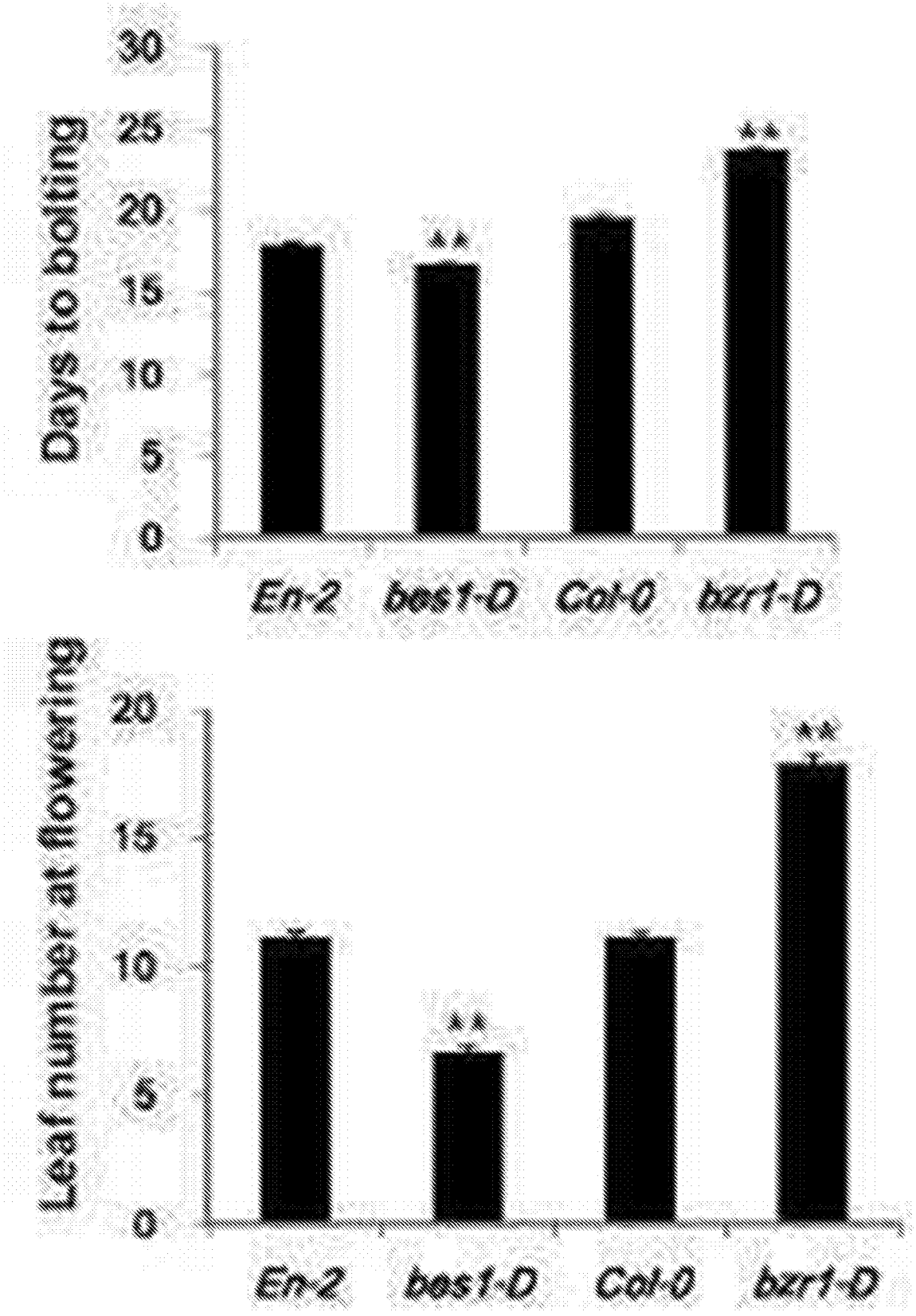
[Fig. 1]



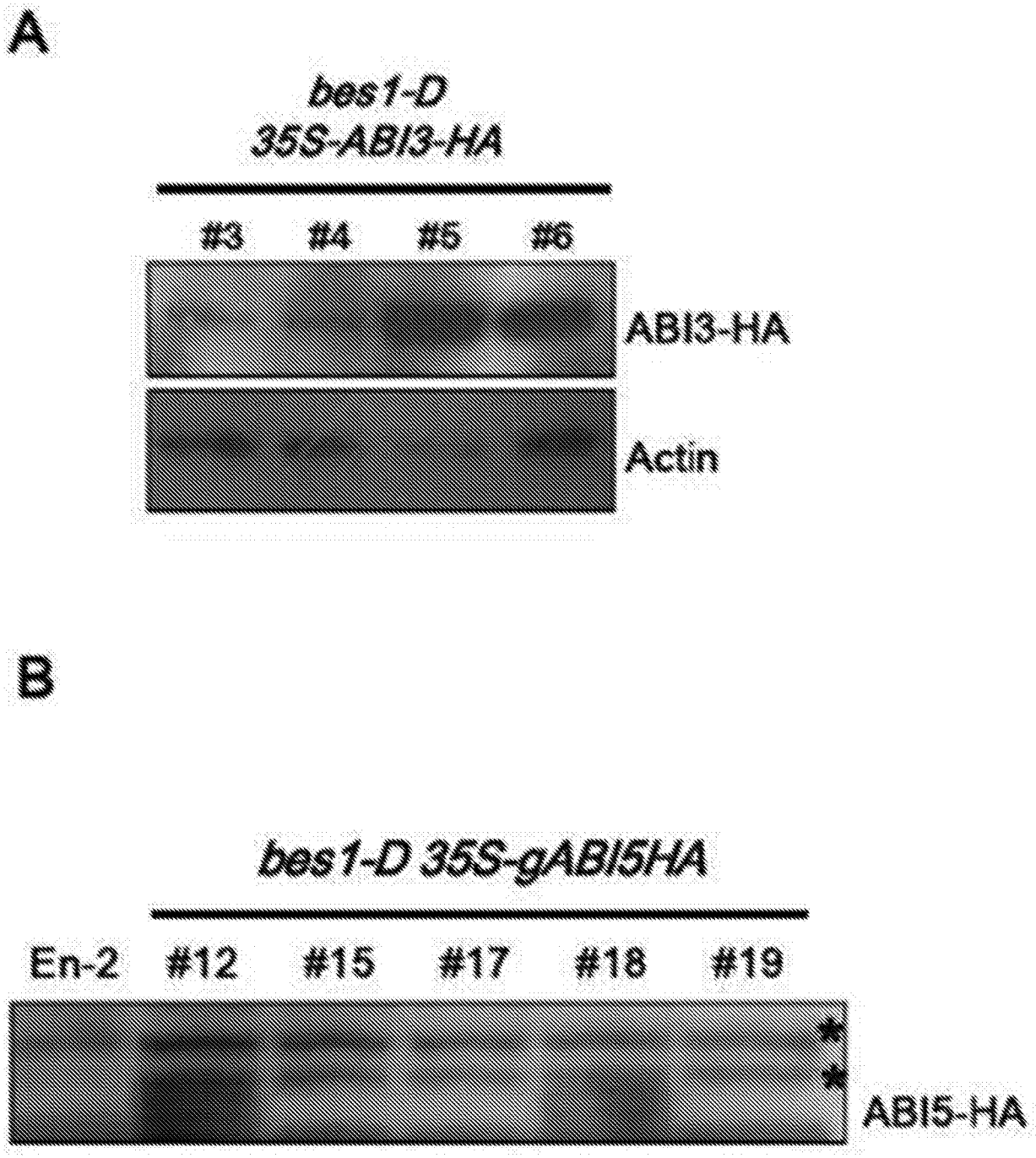
[Fig. 2]


A
Col-0
35S-ABI3-HA
Number of plants
0
10
20
30
40
50
60
20
21
22
23
24
25
26
27
Days to bolting
B
Col-0
35S-ABI3-HA
Number of plants
0
10
20
30
40
50
60
9
10
11
12
13
14
15
Leaf number at flowering

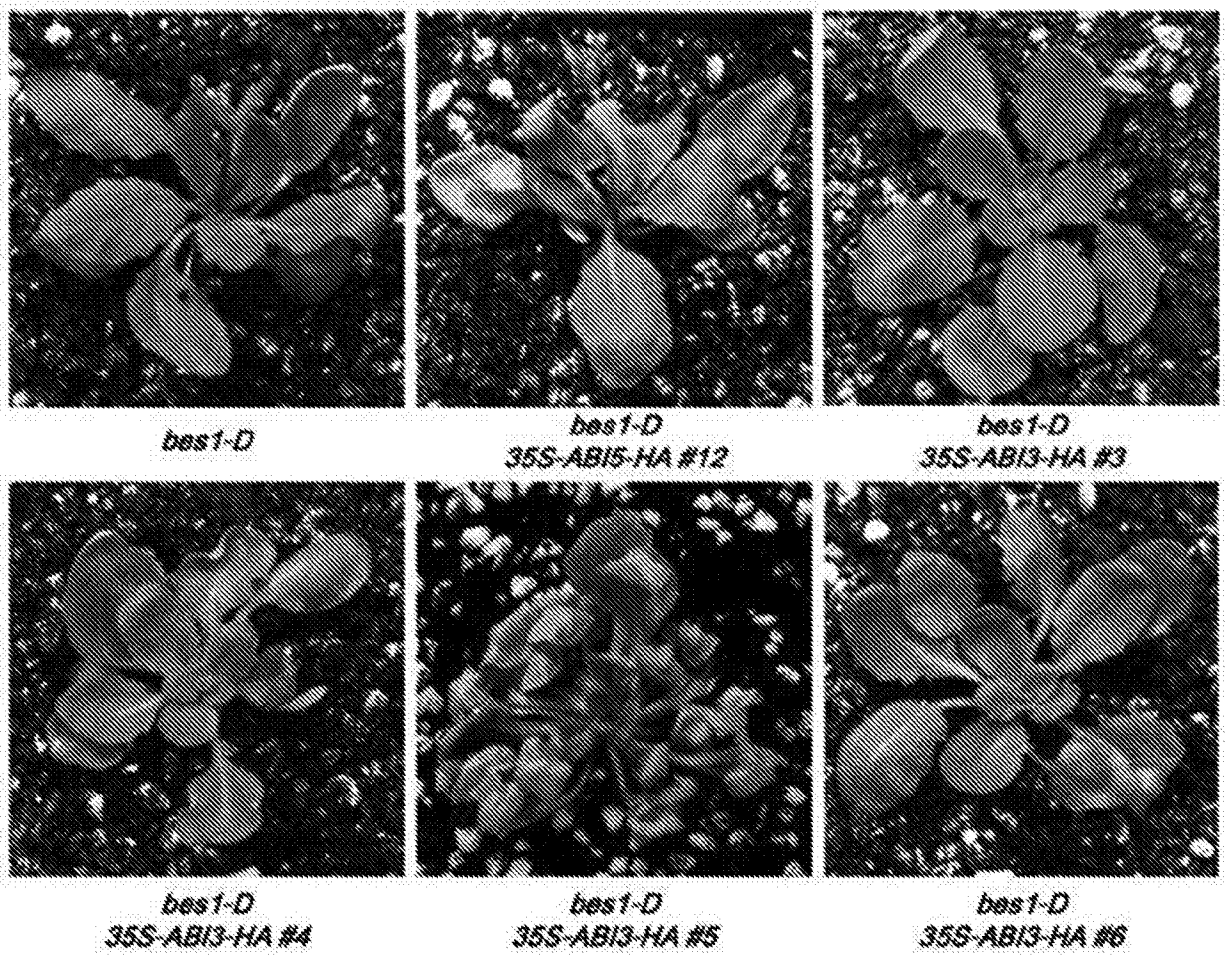
[Fig. 3]


Days to bolting
30
25
20
15
10
5
0
**
**
En-2
bes1-D
Col-0
bzr1-D
Leaf number at flowering
20
15
10
5
0
**
**
En-2
bes1-D
Col-0
bzr1-D

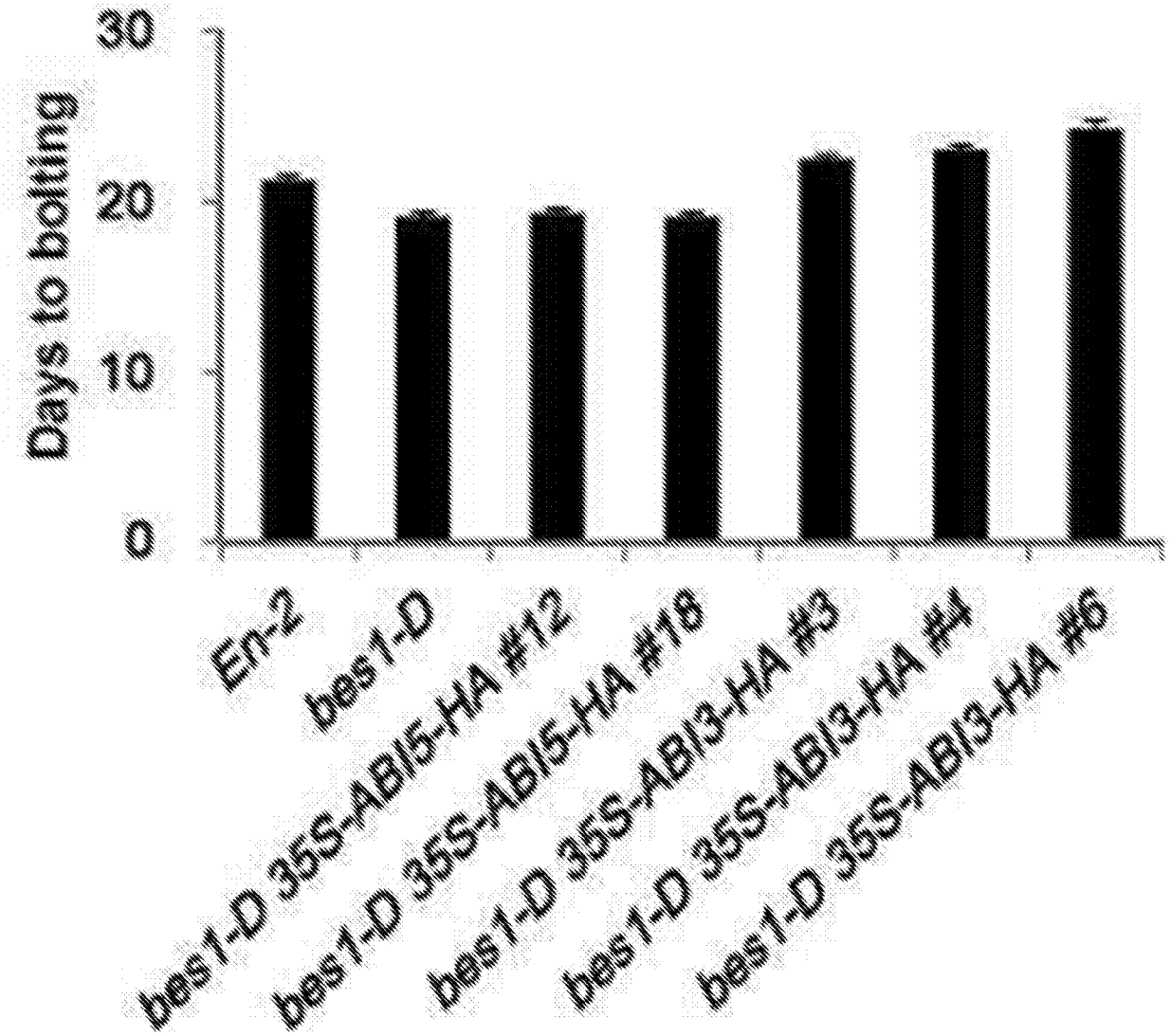
[Fig. 4]


A
bes1-D
35S-ABI3-HA
#3
#4
#5
#6
ABI3-HA
Actin
B
bes1-D 35S-gABI5HA
En-2
#12
#15
#17
#18
#19
ABI5-HA

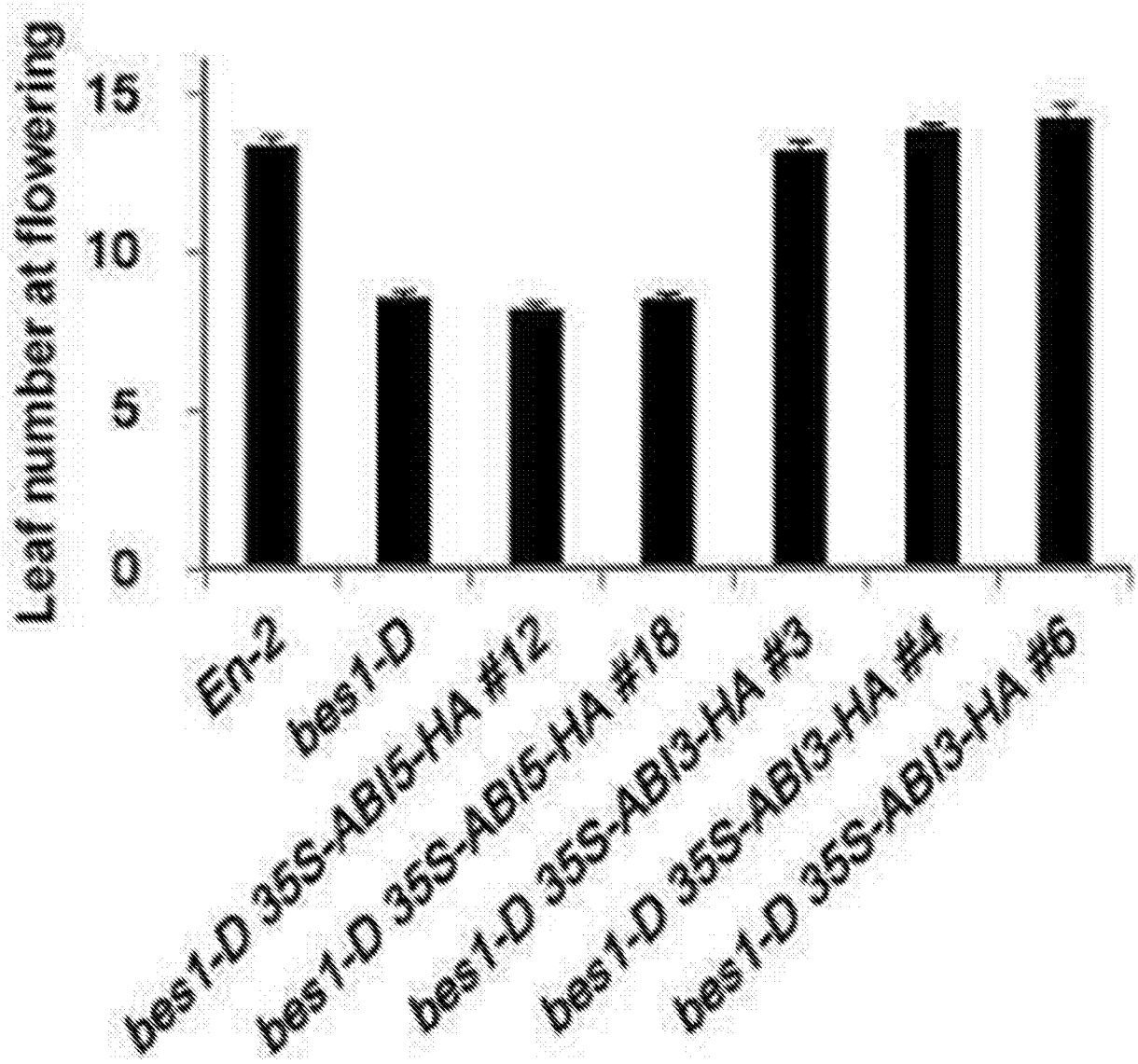
[Fig. 5]


bes1-D
bes1-D
35S-ABI5-HA #12
bes1-D
35S-ABI3-HA #3
bes1-D
35S-ABI3-HA #4
bes1-D
35S-ABI3-HA #5
bes1-D
35S-ABI3-HA #6

[Fig. 6]


Days to bolting
30
20
10
0
En-2
bes1-D
bes1-D 35S-ABI5-HA #12
bes1-D 35S-ABI5-HA #18
bes1-D 35S-ABI3-HA #3
bes1-D 35S-ABI3-HA #4
bes1-D 35S-ABI3-HA #6

[Fig. 7]


Leaf number at flowering
15
10
5
0
En-2
bes1-D
bes1-D 35S-ABI5-HA #12
bes1-D 35S-ABI5-HA #18
bes1-D 35S-ABI3-HA #3
bes1-D 35S-ABI3-HA #4
bes1-D 35S-ABI3-HA #6

[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/004183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 63/00(2006.01)i, A01G 7/06(2006.01)i, C12N 15/29(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)

A01N 63/00; C12N 15/82; C12N 15/29; C12N 15/09; C07K 14/415; A01G 7/06

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), BLAST & Keywords: delay flowering, restrict flowering, recombination vector, ABI3 gene

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004-0078849 A1 (RIETVELD, Patrice Louis et al.) 22 April 2004 See claim 5.	1-5,14-15
Y	ROHDE, Antje et al., "ABI3 Affects Plastid Differentiation in Dark-Grown Arabidopsis Seedlings", The Plant Cell, 2000, vol. 12, pp. 35-52 See page 45, left column, paragraphs 2 and 3; page 48, right column, paragraph 3-page 49, left column, paragraph 1.	1-5,14-15
A	KR 10-2010-0051354 A (REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)) 17 May 2010 See abstract; claim 15.	1-5,14-15
A	KR 10-2010-0095868 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) 01 September 2010 See abstract; page 12, paragraph [0051].	1-5,14-15
A	KURUP, Smita et al., "Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing Arabidopsis seeds", The Plant Journal, 2000, vol. 21, pp. 143-155 See the entire document.	1-5,14-15

☐ 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
23 SEPTEMBER 2013 (23.09.2013)	**23 SEPTEMBER 2013 (23.09.2013)**

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/004183

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **7-10, 12-13**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The claim is not drafted in compliance with the manner of claiming used for dependent claims under PCT Rule 6.4(a). Thus, a meaningful search cannot be carried out.

3. ☒ Claims Nos.: **6, 11**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2013/004183

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2004-0078849 A1	22/04/2004	AU 2002-228459 A2	30/07/2002
		AU 2002-228459 B2	28/06/2007
		CA 2435352 A1	25/07/2002
		CN 1498272 A	19/05/2004
		EP 1399571 A2	24/03/2004
		IL 156944D0	08/02/2004
		JP 2004-531222 A	14/10/2004
		JP 2004-531222 T	14/10/2004
		NZ 527056 A	28/04/2006
		US 7795028 B2	14/09/2010
		WO 02-057469 A2	25/07/2002
		WO 02-057469 A3	31/12/2003
		WO 02-057469 A8	06/11/2003
KR 10-2010-0051354 A	17/05/2010	NONE	
KR 10-2010-0095868 A	01/09/2010	CN 102421793 A	18/04/2012
		EP 2399929 A2	28/12/2011
		JP 2012-518406 A	16/08/2012
		US 2011-0321198 A1	29/12/2011
		WO 2010-095910 A2	26/08/2010
		WO 2010-095910 A3	13/01/2011

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/004183

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01N 63/00(2006.01)i, A01G 7/06(2006.01)i, C12N 15/29(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01N 63/00; C12N 15/82; C12N 15/29; C12N 15/09; C07K 14/415; A01G 7/06

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), BLAST & 키워드: 개화 지연, 개화 억제, 재조합 벡터, ABI3 유전자

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2004-0078849 A1 (PATRICE LOUIS RIETVELD 외 2명) 2004.04.22 청구항 제5항 참조.	1-5,14-15
Y	ANTJE ROHDE 외, `ABI3 Affects Plastid Differentiation in Dark-Grown Arabidopsis Seedlings`, The Plant Cell, 2000, Vol. 12, pp. 35-52 45페이지, 좌측 컬럼, 두번째 및 세번째 단락; 48페이지, 우측 컬럼, 세번째 단락부터 49페이지, 좌측 컬럼, 첫번째 단락 참조.	1-5,14-15
A	KR 10-2010-0051354 A (대한민국(농촌진흥청장)) 2010.05.17 요약; 청구항 제15항 참조.	1-5,14-15
A	KR 10-2010-0095868 A (포항공과대학교 산학협력단) 2010.09.01 요약; 12페이지, [0051] 단락 참조.	1-5,14-15
A	SMITA KURUP 외, `Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing Arabidopsis seeds`, The Plant Journal, 2000, Vol. 21, pp. 143-155 문헌 전체 참조.	1-5,14-15

☐ 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
2013년 09월 23일 (23.09.2013)	2013년 09월 23일 (23.09.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김종호
전화번호 +042 481 8657

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/004183

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☒ 청구항: 7-10,12-13
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
이 청구항은 PCT Rule 6.4(a)의 규정에 따라 작성되지 않은 청구항의 종속항으로 유효한 국제조사를 수행할 수 없습니다.

3. ☒ 청구항: 6,11
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/004183

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2004-0078849 A1	2004/04/22	AU 2002-228459 A2	2002/07/30
		AU 2002-228459 B2	2007/06/28
		CA 2435352 A1	2002/07/25
		CN 1498272 A	2004/05/19
		EP 1399571 A2	2004/03/24
		IL 156944D0	2004/02/08
		JP 2004-531222 A	2004/10/14
		JP 2004-531222 T	2004/10/14
		NZ 527056 A	2006/04/28
		US 7795028 B2	2010/09/14
		WO 02-057469 A2	2002/07/25
		WO 02-057469 A3	2003/12/31
		WO 02-057469 A8	2003/11/06
KR 10-2010-0051354 A	2010/05/17	없음	
KR 10-2010-0095868 A	2010/09/01	CN 102421793 A	2012/04/18
		EP 2399929 A2	2011/12/28
		JP 2012-518406 A	2012/08/16
		US 2011-0321198 A1	2011/12/29
		WO 2010-095910 A2	2010/08/26
		WO 2010-095910 A3	2011/01/13