

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 9월 17일 (17.09.2020) WIPO | PCT

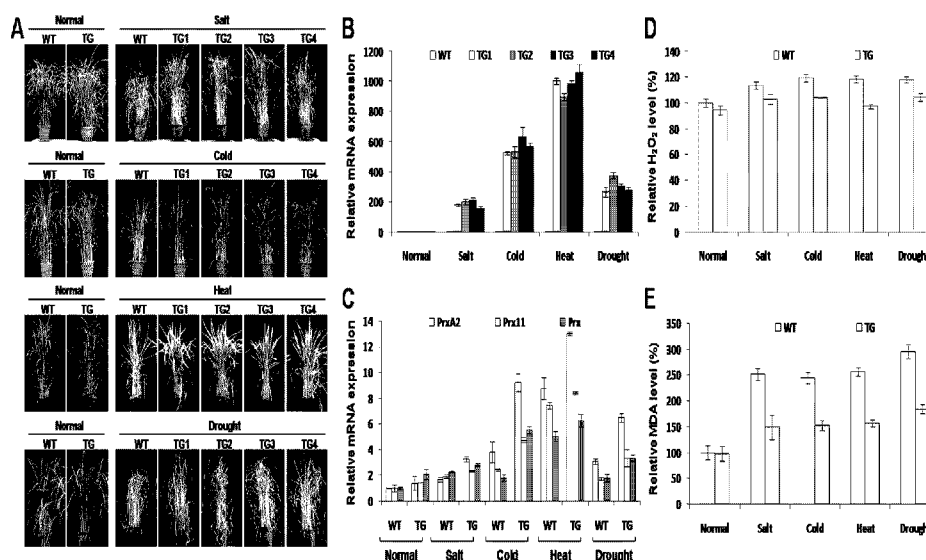


(10) 국제공개번호
WO 2020/184764 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/82* (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/003087
- (22) 국제출원일: 2019년 3월 18일 (18.03.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0027725 2019년 3월 11일 (11.03.2019) KR
- (71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 41566 대구시 북구 대학로 80, Daegu (KR).
- (72) 발명자: 윤호성 (YOON, Ho-Sung); 42108 대구시 수성구 청호로 345, 103동 1601호, Daegu (KR). 박성임 (PARK, Seong-Im); 42272 대구시 수성구 달구벌대로661길 7, 105동 2205호, Daegu (KR). 김진주 (KIM, Jin-Ju); 38655 경상북도 경산시 강변서로 271, 101동 1002호, Gyeongsangbuk-do (KR). 김일섭 (KIM, Il-Sup); 38336 경상북도 청도군 청도읍 운산3길 149-2, Gyeongsangbuk-do (KR). 김영생 (KIM, Young-Saeng); 52543 경상남도 사천시 서포면 중촌로 169-11, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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,

(54) Title: USE OF ORYZA SATIVA-DERIVED AK102606 GENE AS CONTROLLER FOR ANTIOXIDATIVE ACTIVITY, ENVIRONMENTAL STRESS, AND CROP YIELD

(54) 발명의 명칭: 벼 유래의 AK102606 유전자의 항산화능, 환경 스트레스 및 수확량 조절자로서의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a use of *Oryza sativa*-derived AK102606 gene as a controller for antioxidative activity, environmental stress, and crop yield. A plant transformed with the AK102606 gene of the present invention exhibits high antioxidative activity, excellent tolerance to environmental stresses, notable initial growth, and high crop yield. Thus, the introduction of AK102606 gene into valuable crops can be advantageously used to develop plants superb in terms of antioxidative activity, abiotic stress, and crop yield.

(57) 요약서: 본 발명은 벼(*Oryza sativa*) 유래 AK102606 유전자의 항산화능, 환경 스트레스 및 작물 수확량 조절자로서의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 AK102606 유전자로 형질전환된 식물체는 항산화능이 높으며, 환경 스트레스에 대한 내성이 우수하고, 초기 생장이 뛰어나며, 작물 수확량이 많으므로 AK102606 유전자를 유용작물에 도입하여 항산화능, 비생물적 스트레스 및 작물 수확량이 증가된 식물체를 개발하는 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/184764 A1

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 역
내 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), 유
럽 (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 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된
생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i)
및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 벼 유래의 AK102606 유전자의 항산화능, 환경 스트레스 및 수확량 조절자로서의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 벼(*Oryza sativa*) 유래 AK102606 유전자의 항산화능, 환경 스트레스 및 작물 수확량 조절자로서의 용도를 규명한 것이다.

배경기술

- [2] 인류가 직면하고 있는 중대한 과제는 급변하는 기후와 감소하는 경작지 등의 위기 속에서 식량을 얼마나 안정적으로 공급하느냐이다. 실제로 지난 수십 년간 열악한 환경 속에 작물 생산성은 줄어들고 있다고 한다. 더욱 심각한 것은 앞으로 홍수와 가뭄, 고온, 저온 등의 발생이 더욱 빈번해 질 것이라고 예측된다는 것이다. 이런 요인에 의해 주요 작물인 옥수수나 밀, 벼의 생산성도 향후 더욱 감소할 것이라고 예상된다.
- [3] 1960대 이후로 다양한 유전자원 (germplasm)의 개발 등을 통하여 주요 작물들의 생산성을 상승시키는 노력이 이어지고 있으나, 밀집된 재배 조건은 제한된 경작지 내에서 양분과 수분에 대한 경합을 초래하여 기후에 의한 피해를 더욱 증가시키고 있다. 그러므로 이러한 환경에 대하여 내성을 지니고 생산성을 유지할 수 있는 작물의 개발이 필요하다.
- [4] 식물은 세포대사로부터 생리와 발달까지 다양한 조절 기작을 통하여 여러 가지 환경에 적응하며 살아가고 있다. 특히 비생물적 스트레스 (abiotic stress)에 대한 기작이 중요한 적응 요인인데, 비생물적 스트레스란 식물세포의 항상성을 방해하여 결국 식물 성장을 저해하는 기후나 토양 조건을 일컫는다. 수분 과잉이나 부족, 독성 이온 (Al^{3+} , Cl^{-} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Na^{+} 등), 양분 부족 (Fe^{3+} , N, P, S, Zn^{2+} 등), 고온, 저온, 대기 오존(O_3) 등이 그 예이다. 이러한 스트레스는 일시적인 스트레스 (transient stress; 낮 동안의 고온 등)와 지속적인 스트레스 (chronic stress; 고염분 토양의 Na^{+} 등)로 나누어지고, 하루 중 혹은 발달과정 중 언제 스트레스를 받느냐에 따라 작물에게 미치는 영향이 달라진다. 어린 영양생장 시기에 받는 스트레스는 세포분열 및 세포성장을 저해하여 식물 성장을 더디게 하지만 작물의 수확량에 큰 영향을 미치지 않는다. 반면 생식생장 시기의 스트레스는 작물의 수확량에 심각한 영향을 미친다. 비생물적 스트레스는 복합적으로 찾아오기 때문에 작물 생산성을 유지시키기 위해서는 다양한 적응 기작을 증진시키는 것이 필요하다. 비생물적 스트레스에 의한 피해를 최소화시키는 것이 결국 농업 생산성을 증대시키는 길이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 이에 본 발명자들은 벼(*Oryza sativa*) 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는

AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 벼에 형질전환한 결과 항산화능이 높으며, 환경 스트레스에 대한 내성이 우수하고, 초기 생장이 뛰어나며, 작물 수확량이 많은 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

- [6] 따라서 본 발명의 목적은 벼 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 벼에 형질전환시켜 AK102606 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스 내성 및 항산화능을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 환경 스트레스 내성 및 항산화능이 증가된 벼(*Oryza sativa* L. *japonica*) AK102606(KCTC 13810BP)를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 벼 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 벼에 형질전환시켜 AK102606 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 바이오매스(biomass) 및 수확량(yield)을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 바이오매스 및 수확량이 증가된 벼(*Oryza sativa* L. *japonica*) AK102606(KCTC 13810BP)를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 해결하기 위하여, 벼 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 벼에 형질전환시켜 AK102606 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스 내성 및 항산화능을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 벼 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 벼의 식물세포에 형질전환하는 단계; 및
- [12] 상기 형질전환된 벼 식물세포로부터 벼 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 환경 스트레스 내성 및 항산화능이 증가된 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 환경 스트레스 내성 및 항산화능이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 벼 유래 AK102606 유전자를 함유하는, 식물체의 환경 스트레스 내성 및 항산화능 증가용 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 환경 스트레스 내성 및 항산화능이 증가된 벼(*Oryza sativa* L. *japonica*) AK102606(KCTC 13810BP)를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 벼 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 벼에 형질전환시켜 AK102606 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 바이오매스(biomass) 및 수확량(yield)을

증가시키는 방법을 제공한다.

- [17] 또한, 본 발명은 벼 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 *AK102606* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 벼의 식물세포에 형질전환하는 단계; 및
- [18] 상기 형질전환된 벼 식물세포로부터 벼 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 바이오매스 및 수확량(yield)이 증가된 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 바이오매스 및 수확량(yield)이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 벼 유래 *AK102606* 유전자를 함유하는, 식물체의 바이오매스 및 수확량 증가용 조성물을 제공한다.
- [21] 아울러, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 *AK102606* 유전자를 포함하는 바이오매스 및 수확량이 증가된 벼(*Oryza sativa* L. *japonica*) *AK102606*(KCTC 13810BP)을 제공한다.

발명의 효과

- [22] 본 발명의 *AK102606* 유전자를 도입한 형질전환 식물체는 항산화능이 높으며, 환경 스트레스에 대한 내성이 우수하고, 초기 생장이 뛰어나며, 작물 수확량이 많으므로 *AK102606* 유전자를 유용작물에 도입하여 항산화능, 환경 스트레스 및 작물 수확량이 증가된 식물체를 개발하는 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [23] 도 1은 *AK102606* 유전자를 도입한 형질전환 벼의 비생물적 내성능 분석 및 항산화 능력을 측정한 결과를 나타낸 사진과 그래프이다:
- [24] (A) 염(200 mMNaCl), 저온(15°C), 열(42°C), 가뭄 스트레스를 14, 7, 28, 3일간 처리 후 대조구인 일미벼와 형질전환체의 표현형
- [25] (B), (C) 염과 저온 스트레스에 12시간, 열과 가뭄 스트레스에 24시간 동안 노출되었을 때 qPT-PCR 분석을 통한 *AK10206* 유전자와 peroxidase 유전자의 발현분석
- [26] (D), (E) 염 스트레스 7일, 저온 스트레스 4일, 열 스트레스 10일 및 가뭄 스트레스 2일 동안 노출시켰을 때의 상대적인 H_2O_2 와 MDA 분석.
- [27] 도 2는 *AK102606* 유전자를 도입한 형질전환 벼의 초기 생육단계에서 표현형을 확인한 사진과 그래프이다:
- [28] (A) 자연 생육상태에서의 이앙 후 4주가 된 벼 식물체 표현형
- [29] (B) 이앙 후 6주 된 벼 식물체 표현형
- [30] (C) 이앙 후 4일째부터 4일 간격으로 뿌리 길이를 측정
- [31] (D) 4주 된 식물체의 생량과 건량.
- [32] 도 3은 균위 실험포장지에서 형질전환 벼 식물체의 자연생육상태와 스트레스에 대한 항산화 능력을 분석한 결과를 나타낸 사진과 그래프이다:
- [33] (A) 자연생육상태에서의 이앙 후 6주된 벼 식물체 표현형
- [34] (B) 이앙 후 변화된 벼 식물체 분얼수 증가량

- [35] (C) 이앙 후 6주 된 벼 잎의 NBT, DAB 염색 후 사진
- [36] (D) 이앙 후 6주 된 식물체의 MV(methyl viologen) 처리에 따른 이온누수량과 72시간 때 NBT 염색.
- [37] 도 4는 2016(T₅), 2017(T₆), 2018(T₇)에 걸쳐 대조구 일미벼와 형질전환체 사이의 생식성장단계 표현형 및 농업형질분석한 결과를 나타낸 사진과 그래프이다:
- [38] (A) 2016년 농업형질(T₅) 비교분석
- [39] (B) 2017년 농업형질(T₆) 비교분석
- [40] (C) 2018년 농업형질(T₇) 비교분석
- [41] 총 식물생체중 (total plant fresh weight, TPW), 줄기 생체중(culm weight, CW), 분얼수(number of tillers, NT), 이랑당 이삭수(number of panicles per hill, NP), 총곡물무게(total grain weight, TGW), 총곡물수(number of total grains, NTG), 이삭당 결가지수(number of spikelets per panicle; NSP), 및 천립중(1,000 grain weight, 1000GW) 각각의 결과를 상대적으로 나타내었으며, 대조구인 일미벼를 100%로 둠.
- [42] 도 5는 2016(T₅), 2017(T₆), 2018(T₇)의 3년 동안의 경북 군위군 효령면에 위치한 경북대학교 실험포장지의 기온 및 강수량 분석한 그래프이다:
- [43] (A) 평균최저기온
- [44] (B) 평균최고기온
- [45] (C) 강수량.
- [46] 도 6은 AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼를 PEG400 10%의 가뭄 환경에 5일 동안 노출 시킨 후 회복시킨 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [47] 본 발명은 벼(*Oryza sativa*) 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 이용하여 벼에 형질전환하여 환경 스트레스에 대한 저항성 및 항산화능 및 수확량이 증가한 것을 확인한 것이다.
- [48] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 환경 스트레스 내성 및 항산화능이 증가된 벼(*Oryza sativa* L. *japonica*) AK102606를 한국생명공학연구원에 수탁번호 KCTC 13810BP로 수탁하였다(2019.02.13).
- [49] 또한, 본 발명의 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 바이오매스 및 수확량이 증가된 벼(*Oryza sativa* L. *japonica*) AK102606를 한국생명공학연구원에 수탁번호 KCTC 13810BP로 수탁하였다(2019.02.13).
- [50] 상기 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열일 수 있다.
- [51] 본 발명은 벼 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 벼에 형질전환시켜 AK102606 유전자를 과발현하는

단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스에 대한 저항성 및 항산화능 및 수확량이 증가한 것이 증가하는 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.

- [52] 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.
- [53] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 환경 스트레스는 염, 저온, 고온 또는 가뭄 스트레스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [54] 또한 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 서열상동성의 %는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제를 포함할 수 있다.
- [55] 용어 재조합은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것으로, 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태가 아닌 변형된 유전자를 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입한 것이다. 상기 유전자는 센스 또는 안티센스 형태일 수 있다.
- [56] 본 발명에서 상기 AK102606 유전자 서열은 재조합 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다.
- [57] 본 발명의 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포바이러스, 포유동물 세포 바이러스 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절요소 등을 포함하는 것이다.
- [58] 또한, 본 발명은 벼 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 벼의 식물세포에 형질전환하는 단계; 및
- [59] 상기 형질전환된 벼 식물세포로부터 벼 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스 내성 및 항산화능이 증가된 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [60] 본 발명의 AK102606 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 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

- [61] 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, 제미니 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.

- [62] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)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.

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

- [64] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 환경 스트레스에 대한 내성이 조절되어 바이오매스 및 수확량의 함량이 증대된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

- [65] 상기 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 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.

발명의 실시를 위한 형태

- [66] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단

[67] 지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[68]

[69] <실시예 1> 실험 재료 및 방법

[70] <1-1> 플라스미드 구조 및 벼의 형질전환

[71] AK102606 유전자를 코딩하는 전장(full-length) cDNA (GenBank accession no: AK102606)를 바이나리벡터(binary vector) p600-Rab21(GenBank accession no: AB027256 명지대)에 삽입하였다. 생성된 유전자 구조를 AK102606로 명명하고 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 벼 묘종(*O. sativa* L. *japonica* cv. 일미)에 형질전환시켰다. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404는 종래의 *Agrobacterium tumefaciens* 매개형질전환방법(Hiei et al. 1994)에 따라 일미벼의 성숙한 종자에 배반(scutellum)으로부터 유도된 쌀미(rice calli)를 형질전환하는데 사용되었다. 비알라포스(bialaphos)에 대한 내성과 DNA 유전형질분석(genotyping)에 따라 AK102606 형질전환계통(T₀)을 선택하여, 경북대학교 유전자변형생물체(genetically modified organism ;GMO) 농지에 이양하여 T₁ 종자를 수확하고, 그 다음해 T₁ 식물체를 농지에 이양하여 T₂ 종자를 수확하였다. 그리고 T₂ 식물체를 DNA 유전형질분석(genotyping)에 따라 4개의 독립적인 AK102606 형질전환계통(TG 1, 2, 3, 4)을 평가하였다.

[72]

[73] <1-2> 식물재료, 생육조건, 스트레스 조건

[74] 벼(*O. sativa* L. var. *japonica*) cv. 일미(WT)를 형질전환에 사용하였다. 벼 종자는 0.05% 살충제(SPOOTAC :prochloraz 25 %)로 24시간 소독하고 완전히 헹군 후, 28°C의 암실생육상(growth chamber)에서 7일 동안 증류수에 침지시켰다. 종자발아 후, 묘종을 토양에 이식하여 4주 동안 28°C 내지 32°C의 온실(16시간 광조건 및 8시간 암조건의 반복주기)에서 생육한 후, 경북대학교 유전자변형생물체(genetically modified organism ;GMO) 농지에서 스트레스 실험 및 재배에 사용하였다. 온실에 파종 후 4주된 묘목에 염(200 mM NaCl), 저온(15°C), 열(42°C), 가뭄 스트레스를 14, 7, 28, 3일간 처리 후 대조구인 일미벼(WT)와 형질전환체(TG)의 표현형을 관찰하였다. 독립적인 4개 계통의 T₇ 세대를 후속상세분석에 사용하였다.

[75]

[76] <1-3> RNA 추출 및 RT-PCR(quantitative real-time PCR)

[77] TRIzol 시약(Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 이식 4주 후 TG 및 WT 벼 식물의 잎에서 총 RNA를 추출하였다. 역전사반응은 SuperScript III First-Strand Synthesis System(Invitrogen)을 사용하여 총 RNA 2 µg을 사용하여 수행하였다. AK102606(accession number AK102606) 발현을 확인하기 위하여, AK102606-F1(5'-

ATAGTTTGCGGTGGATCTGG-3'(서열번호 3)) 및 AK102606-R1(5'-CTTGGAGGTGCAGAGTTAGC-3'(서열번호 4)) 프라이머 세트를 사용하였다. Tub-F (5'-GAGTACCCTGACCGCATGAT-3'(서열번호 5)) 및 Tub-R (5'-GTGGTCAGCTTGAGAGTCCT-3'(서열번호 6)) 프라이머 세트를 갖는 벼 튜블린(Tub) 유전자(accession number AK072502)를 동일한 PCR 조건하에서 양성 하우스키핑(housekeeping) 대조군으로 사용하였다. 3 종류의 peroxidase 유전자인 PrxA2(accession number AK104730), Prx11(accession number AK060295), Prx(accession number AF014467)의 발현을 확인하기 위해 PrxA2-F CCCAGCTGCCTAGCTAAATG(서열번호 7), PrxA2-R TCCACGAGCTAACACACAGC(서열번호 8), Prx11-F TTGCTCTCTGCCTGGCTTGT(서열번호 9), Prx11-R TTCGGGCAGGTCTTTGAGTAG(서열번호 10), Prx-F CGTACGCTTGTATGCCAATG(서열번호 11), Prx-R AGCATGCCACTCTTGTAGGG(서열번호 12) 프라이머를 사용하였다.

[78] 정량 실시간 PCR 분석을 위해 희석된 (1:10) 1차 스텐드 cDNA 템플릿 2 μ L과 SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) 18 μ L를 사용하였다. 반응은 95°C에서 10분간의 초기 변성 단계, 95°C에서 15초, 60°C에서 10분간 40회 반복하였다. 데이터는 StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems)을 사용하여 수집하고 분석했습니다. 표준화 및 상대 정량화는 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 방법을 사용하여 수행되었다.

[79]

[80] <1-4> H₂O₂ 분석 및 지질과 산화

[81] 염 스트레스 7일, 저온 스트레스 4일, 열 스트레스 10일 및 가뭄 스트레스 2일 동안 노출시킨 벼 식물체의 잎으로 측정하였다.

[82] Ferrous ammonium sulfate/xlenolorange(FOX) 방법을 사용하여 벼 잎의 H₂O₂ 함량을 측정하였다. FOX 분석시약의 조성은 다음과 같다: 250 μ M의 철황산암모늄(ferrous ammonium sulfate), 100 μ M의 솔비톨(sorbitol), 100 μ M의 크실레놀오렌지 및 25 mM의 H₂SO₄. 각 샘플에 대해 조추출물(crude extract) 50 μ L를 실온에서 950 μ L FOX assay 시약에 첨가하여 완전히 혼합한 후, 25°C의 암실에서 30분 동안 배양하였다. 흡광도는 560 nm로 측정되었다. 하이드로퍼옥사이드(hydroperoxide)의 농도는 기존에 보고된 H₂O₂를 사용하는 표준곡선(Gay et al., 1999)에 의해 결정하였다. 막지질의 불포화지방산과 산화로부터 유도된 말론디알데히드(malondialdehyde; MDA)의 양은 총티오바르비투산(thiobarbituric acid) 반응물질분석을 사용하여 측정하였다. 구체적으로, ~ 0.1 g의 잎 샘플을 액체질소를 사용하여 균질화시키고, 20%(w/v) 트리클로로아세트이트 및 0.65%(w/v) 티오바르비투산을 함유하는 용액과 혼합하였다. 이후, 95°C의 수조에서 25분 동안 가열한 다음, 4°C에서 12,000

rpm으로 10분간 원심분리하였다(Hodges et al., 1999). 최종적으로, 생성된 상층액(supernatant)의 MDA 농도는 600 nm를 기준으로하여 532 nm에서 측정되었고, MDA에 대해 $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 의 몰흡광계수를 사용하여 계산하였다(Gueta-Dahan Y 등, 1997). 하이드로퍼옥사이드와 MDA의 결과는 WT 벼(100%)를 기준으로 나타내었다.

[83]

[84] <1-5> 초기생장평가

[85] 심한 일교차를 나타낸 논에서 식물의 환경적응을 평가하기 위하여, 이식 4일 후 독립계통당 4개의 벼 식물체를 샘플링하여 4일 간격으로 뿌리길이를 측정하였다. 이앙 후 한 달이 되었을 때 독립계통당 4개의 벼 식물체를 샘플링하여 생체중(fresh weight) 및 건체중(dry weight)을 측정하였다.

[86]

[87] <1-6> 조직화학염색

[88] 잎에서 스트레스에 의해 생성된 O_2^- 는 남색이 나타날 때까지 10 mM 인산나트륨 완충액에서 1% nitro blue tetrazolium(NBT)으로 염색하여 검출하였고(Lin et al., 2009), H_2O_2 는 식물생장상(growth chamber)에서 적갈색이 나타날 때까지 3,3-디아미노벤지딘(3,3-diaminobenzidine; DAB)-HCl (pH 3.8)과 함께 배양하여 검출하였다(Thordal-Christensen et al., 1997).

[89]

[90] <1-7> 메틸비올로겐(MV) 처리 및 이온 누출 분석

[91] 논에서 6주 동안 재배된 TG 및 WT 벼의 잎을 크기가 각각 1 cm인 10개의 조각으로 나누었다. 10개의 잎 조각을 $10 \mu\text{M}$ MV(methyl viologen) 용액(9.0 cm 직경의페트리접시)에 부유시키고, 20°C 암실에서 12시간 동안 배양하여 MV를 조각으로 확산시켰다. 예비배양 후, 잎 조각을 20°C 에서 72시간 동안 식물생장상(16시간 광조건 및 8시간 암조건)에 방치하였다(Kwon et al., 2003). 이온전도도측정기(455C, Isteck Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 72시간 동안 지정된 시간에 이온누출을 측정하였다. 이후 샘플을 121°C 에서 15분 동안 고압증기멸균(autoclave)로 세포의 이온을 방출시켰다. 고압증기멸균 후, 샘플의 이온누출을 재측정하였고, 이들 값을 이용하여 상대이온 누출을 계산하였다.

[92]

[93] <1-8> 논에서 재배된 벼의 농업적 특성 평가

[94] 자연 논조건에서 TG 벼의 수확량을 조사하기 위하여, 한 달 동안 온실에서 자란 WT 벼 및 TG 벼의 4개의 독립계통을 2016년(T_5), 2017년(T_6) 및 2018년(T_7)에 경북대학교 산하 GMO 포장지(군위)에 위치한 논에 $20 \times 60 \text{ cm}$ 의 간격으로 이랑(hill)당 하나씩 이식하였다. 논에서 자란 벼가 성숙하여 이삭이 여물었을 때, 종자를 손으로 수확하였다. 총 식물생체중 (total plant fresh weight, TPW), 줄기 생체중(culm weight, CW), 분얼수(number of tillers, NT), 이랑당 이삭수(number of panicles per hill, NP), 총곡물무게(total grain weight, TGW), 총곡물수(number of

total grain per panicle, NTG), 이삭당 결가지수(number of spikelets per panicle; NSP), 및 천립중(1,000 grain weight, 1000GW) 등의 농업적 특성을 평가하였다.

[95]

[96] <1-9> 통계분석

[97] H₂O₂, MDA, 상대적인 작물학적 특성(agronomic traits)은 WT(야생형)의 벼(100%)를 기준으로 계산하였고, 생화학적 결과를 얻기 위해서는 적어도 3번 실험을 수행하였다.

[98]

[99] <실시예 2> 실험 결과

[100] <2-1> AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 비생물학적 스트레스에 따른 내성 분석

[101] AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼를 온실(glasshouse)에서 비생물학적 스트레스인 염(200 mMNaCl), 저온(15°C), 열(42°C) 및 가뭄 스트레스에 대한 내성을 분석하였다.

[102] 그 결과, AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼에서 대조구인 일미벼(WT)보다 모든 스트레스에서 생존율이 높았다(도 1A).

[103] 또한, AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼를 염과 저온 스트레스에 12시간, 열과 가뭄 스트레스에 24시간 동안 노출 시킨 후 qPT-PCR을 수행하여 AK10206 유전자와 peroxidase(*Prx*) 유전자의 발현을 확인하였다.

[104] 그 결과, AK102606 유전자가 형질전환체에서 대조구 일미에 비해 높게 발현되었고(도 1B), 그로 인해 3 타입의 *Prx* 유전자도 높게 발현되었다(도 1C). 특히 열 스트레스에서 가장 높게 발현되었다.

[105]

[106] <2-2> AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 항산화능 분석

[107] AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 항산화 능력을 확인하기 위해 염, 염 스트레스 7일, 저온 스트레스 4일, 열 스트레스 10일 및 가뭄 스트레스 2일 동안 노출시킨 벼 식물체의 잎에 생성된 활성산소인 H₂O₂와 그로 인해 산화되는 지방산(MDA) 값을 측정하였다.

[108] 그 결과, 대조구 일미에 비해 형질전환체의 활성산소 및 산화된 지방값이 낮았다(도 1D, E).

[109] 결과적으로, 벼의 AK102606 유전자를 도입한 형질전환체가 대조구인 일미벼보다 항산화 유전자의 발현을 증가시키므로 항산화 능력이 증가하였고, 모든 스트레스에 내성을 가졌다.

[110] PEG 10%를 처리한 후 회복시켰을 때 대조구 일미 벼에 비해 AK102606 형질전환 벼의 회복율이 더 높으므로 가뭄 스트레스에 내성을 가지는 것을 확인하였다(도 6).

[111]

[112] <2-3> AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 초기 생육 분석

- [113] 경북 군위군 효령면에 위치한 경북대학교 GMO 실험포장지에 이식 후, 각각의 형질전환 벼 식물체의 초기생육단계를 관찰하기 위하여 이앙 후 4일째 되는 날부터 식물체를 뽑아 뿌리 길이를 측정하고 한 달이 되는 날에는 식물체의 생체량 및 건조량을 측정하였다.
- [114] 그 결과, 초기생육단계에서 지속적으로 형질전환체가 대조구 일미에 비해 뿌리 길이 및 생육 상태가 우수했으며(도 2C), 한 달이 되었을 때 표현형 및 식물의 생체량도 대조구 일미에 비해 AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼에서 우수한 결과를 보였다(도 2A, D).
- [115] 결과적으로, AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼가 대조구 일미에 비해 초기생육단계에서 자연에 대한 적응력이 우수하였다.
- [116]
- [117] <2-4> AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 생육상태와 항산화능력 분석
- [118] AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 묘목을 경북 군위군 효령면에 위치한 경북대학교 실험포장지에 이앙 후, 4주부터 7주까지 분얼 수 증가량과 ROS 염색 및 이온 누출(ion leakage)량 분석하였다.
- [119] 그 결과, 이앙 후 6주에서 7주 사이에 분얼수가 급속히 증가하였고, 대조구에 비해 형질전환체의 증가율이 더 높았다(도 3B). 이앙 후 6주 된 것으로부터 항산화 능력을 확인하기 위해 NBT (슈퍼옥사이드와 결합), DAB (H₂O₂와 결합) 염색을 실시하였고, 대조구 일미벼에 비해 형질전환체의 잎에서 ROS 생산량이 더 낮은것을 확인하였다(도 3C).
- [120] 또한, 동일한 잎에 10 μ M의 MV (광합성저해제 및 ROS 유도제)를 72시간 동안 처리한 후 세포파괴시 누수되는 이온양을 측정하고, 72시간 때 발생한 ROS 양을 확인하기 위해 NBT 염색을 실시한 결과 대조구인 일미벼에서 형질전환체보다 더 많은 ROS가 발생했고 그로 인해 누수된 이온 함량이 높았다(도 3D). 이러한 환경스트레스와 광합성 차단제 및 활성산소 유도제에 대한 항산화 능력이 형질전환체에서 높았기 때문에 결과적으로 상기 실시예 2-3에 나타난 바와 같이 군위 실험포장지에서 초기 표현형과 성장률이 우수한 것이다.
- [121]
- [122] <2-5> AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 수확량 분석
- [123] 2016(T₅), 2017(T₆), 2018(T₇)년 동안 AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 묘목을 경북 군위군 효령면에 위치한 경북대학교 실험포장지에 이앙 후 수확량 검정하였다. 기후조건이 다른 3년 동안 대조구 일미에 비해 형질전환체의 바이오매스 증가를 확인할 수 있는 지표인 전체 식물무게(TPW), 줄기 생체중(CW), 분얼수(NT) 및 이랑당 이삭수(NP)가 모두 증가하였다.
- [124] 또한, 대조구 일미에 비해 형질전환체의 생산성의 증가를 확인할 수 있는 지표인 총곡물무게(TGW), 총곡물수(NTG), 한 이삭당 달려 있는 결가지수(NSP) 및 천립중(1,000 grain weight, 1000GW)이 모두 증가하였다.
- [125] 따라서, AK102606 유전자를 과발현시킨 형질전환체가 대조구인 일미벼보다

다양한 환경 스트레스가 존재하는 자연 논에서의 항산화 능력이 증가하여 초기 생장이 우수했고, 결과적으로 수확량이 증가하였다(도 4).

[126]

[127] <2-6> AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 기온 및 가뭄 스트레스 내성 및 생산성 증대 분석

[128] 2016(T₅), 2017(T₆), 2018(T₇)년 동안 AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 묘목을 경북 군위군 효령면에 위치한 경북대학교 실험포장지에 이양 후 기온 및 강수량을 측정하였다.

[129] 그 결과, 벼가 이양되는 5월-6월에는 평균 10°C 이하의 기온을 나타내며(도 5A), 벼가 한창 성장하는 8월에는 평균적으로 40°C의 기온을 나타낸다(도 5B). 벼가 성숙하는 9-10월에는 5°C 이하로 기온이 떨어진다(도 5A).

[130] 포장지에 이양된 식물들은 의도치 않게, 저온 및 고온 스트레스에 처하게 된다. 그리고 3년 동안 강수량은 매년 차이가 있다(도 5C). 3년 동안 다른 기후 조건에서도 AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 수확량은 지속적으로 유사한 패턴을 보인다(도 4).

[131]

[132] <2-7> AK102606 유전자를 도입한 형질전환 벼의 가뭄 스트레스 내성 분석

[133] AK102606 유전자를 도입한 형질전환체를 10°C의 저온 챔버에서 일정 기간 동안(약 7일) 노출 후, 다시 정상적인 28°C의 챔버로 옮겨 키우며 저온 스트레스에 따른 형질전환 벼의 성장변화를 관찰하였다.

[134] 구체적으로, AK102606 유전자를 도입한 형질전환체 4 plant를 50 ml conical tube에 옮겨서 식물의 물 흡수를 방해하는 polyethylene glycol(PEG) 10%를 처리한 후, 시간에 따른 표현형 변화를 시각적으로 관찰하고, 스트레스를 5일 처리한 후 다시 일반적인 물을 주어 회복하는 것을 관찰하였다.

[135] 그 결과, PEG 10%를 처리한 후 회복시켰을 때 대조구 일미 벼에 비해 AK102606 유전자를 도입한 형질전환체의 회복율이 더 높으므로 가뭄 스트레스에 내성을 가지는 것을 확인하였다(도 6).

[136]

[137] [미생물 기탁증]

[138] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[139] 수탁번호 : KCTC 13810BP

[140] 수탁일자 : 2019213

[141]

[142]

특허 절차상의 미생물기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

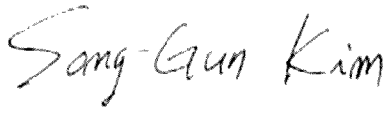
국제적인 양식

기탁증 원본에 관한 수령증

7.1 규칙에 따라 발행 함

받는사람: 경북대학교 산학협력단

대한민국 대구 북구 대학로 80 경북대학교

I. 미생물에 대한 식별	
기탁자에 의해 부여받은 식별표시: <i>Oryza sativa</i> L. <i>japonica</i> AK102606	국제기탁기관으로부터 부여받은 기탁번호: KCTC 13810BP
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학상 명명	
상기 1에서 식별된 미생물은 하기 내용을 수반합니다: [] 과학적인 설명 [] 제안된 분류학상의 명명 (해당하는 곳에 엑스 표시)	
III. 수령 및 승인	
국제기탁국은 위의 1 항에서 확인된 미생물을 수령하여 2019년 2월 13일에 접수하였다.	
IV. 전할 요청 수신	
위의 조건에 부합하는 미생물은 국제기탁국에 접수되었으며, 부다페스트 조약에 의거 한 기탁금으로의 기탁을 요청하였다.	
V. 국제공인기탁기관	
명칭: 한국생물자원센터 주소: 대한민국 전라북도 정읍시 입신길 181 한국생명공학연구원 전북분원 생물자원센터 (우편번호:56212)	권한을 부여받은 사람으로서의 기관 또는 국제기탁의 대표권을 갖는 사람의 서명:  김성건 일자: 2019.2.13

[143]

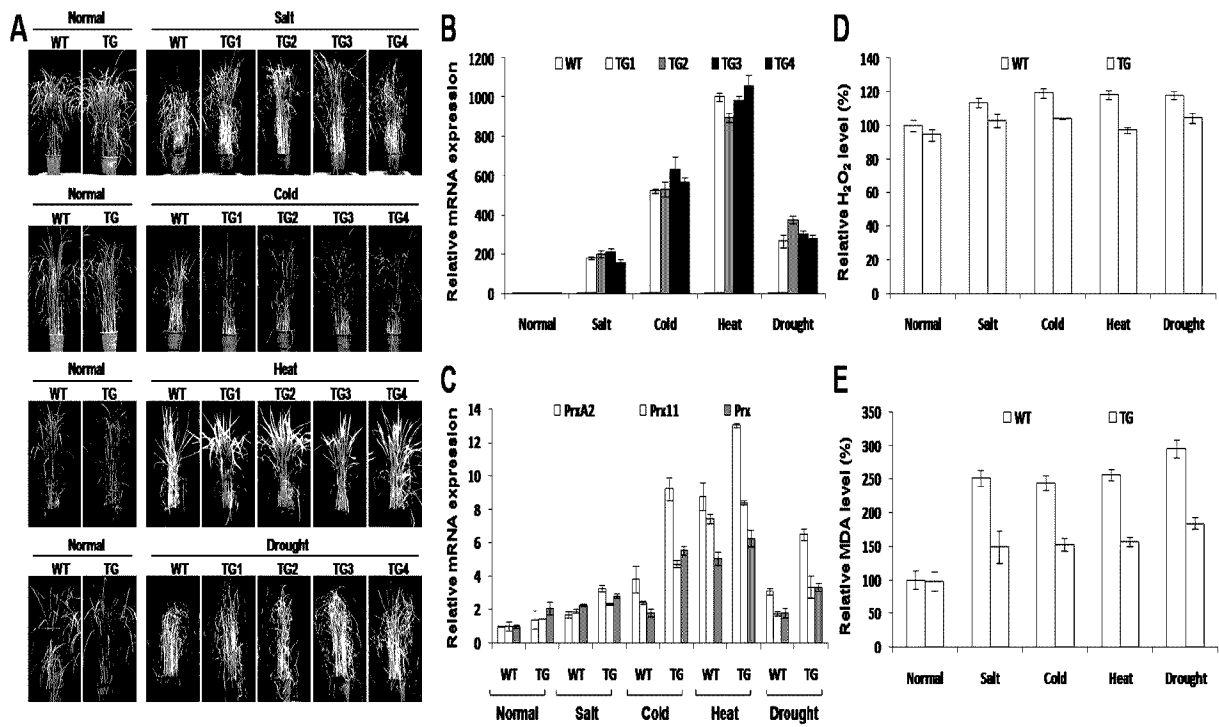
[144]

청구범위

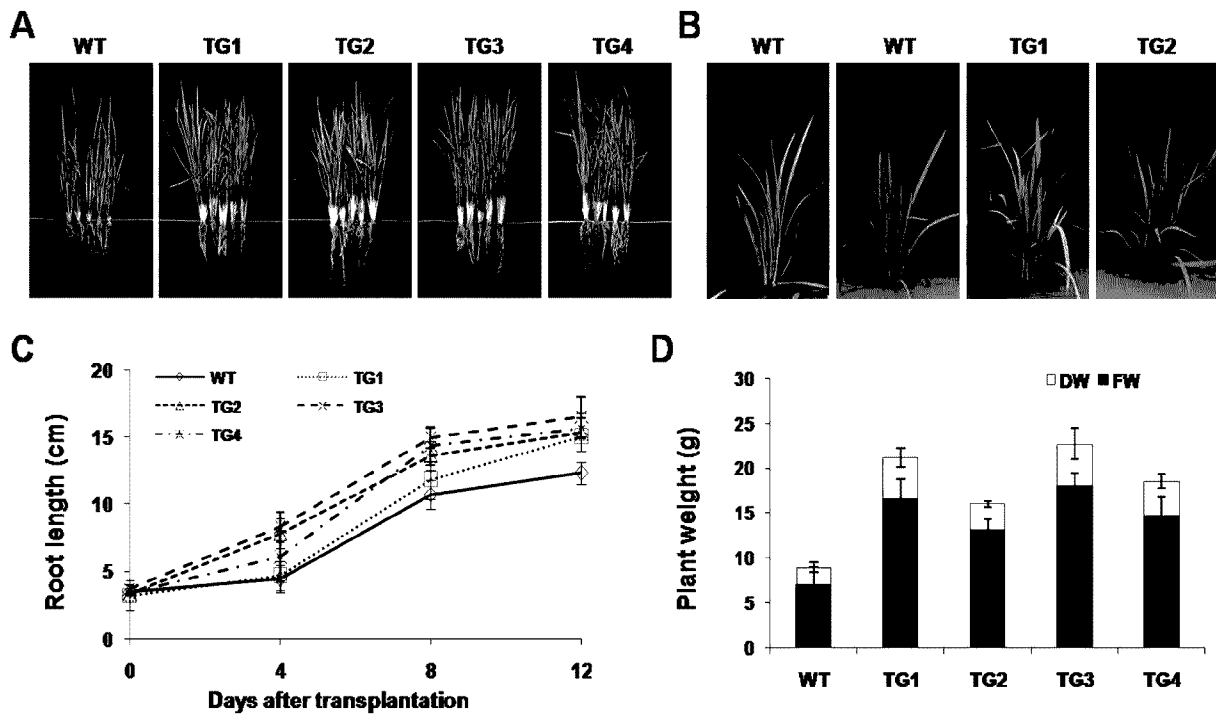
- [청구항 1] 벼(*Oryza sativa*) 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 벼에 형질전환시켜 AK102606 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 환경 스트레스 내성 및 항산화능을 증가시키는 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 환경 스트레스는 염, 저온, 고온 또는 가뭄 스트레스인 것인 방법.
- [청구항 3] 벼(*Oryza sativa*) 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 벼의 식물세포에 형질전환하는 단계; 및
상기 형질전환된 벼 식물세포로부터 벼 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 환경 스트레스 내성 및 항산화능이 증가된 식물체의 제조방법.
- [청구항 4] 제 3항의 방법에 의해 제조된 환경 스트레스 내성 및 항산화능이 증가된 형질전환 식물체.
- [청구항 5] 제 4항에 따른 식물체의 종자.
- [청구항 6] 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 벼(*Oryza sativa*) 유래 AK102606 유전자를 함유하는, 식물체의 환경 스트레스 내성 및 항산화능 증가용 조성물.
- [청구항 7] 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 환경 스트레스 내성 및 항산화능이 증가된 벼(*Oryza sativa* L. *japonica*) AK102606(KCTC 13810BP).
- [청구항 8] 벼(*Oryza sativa*) 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 벼에 형질전환시켜 AK102606 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 바이오매스(biomass) 및 수확량(yield)을 증가시키는 방법.
- [청구항 9] 벼(*Oryza sativa*) 유래 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 벼의 식물세포에 형질전환하는 단계; 및
상기 형질전환된 벼 식물세포로부터 벼 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 바이오매스 및 수확량이 증가된 식물체의 제조방법.
- [청구항 10] 제 9항의 방법에 의해 제조된 바이오매스 및 수확량이 증가된 형질전환 벼 식물체.
- [청구항 11] 제 10항에 따른 식물체의 종자.
- [청구항 12] 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 벼(*Oryza sativa*) 유래 A102606 유전자를 함유하는, 식물체의 바이오매스 및 수확량 증가용 조성물.
- [청구항 13] 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 AK102606 유전자를 포함하는 바이오매스 및 수확량이 증가된 벼(*Oryza sativa* L. *japonica*)

AK102606(KCTC 13810BP).

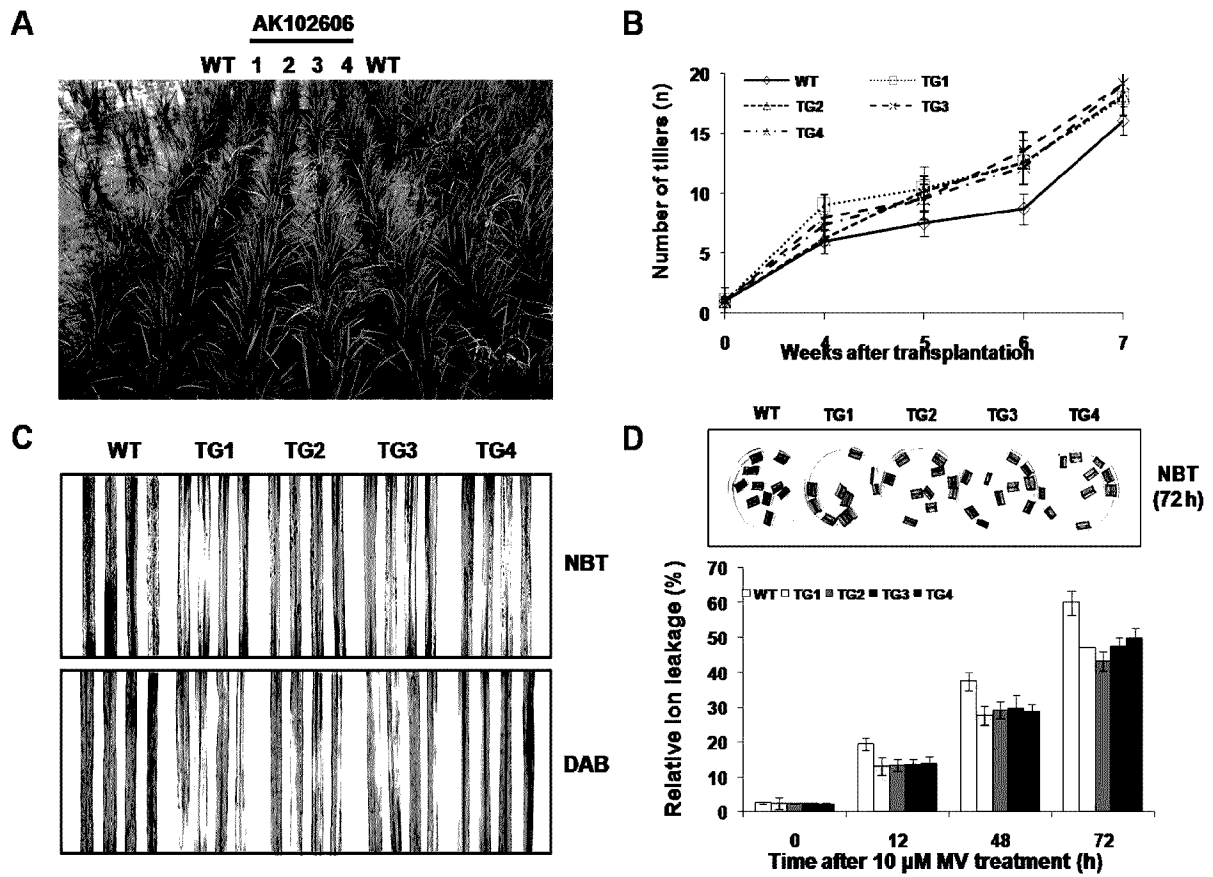
[도1]



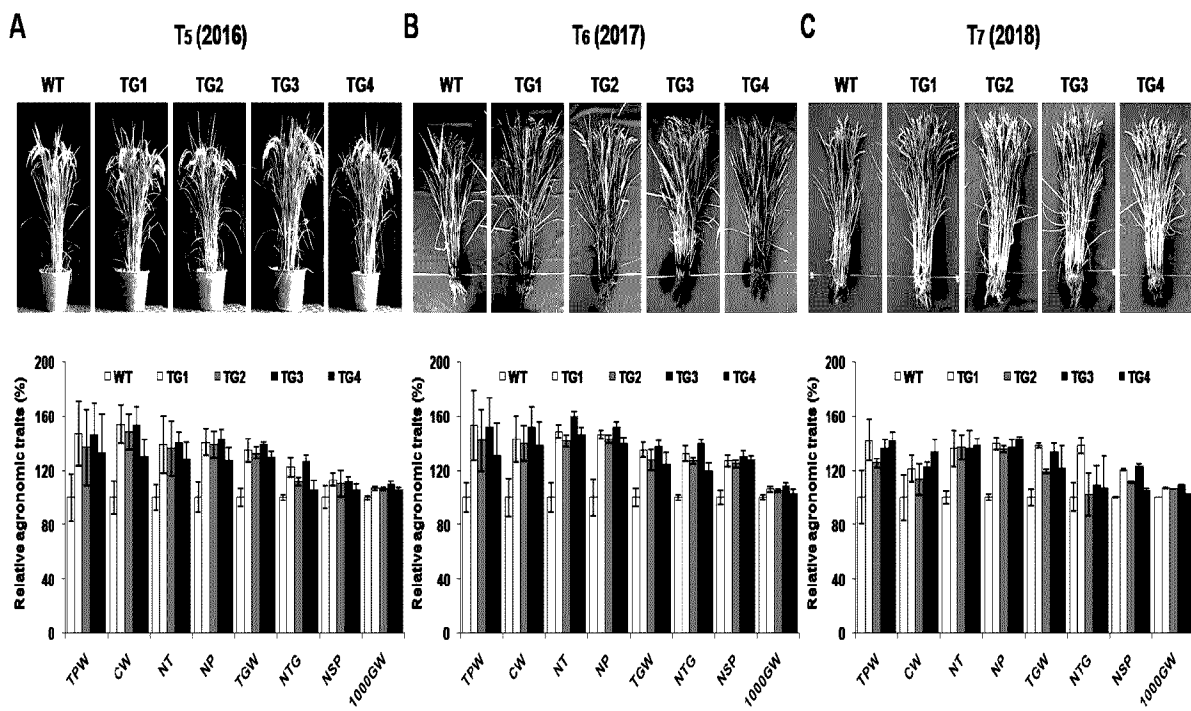
[도2]



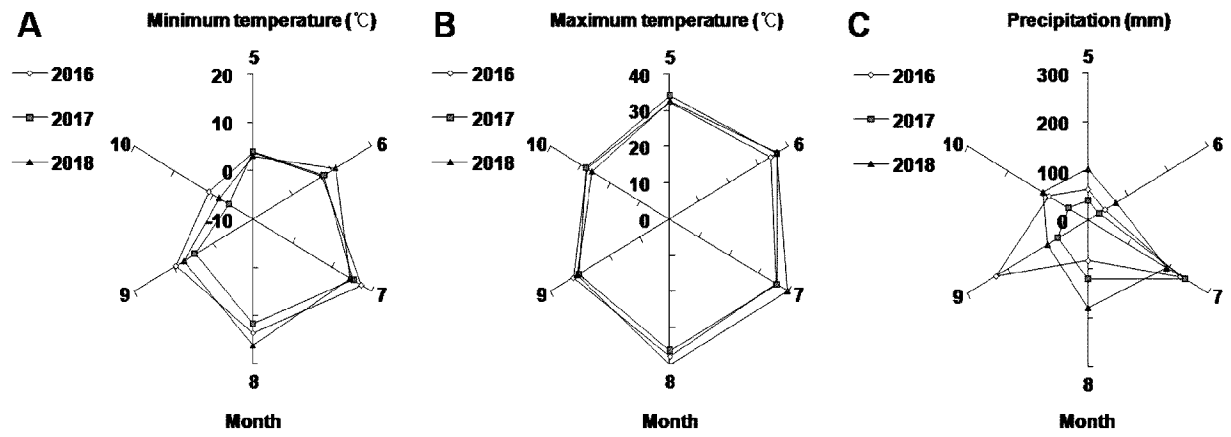
[도3]



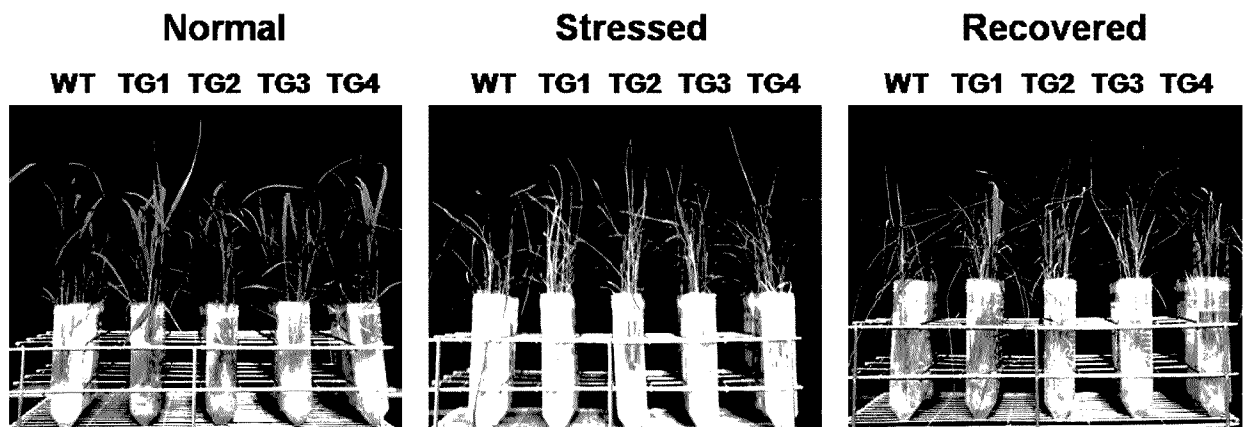
[도4]



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/003087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/82(2006.01)i, C07K 14/415(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; A01H 5/00; C12N 15/29; C12Q 1/68; C07K 14/415

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: oryza sativa, AK102606, overexpression, environmental stress tolerance, anti oxidant effect, biomass, yield

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	김진주 등, PF-60: 글로벌화 가능 신규 재해내성파 수량성 증대 유전자 개발, In: 2018 한국육종학회-차세대BG21 사업-GSP사업 공동심포지엄, 11 July-13 July 2018, 라마다 플라자 호텔, 제주, 대한민국 (KIM, Jinju et al. PF-60: Development and Application of the Global Gene Improving Environmental Adaptation and Grain Yield to Climate Change. In: 2018 KSBS-BG21-GSP Joint Symposium. Ramada Plaza Hotel, Jeju, Korea.) See abstract.	1-13
Y	NCBI, GenBank accession no. AK102606.1 (04 December 2008) See all sequences.	1-13
A	CN 103290023 A (HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY) 11 September 2013 See the entire document.	1-13
A	JP 2005-185101 A (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES et al.) 14 July 2005 See the entire document.	1-13
A	KR 10-2013-0022561 A (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 07 March 2013 See the entire document.	1-13



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

06 DECEMBER 2019 (06.12.2019)

Date of mailing of the international search report

06 DECEMBER 2019 (06.12.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/003087

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 103290023 A	11/09/2013	None	
JP 2005-185101 A	14/07/2005	US 2006-0123505 A1	08/06/2006
KR 10-2013-0022561 A	07/03/2013	KR 10-1273279 B1	11/06/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

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

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/82; A01H 5/00; C12N 15/29; C12Q 1/68; C07K 14/415

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: 벼(oryza sativa), AK102606, 과발현(overexpression), 환경 스트레스 내성(environmental stress tolerance), 항산화 효과(antioxidant effect), 바이오매스(biomass), 수확량(yield)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	김진주 등, PF-60: ‘글로벌화 가능 신규 재해내성과 수량성 증대 유전자 개발’, In: 2018 한국육종학회-차세대BG21 사업-GSP사업 공동심포지엄, 2018.07.11-07.13, 라마다 플라자 호텔, 제주, 대한민국 초록 참조.	1-13
Y	NCBI, GenBank accession no. AK102606.1 (2008.12.04) 전체 서열 참조.	1-13
A	CN 103290023 A (HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY) 2013.09.11 전체 문헌 참조.	1-13
A	JP 2005-185101 A (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES 등) 2005.07.14 전체 문헌 참조.	1-13
A	KR 10-2013-0022561 A (경북대학교 산학협력단) 2013.03.07 전체 문헌 참조.	1-13

☐ 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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 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

2019년 12월 06일 (06.12.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 12월 06일 (06.12.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

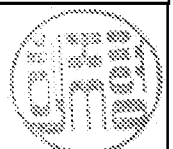
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 103290023 A	2013/09/11	없음	
JP 2005-185101 A	2005/07/14	US 2006-0123505 A1	2006/06/08
KR 10-2013-0022561 A	2013/03/07	KR 10-1273279 B1	2013/06/11