

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0064055
(43) 공개일자 2025년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)
A01H 6/46 (2018.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01) *C12N 9/90* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/825 (2013.01)
A01H 5/10 (2022.05)

(21) 출원번호 10-2023-0148176

(22) 출원일자 2023년10월31일

심사청구일자 2023년10월31일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

하선화

경기도 수원시 장안구 대평로 27, 104동 3202호
(정자동, 화서역 파크푸르지오)

김병훈

경기도 화성시 동탄영천로 108-10, 230동 1216호
(영천동, 동탄2 LH2단지)

이선중

서울특별시 송파구 오금로32길 5, 208동 105호 (송파동, 가락삼익맨션)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 24 항

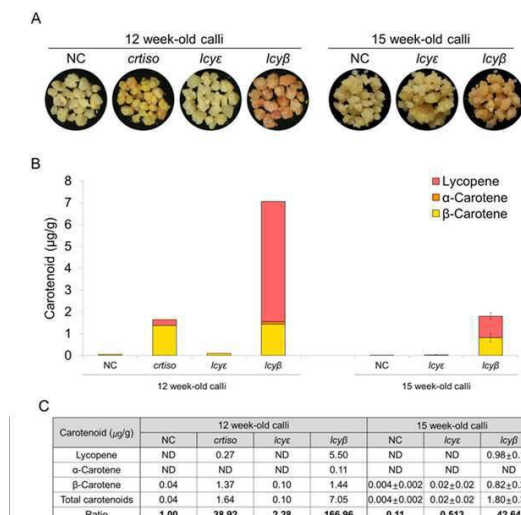
(54) 발명의 명칭 라이코펜이 증가된 형질전환 벼 캘러스 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 라이코펜이 증가된 벼 캘러스 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 상기 벼 캘러스에서 유전자 교정 기술을 이용해 라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, *LCYβ*) 유전자의 기능 상실을 유도함으로써, 라이코펜이 증가되는 효과를 가짐을 특징으로 한다.

이에 따라 상기 형질전환 벼 캘러스는 식량작물에서의 라이코펜 생산을 가능하게 하여, 라이코펜의 새로운 공급원으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A01H 6/4636 (2022.05)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/8205 (2013.01)
C12N 9/22 (2025.05)
C12N 9/90 (2013.01)
C12Y 505/01019 (2013.01)
C12N 2310/20 (2025.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395077378
과제번호	RS-2022-RD009998
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대농작물신육종기술개발
연구과제명	대사경로 조절 유전자교정 벼 변이집단 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

식물세포, 식물캘러스, 또는 이들의 배양물에서 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자의 기능을 상실시키거나, 또는 발현을 감소시키는 단계;를 포함하는, 식물체에서 라이코펜을 증가시키는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 식물세포는 현탁배양세포인 것인, 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 식물은 벼인 것인, 방법.

청구항 4

식물세포, 식물캘러스, 또는 이들의 배양물에서 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자의 기능을 상실시키거나, 또는 발현을 감소시키는 단계;를 포함하는 라이코펜이 증가된 식물의 제조 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 식물은 벼인 것인, 제조 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 유전자의 기능 상실 또는 유전자 발현을 감소시키는 단계는 서열번호 2의 가이드 RNA(guide RNA, gRNA) 및 Cas9 단백질을 식물세포, 식물캘러스, 또는 이들의 배양물에 형질전환하는 것인, 제조 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 형질전환은 Cas9 단백질 및 서열번호 2의 가이드 RNA(guide RNA)를 발현하는 벡터를 포함하는 아그로박테리움과 식물세포, 식물 캘러스 또는 이들의 배양물을 공동배양하여 수행하는 것인, 제조 방법.

청구항 8

라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자의 기능이 상실된 라이코펜이 증가된 식물세포, 식물 캘러스 또는 이들의 배양물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 식물은 벼인 것인 식물세포, 식물 캘러스 또는 이들의 배양물.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 식물세포 또는 식물캘러스는 현탁배양된 것인, 식물세포, 식물 캘러스 또는 이들의 배양물.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자의 기능상실은 서열번호 2의 가이드 RNA(guide RNA, gRNA) 및 Cas9 단백질을 이용한 것인, 식물세포, 식물 캘러스 또는 이들의 배양물.

청구항 12

서열번호 2의 가이드 RNA(guide RNA, gRNA)를 코딩하는 서열을 포함하는, 벼 유래 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자 교정용 재조합 벡터.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 벡터는 Cas9 단백질을 코딩하는 서열을 더 포함하는 것인, 재조합 벡터.

청구항 14

라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자의 기능이 상실된 라이코펜이 증가된 형질전환 식물체.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 식물체는 벼인 것인, 식물체.

청구항 16

제 14항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.

청구항 17

라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는, 식물체의 라이코펜 함량 증진용 조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자는 서열번호 1의 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자인 것인, 조성물.

청구항 19

제 17항에 있어서,

상기 핵산 분자는 T-DNA, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acid), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 또는 RNAi 벡터인 것인, 조성물.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 식물체.

청구항 21

제 20항에 있어서,

상기 식물체는 형질전환된 식물체와 타 식물체의 교배를 통하여 생산되는 자손세대를 포함하는 것인, 식물체.

청구항 22

(a) 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항의 조성물을 식물세포, 식물캘러스, 또는 이들의 배양물에 도입하는 단계;

(b) 상기 식물세포, 식물캘러스, 또는 이들의 배양물로부터 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자 활성이 억제된 형질전환 식물체를 수득하는 단계를 포함하는, 라이코펜 β -사이클라아제

(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자활성이 억제된 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서,

상기 형질전환 식물체는 라이코펜 함량이 증진된 것인, 제조 방법.

청구항 24

제 22항에 있어서,

상기 형질전환 식물체와 타 식물체를 교배하는 단계를 추가로 포함하는, 형질전환 식물체의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벼 유래의 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β)에 대한 유전자 교정을 통해 라이코펜 함량이 증가된 기능성 벼 캘러스 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 라이코펜(Lycopene)은 식물의 2차대사물질인 아이소프레노이드 중 테트라터펜 계열 물질이며, 카로티노이드계 색소중 하나로, 밝은 적색을 띠는 파이토케미컬(phytochemical)이다. 상기 라이코펜은 비록 필수 영양소는 아니지만, 대표적인 항산화 물질로서 지질, 단백질, 및 DNA를 산화적 스트레스로부터 보호하고, 세포성장을 조절하며, 코넥신 43, IGF-, 및 IGF 결합 단백질의 혈액 수준의 발현에 관여하며, 또한 면역 및 염증 과정에 관여한다. 건강에 대한 관심이 지속적으로 증가함에 따라, 라이코펜 이용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이에 따라 상기 라이코펜의 전립선암 등에 대한 치료효과가 알려져 있다(Pan et al., 2018).

[0003] 상기 라이코펜은 조류, 곰팡이, 식물, 및 일부 미생물에서 생산되며(Jaswir, Noviendri, Hasrini, & Octavianti, 2011), 동물은 라이코펜을 포함하는 카로티노이드를 생산할 수 없는 바, 전적으로 식이 공급원에 의존한다(Jaswir et al., 2011). 라이코펜의 주요 공급원은 토마토이며, 수박, 칼라하리 메론, 살수, 파파야, 적포도, 및 구아바 등에도 존재하나, 주요 채소 및 식량작물에는 존재하지 않는다.

[0004] 라이코펜의 추출은 주로 효소, 초음파, 또는 침연(maceration)을 이용하여 이루어지며, 효소 추출법은 상대적으로 불안정하고 비용이 많이 든다는 점, 초음파 추출법은 원료 매트릭스에 라이코펜을 가두어 소화하기 힘들다는 점, 및 침연 추출법은 라이코펜의 회수율이 낮다는 점이 단점으로 지적된다.

[0005] 이에 본 발명자들은 라이코펜의 신속한 대량 생산 시스템을 만들기 위해 노력하던 중, 국가연구개발사업의 일환으로 농촌진흥청 연구사업(과제고유번호: 1395077378, 세부과제번호: RD009998)의 지원을 받아, 식량작물 유래 캘러스인 벼 캘러스에서 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자의 기능상실을 유도하여 라이코펜을 대량으로 축적할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 라이코펜이 증가된 형질전환 벼를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 라이코펜이 증가된 형질전환 벼의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자의 기능이 상실된 라이코펜이 증가된 식물세포, 식물 캘러스 또는 이들의 배양물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자 교정용 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 라이코펜 β -사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCY β) 유전자의 기능이 상실된 라이코펜이 증가된 형질전환 식물체 및 이로부터 형질전환된 종자를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCYβ) 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는, 식물체의 라이코펜 함량 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 식물체의 라이코펜을 증가시키는 방안을 발굴하기 위한 연구를 통해, 라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCYβ) 유전자의 기능 상실을 유도하여 식물체, 구체적으로 식량작물인 벼 캘러스에서 라이코펜의 축적을 확인한 바, 상기 과제에 대한 해결 수단으로 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0013] 이에, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 라이코펜이 증가된 형질전환 벼 캘러스를 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 라이코펜이 증가된 형질전환 벼 캘러스의 제조 방법을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCYβ) 유전자의 기능이 상실된 라이코펜이 증가된 식물세포, 식물 캘러스 또는 이들의 배양물을 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCYβ) 유전자 교정용 재조합 벡터를 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCYβ) 유전자의 기능이 상실된 라이코펜이 증가된 형질전환 식물체 및 이로부터 형질전환된 종자를 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCYβ) 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는, 식물체의 라이코펜 함량 증진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 라이코펜이 증가된 벼 캘러스는 벼 유래 라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCYβ) 유전자를 교정함으로써, 상기 캘러스의 전체 카로티노이드의 증가 및 라이코펜의 축적을 확인한 바, 상기 라이코펜이 증가된 벼 캘러스 및 이의 제조방법은 카로티노이드, 구체적으로는 라이코펜의 공급원으로서의 식량작물을 제조하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 벼의 카로티노이드 생합성 경로를 나타낸 도이다. 카로티노이드 생합성 유전자 중 LCYβ 유전자가 라이코펜을 기질로 α-카로틴과 β-카로틴을 합성함을 확인하였다.

도 2는 벼 유래 LCYβ 유전자의 염기서열을 확인한 도이다.

도 3은 벼 유래 LCYβ의 유전자 구조와 기능상실을 위한 PAM site의 위치를 확인한 도이다. 엑손 1 영역 내에 유전자교정을 위한 gRNA 및 PAM site가 위치하고 있으며, 해당 위치는 ATG 하위 311bp부터 333bp까지임을 확인하였다.

도 4는 벼 LCYβ의 기능상실을 위해 선발한 PAM site에 대응하는 gRNA를 코딩하는 유전자교정 운반체 모식도이며, 본 발명에서는 pRGEB 32 운반체를 사용하였다.

도 5는 LCYβ 유전자가 변이된 형질전환 캘러스의 서열을 확인한 도이다.

도 6은 본 발명의 형질전환 캘러스의 12주차, 15주차 라이코펜 증가여부를 확인한 도이다. 도 6(A)는 LCYβ 유전자의 기능상실로 라이코펜을 기질로 α-카로틴과 β-카로틴을 합성하는 과정이 저하되어 카로티노이드의 증가로 인한 캘러스의 색 변화를 확인한 도이다. 도 6(B) 및 (C)는 HPLC 물질분석을 통해, 12주 배양된 LCYβ 기능상실 캘러스의 전체 카로티노이드가 자연상태 캘러스 대비 약 166배(7.05 μg/g) 증가되었고 라이코펜이 벼 캘러스에서 처음으로 축적(5.50 μg/g)되었음, 및 15주 배양된 LCYβ 기능상실 캘러스에서 베타카로틴과 라이코펜이 각각 0.82, 0.98 μg/g 존재함을 확인한 도이다.

도 7은 벼 유래 LCYβ 유전자가 결실된 캘러스의 각각 22주차, 24주차, 및 26주차의 증식을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게

호릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

- [0022] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.
- [0024] 본 발명의 일 양태로서, 본 발명은 표적 유전자인 베타 유래 LCY-β (Lycopene-beta-cyclase) 유전자의 교정을 이용해 카로티노이드, 구체적으로는 라이코펜이 증가된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 용어 “라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCYβ) 유전자”는 카로티노이드 생합성 경로 중 라이코펜을 기질로 α-카로틴과 β-카로틴을 합성하는 유전자이다. 본 발명의 상기 유전자는 라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCYβ) 단백질을 코딩하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다.
- [0026] 본 발명의 베타 유래의 LCY-β (Lycopene-beta-cyclase) 유전자는 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 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 "서열 상동성의 %"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 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 용어 “캘러스(Callus)”는 식물의 줄기세포라고 불리기도 하는 분화되지 않은 부정형의 세포 덩어리로, 식물 성장 조절 인자의 조절을 통해 잎과 뿌리로 재분화가 가능하다. 상기 캘러스는 주로 식물체에 상처가 났을 때 상처 주변에서 분열이 왕성한 조직으로, 동일한 세포에서 유래한 세포 덩어리와 마찬가지로 균일한 세포 덩어리로 간주되므로, 식물체를 이용한 연구 등의 분야에서 표준 분석 대상으로 사용되기도 한다. 한 개의 세포 덩어리로부터 완전한 식물체를 재분화할 수 있으므로, 특정 유전자를 캘러스에 도입하여 이를 배양 및 재분화함으로써 완전한 식물체를 만들 수 있고, 마찬가지로 모든 세포에 특정 유전자를 가진 형질전환 식물체를 얻을 수 있다.
- [0028] 본 발명의 용어 “유전자 교정”은 인간 세포를 비롯한 동·식물 세포의 유전체 염기서열에 표적지향형 변이를 도입 또는 유도할 수 있는 기술로서, DNA 절단에 의한 하나 이상의 핵산 분자의 결실, 삽입, 치환 등에 의하여 특정 유전자의 기능을 제거 또는 저하시키거나, 단백질을 생성하지 않는 비코딩 DNA 서열로의 변이를 도입할 수 있는 기술을 말한다. 본 출원의 목적상 상기 유전자 교정은 “유전자 편집(gene editing)”이라는 용어와 혼용하여 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 용어 “표적 유전자”는 본 발명을 통해 교정하고자 하는 식물체의 유전체 내에 있는 일부 DNA를 의미하며, 그 유전자의 종류에 제한되지 않고 코딩 영역 및 비-코딩 영역을 모두 포함할 수 있다. 당업자는 그 목적에 따라, 제조하고자 하는 유전체 교정 식물체에 대하여 원하는 변이에 따라 상기 표적 유전자를 선별할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 “식물의 형질전환”은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미하며, 상기 형질전환 방법은 반드시 재생 및/또는 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 상기 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코딩된)입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있으며, 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함

한다.

- [0031] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 식물세포, 식물캘러스, 또는 식물캘러스 배양물에서 LCY- β (Lycopene-beta-cyclase) 유전자의 기능을 상실시키거나, 또는 발현을 감소시키는 단계;를 포함하는, 라이코펜이 증가된 식물체의 제조 방법을 제공한다. 상기 LCY- β (Lycopene-beta-cyclase) 유전자는 바람직하게는 서열번호 1의 LCY- β (Lycopene-beta-cyclase) 유전자일 수 있으며, 상기 식물세포는 현탁배양세포를 포함하며, 상기 제조방법은 구체적으로 하기의 단계를 포함할 수 있다:
- [0032] (a) 벼세포, 벼의 현탁배양세포 또는 벼의캘러스를 준비하는 단계;
- [0033] (b) Cas9 단백질이 코딩된 서열을 포함하는 벡터, 바람직하게는 pRGE32 벡터를 준비하는 단계;
- [0034] (c) LCY- β (Lycopene-beta-cyclase)를 타겟으로 하는 gRNA가 클로닝된 상기 (b)에서 준비한 벡터를 포함하는 아그로박테리움과, 상기(a)에서 준비한 벼 세포, 벼의 현탁배양세포, 또는 벼 캘러스를 공동배양 배지에서 공동 배양하여 형질전환시키는 단계;
- [0035] (d) 상기 (c)에서 공동배양한 벼 세포, 벼의 현탁배양 세포 또는 벼의 캘러스에서의 LCY- β (Lycopene-beta-cyclase) 유전자의 녹아웃을 Sanger 시퀀싱 및 ICE Analysis를 이용하여 확인하는 단계; 및
- [0036] (e) 상기 형질전환된 벼 캘러스를 재분화 배지에서 재분화하는 단계.
- [0037] 상기 제조 방법에 있어서, 식물체의 카로티노이드, 구체적으로는 라이코펜을 증가시키기 위하여, 식물체의 LCY β (Lycopene-beta-cyclase) 유전자를 교정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 실시될 수 있으며, 바람직하게는 CRISPR-Cas9일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 또한 상기 제조방법에 있어서, 유전체가 교정된 식물세포로부터 유전체가 교정된 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있으며, 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물을 재분화시키는 방법을 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 용어 "가이드 RNA(guide RNA)"는 짧은 단일 가닥의 RNA로, 표적 유전자를 암호화하는 염기서열 중 표적 DNA에 특이적인 RNA를 의미하며, 표적 DNA 염기서열과 전부 또는 일부가 상보적으로 결합하여 해당 표적 DNA 염기서열로 엔도뉴클레아제 단백질을 이끄는 역할을 하는 리보핵산을 의미한다. 상기 가이드 RNA는 플라스미드 주형으로부터 전사된 것, 생체 외(in vitro)에서 전사된(transcribed) 것(예컨대, 올리고뉴클레오타이드 이중가닥) 또는 합성한 가이드 RNA 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 상기 가이드 RNA를 이용한 유전자 교정은 TALEN, PRIME editing, CRISPR, CRISPR-Cas9-based base editing, CRISPR-Cas9-based homology-directed repair, 또는 CRISPR-Cas9-based prime editing일 수 있고 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명의 용어 "TALEN"은 "전사 활성화 인자류((transcription activator-like, TAL) effector nuclease)"를 이용한 2세대 유전자 가위 기술로, CRISPR-Cas9 기술과 달리, PAM 부위에 대한 제한 없이 유전체 내에서 원하는 염기서열을 표적화할 수 있다. 상기 TALEN은 두 개의 DNA 결합 도메인(DNA-binding domain)과 하나의 뉴클레이즈 도메인으로 구성되고, DNA 결합 도메인은 DNA의 특정 부위에 결합하여, 뉴클레이즈 도메인이 해당 부위를 절단하도록 한다.
- [0042] 본 발명의 용어 "PRIME editing"은 "검색 및 대체" 게놈 편집 기술로, DNA를 절단하지 않고, 원하는 염기서열을 직접 삽입하거나 제거하는 방식으로 유전자를 교정하는 기술이다.
- [0043] 본 발명의 용어 "CRISPR-Cas9"는 3세대 게놈 편집 도구로, 타겟 DNA를 인식하여 결합하는 guide RNA(gRNA) 및 타겟 DNA를 절단하는 Cas9 nuclease를 이용하여 1세대 게놈 편집 도구인 ZFN (Zinc Finger Nuclease), 및 2세대 게놈 편집 도구인 TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)보다 경제적이고 효율적으로 유전자를 조작할 수 있으며, 상기 "CRISPR-Cas9"는 "RNA 유전자 가위(RNA-guided engineered nucleases, RGENs)"로 불리기도 한다. 이때, gRNA와 PAM 서열의 조작을 통해 CRISPR-Cas9을 특정 유전자 조작에 사용할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 용어 "Cas9 단백질"은 CRISPR-Cas 시스템의 주요 단백질 구성요소로, 활성화된 엔도뉴클레아제로 작용할 수 있는 단백질이다. Cas9 단백질은 이중 가닥 DNA 절단(double stranded DNA break)을 유도한다. Cas9단백질이 정확하게 표적DNA의 염기서열에 결합하여 DNA 가닥을 잘라내기 위해서는 PAM(Protospacer Adjacent Motif)이라 알려진 3개의 염기로 이루어진 짧은 염기서열이 표적 DNA의 염기서열 옆에 존재해야 하며, Cas9 단

백질은 PAM 서열(NGG)로부터 3번째와 4번째 염기쌍 사이를 추정하여 절단한다.

- [0045] 본 발명의 용어 "제조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 말한다. 제조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 제조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0046] 본 발명의 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자 등을 지칭한다. 상기 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있으며, 용어 "전달체" 또는 "운반체"와 호환되어 사용될 수 있다. 본 발명의 제조합 벡터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다.
- [0047] 본 발명의 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 제조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA 및 엔도뉴클레아제 단백질이 도입되는 "식물세포"는 어떤 식물세포도 가능하며, 구체적으로는 현탁배양세포를 포함하는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관, 또는 전체 식물일 수 있고, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 상기 식물세포에 포함되는 식물 조직은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 소포자, 난세포, 종자 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹, 및 캘러스 조직을 포함하며, 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [0050] 본 발명의 용어 "현탁배양세포"는 현탁배양(suspension culture)된 세포를 말하며, 상기 현탁배양은 세포와 세포군집이 액체 배지에 현탁되어 있는 동안 자라고 증식되는 배양 방법을 말한다. 캘러스가 충분히 성장한 경우는 이로부터 현탁 배양 세포주를 유도할 수 있다. 상기 현탁 배양에 사용되는 배지는 캘러스 유도 시 사용된 배지에서 고형화성분, 예를 들어, 한천 등이 제거된 것으로, 캘러스 유도 및 배양과 동일 조성의 배지가 사용될 수 있으며, 경우에 따라 다른 조성의 배지가 사용될 수 있다. 또한 이들 배지는 XAD 수지류, polyvinylpyrrolidone(PVPP), 활성탄 등 갈변화 및 괴사를 막는 성분들을 더 포함할 수 있다. 배지에 첨가되는 이러한 성분들은 현탁 배양세포 유도과정에서 스트레스에 직면한 식물 세포가 분비하는 폐놀계 화합물을 흡착하여 식물 세포의 성장을 촉진하고 안정적인 현탁 배양세포주 유도에 기여할 수 있다. 상기 배지는 산화 방지 목적의 항산화제 성분 등 기타 당업계에서 통상적으로 세포 배양에 사용하는 성분을 더 포함할 수 있다.
- [0051] 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화될 수 있으며, 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지된 방식을 이용할 수 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).
- [0052] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCYβ) 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는, 식물체의 라이코펜 함량 증진용 조성물을 제공한다. 상기 핵산 분자는 T-DNA, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acid), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 또는 RNAi 벡터일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 용어 "핵산(nucleic acids)"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 것으로, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 라이코펜 β-사이클라아제(Lycopene-beta-cyclase, LCYβ) 유전자의 발현을 억제하는 핵산분자는 T-DNA, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 일 수 있고, 이들을 포함하는RNAi 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 본 발명의 용어 "'siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수

있는 짧은 이중사슬 RNA로, 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.

[0056] 본 발명의 용어 " shRNA(short hairpin RNA) "는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드로, in vivo 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루고 있다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.

[0057] 본 발명의 용어 " miRNA(microRNA)"는 단일가닥 RNA 분자로, 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 구성된다. miRNA 는 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 유전자 발현을 억제시킨다.

[0058] 본 발명의 용어 "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.

[0059] 본 발명의 용어 "PNA(Peptide nucleic acid)"는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequenceselectiverecognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol.254: pp1497-1500]). 상기 PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다.

[0060] 본 발명의 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 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 뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질 내로의 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.

[0061] 본 발명의 용어 "T-DNA"는 Agrobacterium 종의 Ti(tumor-inducing) 플라스미드내의 전달(transfer) DNA로, 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.

[0062] 본 발명에서 라이코펜 함량 증진 효과는, 식물체 내에서 라이코펜을 기질로 α -카로틴과 β -카로틴을 합성하는 경로를 저해함으로써, 식물체 내의 라이코펜 함량을 증가시키는 것을 특징으로 한다. 상기 경로 저해는 LCY β 유전자의 발현 억제로 가능하게 된 것이다.

[0063] 이하 본 발명을, 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0064] <실시예 1> 벼에서의 LCY β 유전자 선정

[0065] <1.1> 식물재료의 준비

[0066] 벼 캘러스를 유도하기 위해, 국립농업과학원 유전자원센터에서 분양받은 동진 품종 벼 종자를 70% 에탄올에 2분, 50% 락스에 40분 소독 후, 멸균수로 세척하여 캘러스 유도배지(Chu N6 Medium 4 g/L(Chu C.C, The N6 medium and its application to another culture of cereal crops, Proc. Symp. Plant Tissue Cult., Peking, 43, 1978), 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 2 mg/L, Sucrose 30 g/L, D-Glucose 10 g/L, Gelrite 4 g/L 포함 배지)에 치상하여 32 °C에서 10일간 암배양 하였다.

[0067] <1.2> 라이코펜이 증가된 형질전환 벼의 생산을 위한 타겟 유전자 선택

[0068] 벼의 카로티노이드 생합성 경로는 다이틸렌물질인 GGPP(Geranylgeranyl diphosphate)의 PSY(Phytoene synthase)효소에 의한 동화작용을 시작으로, PDS(Phytoene desaturase), ZISO(Zeta-carotene isomerase) 그리고 ZDS(Zeta-carotene desaturase)효소의 일련의 합성 과정을 통해 Prolycopene이 합성되며, CRTISO(Carotene isomerase)효소의 이성질체화 작용으로 Lycopene(라이코펜)이 합성된다. 이 후 LCY β (Lycopene-beta-cyclase)와 LCY ϵ (Lycopene-epsilon-cyclase)효소의 고리화를 통해 각 β, β 고리를 가진 베타카로틴, β, ϵ 고리를 가진 알파카로틴이 합성 된다.

[0069] 이를 통해 도 1과 같이, 라이코펜의 고리화 작용을 억제하여 과량의 라이코펜을 벼의 캘러스에 축적하기 위해, 카로티노이드 생합성 경로 중 LCY β 유전자(LOC_Os02g09750)를 유전자 교정 타겟으로 선택하였다.

[0070] <실시예 2> 벼의 형질전환

[0071] <2.1> gRNA의 선별

[0072] 실시예 1의 벼 유래 LCY β 유전자(LOC_Os02g09750)의 서열을 확인하기 위해, Rice Genome Annotation Project(<http://rice.uga.edu/>)의 데이터베이스를 이용하였다.

[0073] 이를 통해 도 2와 같이, 상기 벼 유래 LCY β 유전자(LOC_Os02g09750)의 genomic DNA 서열(서열번호 1)을 확보 하였고, 상기 서열을 기반으로 CRISPR RGEN Tools(<http://www.rgenome.net/>)을 활용하여 Cas9의 PAM site(5'-NGG-3')를 분석하였다.

[0074] 이를 통해 도 3과 같이, 이 중 ATG 하위 311bp부터 330bp 위치의 염기서열(서열번호 2: 5'-GGCCCAACAACACTACGGCGTC-3')을 유전자 교정을 위한 gRNA로 선발하였다.

[0075] <2.2> 선발된 gRNA를 암호화하는 운반체의 제작

[0076] 실시예 2.1에서 선발한 gRNA를 운반체 내 gRNA 영역에 클로닝하기 위해, Addgene(Addgene plasmid # 63142; <http://n2t.net/addgene:63142>)에서 Cas9단백질이 코딩된 pRGE32운반체를 구매하였고, 하기 표 1의 프라이머를 제작하였다.

표 1

프라이머 명칭	프라이머 방향	염기서열(5'→3')
LCY β -gRNA_fwd	정방향	cgGGTCTCcAACTACGGCGTCgttttagagctagaa
LCY β -gRNA_rev	역방향	taGGTCTCaAGTTGTTGGCCtgcaccagccggg

[0078] 이후 도 4와 같이, 상기 프라이머를 이용해 증폭한 gRNA 및 pRGE32운반체를 BsaI 제한 효소를 사용하여 절단한 후, T4 DNA ligase를 이용하여 상기 gRNA와 운반체를 연결하는 Golden gate reaction(Xie K, Minkenberg B, Yang Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Mar 17;112(11):3570-5. doi: 10.1073/pnas.1420294112. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25733849; PMCID: PMC4371917.)을 이용하여 pRGE32운반체 내의 U3 snRNA 프로모터 이후 위치에 실시예 2.1의 gRNA를 클로닝하여 LCY β 를 타겟으로 하는 유전자교정 운반체를 제작하였다.

[0079] <2.3> 벼의 형질전환 및 교배

[0080] 실시예 2.2에서 제작된 운반체를 포함하는 아그로박테리움(GV3101)과 실시예 1.1의 벼 캘러스를 공동배양 배지(실시예 1.1의 배지 조성에서 Acetosyringone 100 μ M/L가 첨가된 배지)에서 2~3일간 동안 공동배양하였다. 이후, 캘러스 증식 배지(Chu N6 Medium 4 g/L, 2,4-D 2 mg/L, Sucrose 30 g/L, Gelrite 4 g/L, Hygromycin B 2.5 mg/L, Carbenicillin 250 mg/L)에서 암배양 하면서 2주 간격으로 계대하여 분홍색 라이코펜 캘러스를 선발 하였다. 이후, 상기 캘러스의 gDNA를 추출하여 타겟 영역을 PCR 증폭하여 Sanger 시퀀싱을 진행 하였다. 이로부터 얻어진 서열에 대해 ICE Analysis(<https://ice.synthego.com/#/>)를 사용하여 변이 여부 분석을 진행하였고, 이를 통해 도 5와 같이, 벼 캘러스에서 LCY β 유전자의 gRNA 타겟 영역에 염기서열에 변이가 일어나, 형질전환 이 되었음을 확인하였다.

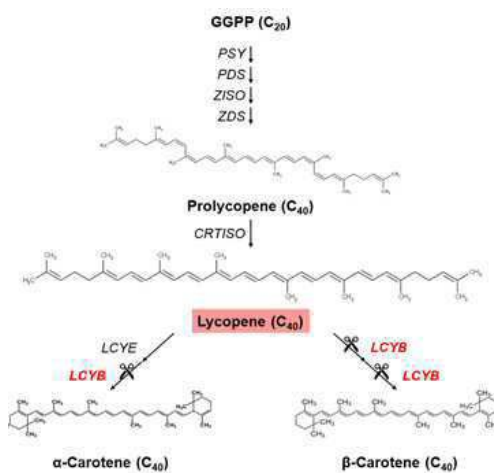
[0081] 상기 형질전환된 벼 캘러스는 재분화 배지에서 재분화 하였다.

[0082] <실시예 3> 형질전환 벼 캘러스의 카로티노이드 측정

- [0083] 실시예 2.2에서 형질전환된 벼 캘러스의 카로티노이드 증가여부를 확인하기 위해, 육안 관찰 및 HPLC 분석을 수행하였다.
- [0084] 먼저, 카로티노이드 중 빨간색을 띠는 라이코펜의 증가여부를 육안으로 확인하였고, 이를 통해 도 6A와 같이, LCY β 유전자의 기능을 상실한 12주차와 15주차 캘러스의 색이 자연 상태의 캘러스보다 더 진한 분홍색과 주황색을 나타냄을 확인하였다.
- [0085] 이후, 상기 캘러스로 HPLC를 이용하여 상기 벼 캘러스의 성분을 분석하였고, 이를 통해 도 6(B) 및 (C)와 같이, 12주차 LCY β 기능상실 캘러스의 전체 카로티노이드가 자연상태 캘러스 대비 약 166배(7.05 $\mu\text{g/g}$) 증가되고 자연상태에는 존재하지 않는 라이코펜이 벼 캘러스에서 처음으로 축적(5.50 $\mu\text{g/g}$)되었음, 및 15주차 LCY β 기능상실 캘러스에서 같은 배양시기의 자연 상태 캘러스에서는 카로티노이드가 거의 존재하지 않는 것에 반해 베타 카로틴과 라이코펜이 각각 0.82, 0.98 $\mu\text{g/g}$ 존재함을 확인하였다.
- [0086] 이후 상기 캘러스를 22주, 24주 그리고 26주 까지 암배양 하였을 때 자연상태 캘러스 보다 진한 주황색을 유지함 및 자연상태 캘러스와 비슷하게 증식됨을 확인하여, 본 발명의 형질전환 벼 캘러스는 카로티노이드, 구체적으로는 라이코펜이 증가되었음을 확인하였다.
- [0087] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



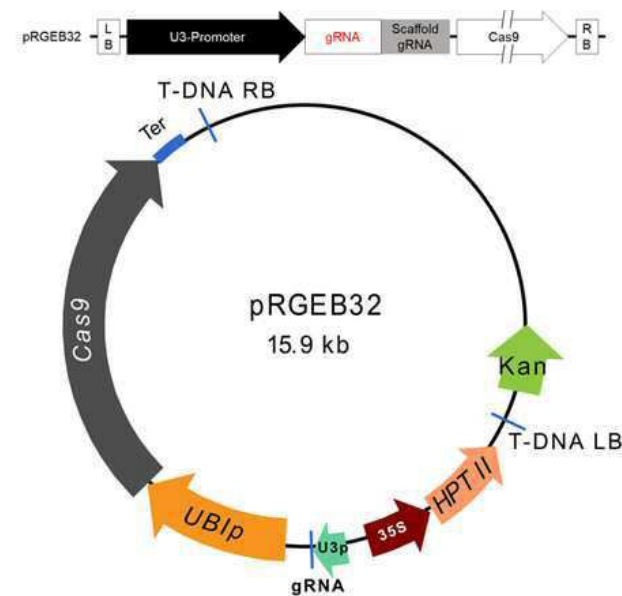
도면2

벼 유래 LCY β 유전자
ATGGCCACCACCGCCCTCCTCTCCGCGCCACCCCTCCTGCAAGCCCCCTCCCCCTCCTCGC CGTCGCGCGCCCCACGCGCGCTCTGTCTGCCGCGCCGCGCCGCGGCGAGGCGCTGCGG TCGCTGGCCCCCGGTCACGCCCCGAGCTGCTCTCCCTCGACCTCCCCGCTACGACCCGCCC GCTCCACCCCGTCGACCTCGCGCTGTCGGCGGCGGCCCGCGGCTCGCGTCGCGCAGC GCGTCGCGGAGGCGGGCTCTCCGTCTGCGCCATCGACCCCTCCCCGCGCTCTGTGGCCAA CAACTACGGCGTCTGGGTGACGAGTTGACGCCATGGGACTCTCCACTGCTCGACGCCGTC TGGCCCTCCGCCACCGTCTTCAACCACGACGACGGCGCGCCAAAGTCGCTCCACCGCCCTAC GCCCGCGTCGCCCCGCCGAAAGTCAAGTCCACCATGATGGACCGCTGCGTCGCCCATGGCGTC ACGTTCCACAAGGCCAGGCTGTCAGGCCGTCACGCGCGAGGCATCTCCCTCTCATCTGCG ACGACGGCGTCGCCGTCCCGGCCACCGTCTGTCGACGCCACGGGTTCTCCCGGTGCCTCG TCCAGTACGACAAGCCGTACGACCCGGGTACAGGTCGCTATGGCATCTCGCCGAGGTGG ACGGACACCCGTTGACATCGACAAGATGCTGTTCATGGACTGGCGCGACGCGCACTCCCCG AGGGGTCCGAGATCAGGGAGCGCAACCGCGCATCCCGACGTTCTCTACGCCATGCCCTCTC CCCGACGAGGATCTTCTCGAGGAGACCTCCCTCGTGGCGCGCCCGGCCCTGCCATGGACGA CATCCAGGAGCGCATGGCGCGGAGGCTGCGCCACCTCGGATACGCGTCGCGCCGTGAGG AGGACGAGCGGTGCGTCATCCCATGGCGGCCCGCTCCCGGTCTCCCGCAGCGGTCGTCG GCATCGGCGGCACCGCGGGATGGTGCAACCGTCCACGGGCTACATGTTGGCGCGCACCTCG CCACTGCGCCATCTGGCGGACGCCATCGTGCGTTCTCTGACACCGCGAGCGGCGACAGCG CGTTGCGCGGCACGCGCTGTGCGCGGAGGTGTGGAGGGAGCTGTGGCGGCGCAGAGGAGG AGGCAGAGGAGTTCTTCGCTTCGGCATGGACATCTCTCAAGCTCGACCTCGACGGCACGC GGCGATTCTTCGACGCTTCTTCGACCTGGAGCGCGCTACTGGCACGGCTTCTGTCTCGAG GCTCTTCTTCCGGAGCTCGCATGTTGCGCTCTCCCTCTTCGCAAGGCCCTCAACACGTCGC GCCTCGAGATCATGGCAAGGGCACCGCCCTCTCGCCAAGATGATCGGCAACCTCATCCAGG ACAGAGATAGGTGA

도면3

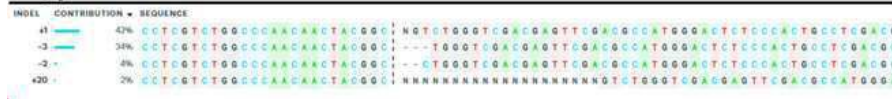


도면4



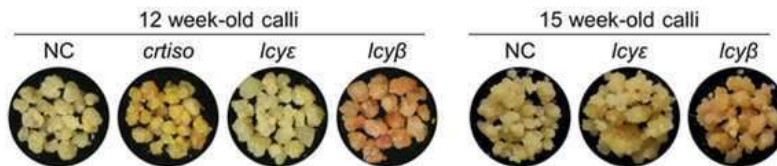
도면5

Icyβ

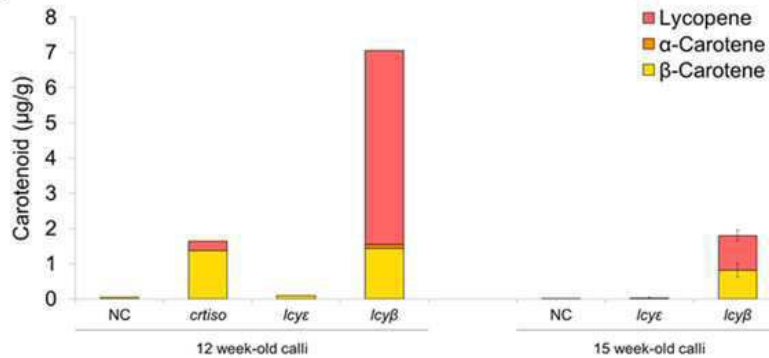


도면6

A



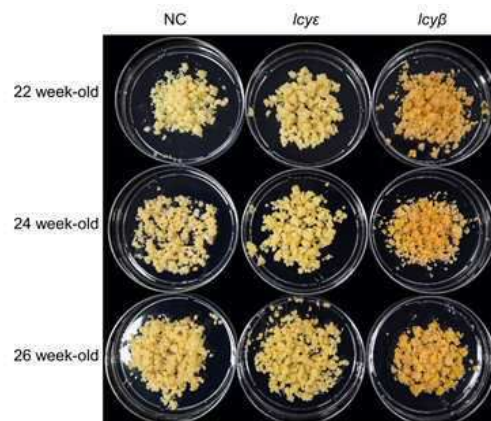
B



C

Carotenoid ($\mu\text{g/g}$)	12 week-old calli				15 week-old calli		
	NC	<i>crts</i>	<i>lcy2</i>	<i>lcy3</i>	NC	<i>lcy2</i>	<i>lcy3</i>
Lycopene	ND	0.27	ND	5.50	ND	ND	0.98 ± 0.15
α -Carotene	ND	ND	ND	0.11	ND	ND	ND
β -Carotene	0.04	1.37	0.10	1.44	0.004 ± 0.002	0.02 ± 0.02	0.82 ± 0.20
Total carotenoids	0.04	1.64	0.10	7.05	0.004 ± 0.002	0.02 ± 0.02	1.80 ± 0.34
Ratio	1.00	38.92	2.28	166.96	0.11	0.513	42.64

도면7



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.