(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2009 년 12 월 30 일 (30.12.2009)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2009/157684 A9

(51) 국제특허분류:
C07K 14/415 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2009/003356

(22) 국제출원일: 2009 년 6 월 23 일 (23.06.2009)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2008-0061565 2008 년 6 월 27 일 (27.06.2008) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **경상대학교산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY)** [KR/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김재연 (KIM, Jae Yean)** [KR/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900-1 6 동 306 호, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR). **진 웅 연 (CHEN, Xiong Yan)** [CN/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900-1 6 동 306 호, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR). **한소 (HAN, Xiao)** [CN/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900-1 6 동 306 호, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR). **임영길 (RIM, Yeong Gil)** [KR/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900-1 6 동 306 호, 600-701 Gyeongsangnam-do (KR). **김선원 (KIM, Seon Won)** [KR/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900-1 6 동 306 호, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: **김순웅 (KIM, Soon Woong)**; 서울시 구로구 구로동 188-5 키콕스벤처센터 209 호, 152-050 Seoul (KR).

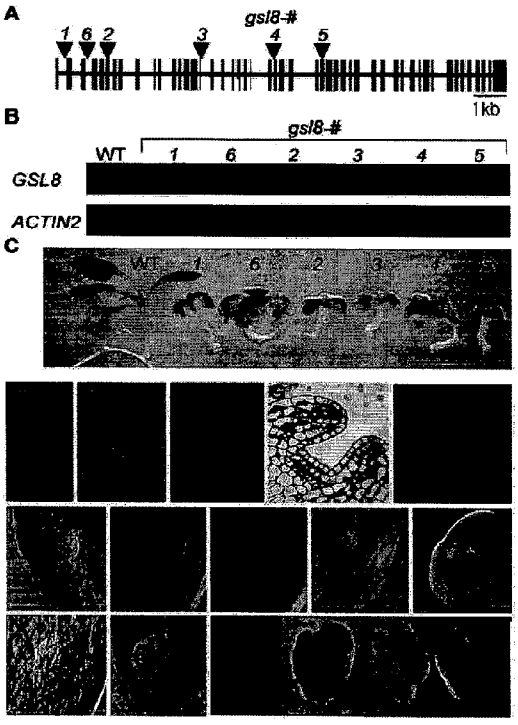
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: GSL8 AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : GSL8 및 이의 용도

【Fig.1】



(57) Abstract: The present invention relates to a GSL8 protein which synthesises callose which is a component of a cell plate formed during cytokinesis in plant cells. The protein plays a role in cytokinesis, cell patterning, plasmodesmata regulation and plastid differentiation in plant cells. Further, the present invention also relates to plant cells which have been transgenically modified using DNA coding for GSL8 protein, and to transgenic plants comprising such cells.

(57) 요약서: 본 발명은 식물세포의 세포질분열 중에 형성되는 세포판의 구성성분인 칼로스(callose)를 합성하는 GSL8 단백질에 관한 것으로서, 상기 단백질은 식물세포의 세포질분열(cytokinesis), 세포 패터닝(cell patterning), 플라스모데스마타(plasmodesmata) 조절 및 플라스티드(plastid) 분화에 관여한다. 또한, 본 발명은 GSL8 단백질을 코딩하는 DNA 로 형질전환된 식물세포 및 이 세포를 포함하는 형질전환된 식물에 관한 것이다.

WO 2009/157684 A9

LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) 국제조사보고서 공개일: 2010 년 6 월 3 일

(48) 본 정정판 공개일: 2010 년 8 월 5 일

(15) 정정사항에 관한 정보:
2010 년 8 월 5 일 자 공지 참조

명세서
GSL8 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 GSL8 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 자세하게는 식물세포의 세포질분열 중에 형성되는 세포판의 구성성분인 칼로스(callose)를 합성하는 GSL8 단백질과 이의 식물세포의 세포질분열(cytokinesis), 세포 패터닝(cell patterning), 플라스모데스마타(plasmodesmata) 조절 및 플라스티드(plastid) 분화 조절인자로서의 용도, 그리고 상기 GSL8 단백질을 코딩하는 DNA로 형질전환된 식물 세포 및 이 세포를 포함하는 형질전환된 식물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 세포질분열(cytokinesis)은 진핵생물의 사이토플라즘(cytoplasm)이 세포분열(mitosis)의 후기 단계 중에 새로이 세포막 및 세포벽을 생성함에 의해 분리되는 과정을 말한다(jurgens 2005; Barr, F. A. and Gruneberg, U. 2007. Cytokinesis: Placing and making the final cut. *Cell* 131: 847-860). 고등 식물은 여러 유형의 세포질분열을 보인다. 그 중에서도 체세포의 세포질분열이 가장 일반적인 유형이고 통상의 세포질분열로서 명명된다(Otegui, M. and Staehelin, L. A. 2000. Cytokinesis in flowering plants: More than one way to divide a cell. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 493-502). 식물 세포는 세포벽을 가지고 있기 때문에 식물 세포의 세포질분열은 동물 세포와는 상이하다. 지질, 단백질 및 세포벽 성분을 포함한 멤브레인 베지클(vesicle)을 분열 판의 중앙으로 전달하는 프라그모플라스트(phragmoplast)라 불리는 식물에 특이적인 역동적 사이토스켈레톤(cytoskeleton)의 배열을 요구하고 세포판을 구축한다. 세포판(cell plate)은 융합 관 네트워크(fusion tube network)로서 시작하여 점점 더욱 많은 성분들이 추가됨에 따라 tubular-vesicular 네트워크(tubular-vesicular network, TVN)가 된다. TNV는 칼로스 및 다른 세포벽 성분이 분해되자마자 유창 멤브레인 시트(fenestrated membrane sheet)가 되고 최종적으로 세포 경계에서 세포막과 융합하여 성장한다(Samuels, A.L., Giddings, T.H., and Staehelin, L.A. 1995. Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: A new model of cell plate formation in higher plants. *J. Cell Biol.* 130:1345-1357). 일차 플라스모데스마타(plasmodesmata, PD)는 세포질분열 중에 ER 세관이 분열하는 세포의 프라그모플라스트를 교차하는 부분에서 구축된다. ER 세관의 밀착된(appressed) 형태가 융합한 베지클 간에 트랩(trap)되고 두 딸세포 간에 사이토플라즈믹 브리지(cytoplasmic bridge)를 형성한다(Staehelin, L.A. and Hepler, P.K. 1996. Cytokinesis in higher plants. *Cell* 84: 821-824; Wright, K. M. and Oparka, K. J. 1996. The fluorescent probe HPTS as a phloem-mobile, symplastic tracer: An evaluation using confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Bot.* 47:

439-445).

[3] 지난 십년 동안 세포질분열이 어떻게 제어되는지 확인하기 위한 시도가 진행되어왔다. 세포질분열을 제어하는 다수의 조절인자가 밝혀졌다. KNOLLE(Lukowitz, W., Mayer, U., and Jurgens, G. 1996. Cytokinesis in the arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell* 84: 61-71.), KEULE(Assaad, F. F., Huet, Y., Mayer, U., and Jurgens, G. . The cytokinesis gene KEULE encodes a Sec1 protein that binds the syntaxin KNOLLE. *J. Cell Biol.* 153: 531-543.), KORRIGAN(Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., and Hofte, H. 1998. A plasma membrane-bound putative endo-1,4-β-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in arabidopsis. *EMBO J.* 17: 5563-5576.), HINKEL(Strompen, G., El Kasmi, F., Richter, S., Lukowitz, W., Assaad, F. F., Jurgens, G., et al. 2002. The arabidopsis HINKEL gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Curr. Biol.* 12: 153-158)에서의 돌연변이는 다면적 표현형(pleiotropic phenotype) 및 묘목에 치명적인 결과를 초래한다. syntaxin의 동족체인 KNOLLE은 SNAP33이라고 불리는 SNAP25 동족체와 SNARE 복합체의 형성에 의한 엑소틴(exocytic) 베지클의 융합에 필요하다(Lukowitz, W., Mayer, U., and Jurgens, G. 1996. Cytokinesis in the arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell* 84: 61-71). KEULE는 KNOLLE와 상호작용함으로써 syntaxin 기능을 제어하는 효모 Sec1p의 동족체를 코딩한다(Waizenegger, I., Lukowitz, W., Assaad, F., Schwarz, H., Jurgens, G., and Mayer, U. 2000. The arabidopsis KNOLLE and KEULE genes interact to promote vesicle fusion during cytokinesis. *Cur. Biol.* 10: 1371-1374). KORRIGAN은 세포질분열 동안에 세포벽 생합성에 필수적인 엔도-1,4-베타-글루칸제이다(Zuo, J., Niu, Q. -., Nishizawa, N., Wu, Y., Kost, B., and Chua, N. H. 2000. KORRIGAN, an arabidopsis endo-1,4-β-glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. *Plant Cell* 12: 1137-1152). HINKEL 유전자는 세포질분열 동안에 프라그모플라스트의 미세관의 재편성에 필요하다(Strompen, G., El Kasmi, F., Richter, S., Lukowitz, W., Assaad, F. F., Jurgens, G., et al. 2002. The arabidopsis HINKEL gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Curr. Biol.* 12: 153-158).

[4] 칼로스는 세포판을 형성하는데 관찰되었고(Kakimoto T. and Shibaoka H. 1988. Cytoskeletal ultrastructure of phragmoplast-nuclei complexes isolated from cultured tobacco cells. *Protoplasma* [Suppl 2]: 95103: Kakimoto, T. and Shibaoka, H. 1992. Synthesis of polysaccharides in phragmoplasts isolated from tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 33: 353-361), 세포판을 발달시키는 유력한 루멘의 성분으로 제안되었다(Samuels, A.L., Giddings, T.H., and Staehelin, L.A. 1995. Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: A new model of cell plate formation in higher plants.

J. Cell Biol. 130:1345-1357). 프라그모플라스트 미세관의 분해 후에 세포벽의 성분을 안정화시키는데 중추적인 역할을 수행한다(Rensing, K. H., Samuels, A. L., and Savidge, R. A. 2002. Ultrastructure of vascular cambial cell cytokinesis in pine seedlings preserved by cryofixation and substitution. *Protoplasma* 220: 39-49). 칼로스 분해가 카페인 처리에 의해 차단된 후 베지클의 융합 네트워크가 개별 베지클로 빠르게 분해되어 결국 부서지게 되었다(Samuels, A. L. and Staehelin, L. A. 1996. Caffeine inhibits cell plate formation by disrupting membrane reorganization just after the vesicle fusion step. *Protoplasma* 195: 144-155). 방사성 동위 원소를 이용한 분석에 의해 칼로스 합성은 ER 또는 Golgi 보다 세포판에서 일어나는 것으로 확인되었다(Kakimoto T. and Shibaoka H. 1988. Cytoskeletal ultrastructure of phragmoplast-nuclei complexes isolated from cultured tobacco cells. *Protoplasma* [Suppl 2]: 95103). 이는 GSL6이 세포판 발생 중에 칼로스 합성에 관여하는 세포판 특이적인 칼로스 신타제(synthase)라는 보고에 의해서도 뒷받침된다(Hong, Z., Delauney, A. J., and Verma, D. P. S. 2001a. A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell* 13: 755-768).

[5] 그러나, 세포질분열 중에 칼로스의 중요한 역할이 제안되어 왔음에도 불구하고 세포판 발생에서 칼로스의 관여에 대해서 직접적인 기능적 증거는 입증되지 못하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명자는 식물세포의 세포질분열 중에 형성되는 세포의 구성성분인 칼로스를 형성하는 GSL8 유전자를 동정하였고, 이 유전자의 돌연변이에 의해 단백질이 결여된 아라비도프시스(*Arabidopsis*) 돌연변이체는 세포질분열, 세포 패터닝, 플라스모데스마타 기능 및 플라스티드 분화에도 돌연변이 표현형을 보인다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[7] 따라서, 본 발명은 한 관점으로서, 식물세포의 세포질분열 중에 형성되는 세포판의 구성성분인 칼로스를 합성하는 GSL8 단백질을 제공한다.

[8] 특히, 상기 GSL8 단백질의 식물세포의 세포질분열 조절인자, 세포 패터닝 조절인자, 플라스모데스마타 조절 및 식물세포의 플라스티드 분화 조절인자로서의 용도에 관한 것이다.

[9] 본 발명은 다른 관점으로서, 상기 GSL8 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[10] 또 다른 관점으로서, 상기 GSL8 단백질을 코딩하는 유전자로 형질전환된 식물세포를 제공한다.

[11] 또 다른 관점으로서, 상기 세포를 포함하는 형질전환된 식물을 제공한다.

기술적 해결방법

[12] 본 발명은 식물세포의 세포질분열 중에 형성되는 세포판의 구성성분인

칼로스를 합성하는 GSL8 단백질에 관한 것이다.

[13] 세포질분열(cytokinesis)은 세포질이 딸세포로 나누어지는 과정을 의미하는 것으로, 통상 세포분열의 후기에 일어난다. 특히 식물세포에서는 세포질분열 중에 세포판이 형성되는데, 이의 주요 구성성분이 칼로스(callose)이다. 본 발명의 GSL8(Glucan Synthase-Like 8) 단백질이 칼로스 합성에 관여한다.

[14] 본 발명의 GSL8 단백질은 아라비도프시스(*Arabidopsis*) 뿐만 아니라 임의의 식물로부터 유래된 대응 단백질(homolog 또는 ortholog)일 수도 있으나, 바람직하게는 아라비도프시스로부터 유래된 것이다.

[15] 본 발명의 GSL8을 코딩하는 *gsl8* 유전자가 돌연변이된 식물에서 세포질분열의 결함이 확인되었다. 세포질분열에 결함이 있는 경우에는 정렬되지 않은 세포 파일(disorganized cell file), 세포벽 스터브(stub) 및 다핵 세포 등이 보이는 것으로 공지되어 있다. 본 발명의 실시예에서 *gsl8* 유전자가 돌연변이된 식물 즉, 묘목(seedling)과 배아(embryo)가 상기된 바와 같은 특징을 보이는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 GSL8 단백질이 식물세포의 세포질분열을 조절할 수 있는 단백질임을 의미한다.

[16] 또한, 본 발명의 GSL8을 코딩하는 *gsl8* 유전자가 돌연변이된 식물에서 세포 패터닝의 결함이 확인되었다. 세포 패터닝(cell-paterning)이란 식물세포에서 특정 세포가 지정된 순서와 개수에 따라 배열되는 규칙을 의미한다. 예를 들면, 기공 세포와 또 다른 기공 세포가 그들의 사이에 기공 세포가 아닌 다른 하나 이상의 표피 포가 위치함으로써 떨어져 위치하는 현상을 들 수 있다. *gsl8* 돌연변이체에서 이러한 규칙이 유지되지 않았다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 GSL8 단백질이 식물세포의 세포 패터닝을 조절할 수 있는 단백질임을 의미한다.

[17] *gsl8* 돌연변이는 플라스모데스마타의 기능이 되지 않는 돌연변이 표현형을 보인다. 즉, 정상식물과 달리 *gsl8* 돌연변이에서는 세포간 플라스모데스마타에 의해 연결된 심플라스믹한(symplasmic) 채널이 막혀있다는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 GSL8 단백질이 식물세포의 플라스모데스마타 채널을 조절할 수 있다는 것을 의미한다.

[18] 아울러, 본 발명의 GSL8을 코딩하는 *gsl8* 유전자가 돌연변이된 식물에서 플라스티드(plastid) 분화에서의 결함이 확인되었다. 즉, 본 발명의 일실시예에서 *gsl8* 돌연변이체는 야생형과 비교하였을 때 덜 쌓인 틸라코이드 멤브레인과 더 큰 크기의 전분 입자를 포함하는 것으로 입증되었다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 GSL8 단백질이 식물세포의 플라스티드 분화를 조절할 수 있다는 것을 의미한다.

[19]

[20] 또한, 본 발명은 본 발명의 GSL8 단백질을 코딩하는 유전자에 관한 것이다. 상기 유전자는 아라비도프시스에서 유래된 것이 바람직하다.

[21]

[22] 또한, 본 발명은 본 발명의 GSL8 단백질을 코딩하는 유전자로 형질전환된 식물

세포에 관한 것이다.

[23] GSL8 단백질을 코딩하는 유전자는 당업계에 공지된 gsl8 유전자의 염기서열을 참조하여 이의 말단 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이를 작제한 후 이를 프라이머로 하고 특정한 식물 세포의 지노믹 DNA나 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행함으로써 수득할 수 있다.

[24] 본 발명에서 형질전환은 식물 세포를 형질전환시키는 것으로 공지된 모든 방법이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 아그로박테리움(agrobacterium) 또는 유전자 총(gene gun)을 이용하는 방식에 의해 달성될 수 있다.

[25]

[26] 아울러, 본 발명은 전술된 식물 세포를 포함한 식물에 관한 것이다. 즉, GSL8 유전자로 형질전환된 식물에 관한 것이다. 이 식물은 또 다른 유전자로 형질전환된 식물일 수 있다.

[27]

[28] 추가로 비정상적인 세포질분열, 세포 패터닝, 플라스모데스마타 기능 및 플라스티드 분화 특성을 보이는 식물을 확보한 경우, 상기 식물의 *gsl8* 유전자의 서열을 분석함으로써 상기된 비정상적인 표현형의 원인을 확인할 수 있다.

유리한 효과

[29] 본 발명에 따라 동정된 식물세포의 세포질분열 중에 형성되는 세포의 구성성분인 칼로스를 형성하는 GSL8 단백질은 세포질분열, 세포 패터닝, 플라스모데스마타 기능 및 플라스티드 분화를 조절할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[30] 도 1은 GSL8의 기능이 상실된 돌연변이체를 나타낸 것이다(A에서 화살표는 T-DNA 삽입 위치를 나타내고, 녹색으로 표시된 부분은 엑손을, 그 이외의 부분은 인트론을 나타낸다).

[31] 도 2는 GSL8이 세포 패터닝에 관여한다는 것을 보여주는 사진이다.

[32] 도 3은 GSL8이 플라스티드의 분화에 관여한다는 것을 보여주는 사진이다.

[33] 도 4는 GSL8이 세포질분열에 관여한다는 것을 보여주는 것이다.

[34] 도 5는 GSL6의 기능이 상실된 돌연변이체를 나타낸 것이다.

[35] 도 6은 GSL8 돌연변이체는 심플라즈믹으로 분리된 세포 패치를 유발시킨다는 것을 즉, 플라스모데스마타의 기능에 관여한다는 것을 보여주는 사진이다.

[36] 도 7은 GSL8 돌연변이는 플라스모데스마타의 구조와 빈도를 변경시키는 것이 아니라 GSL 패밀리의 일부 유전자의 발현과 세포 패터닝 관련 유전자의 발현을 변경시킴을 보여주는 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[37] 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만, 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 국한되는 것은 아니다.

[38]

[39] **실시예 1: 재료 및 방법**

[40] **실시예 1-1: 식물 물질 및 성장 조건**

[41] 본 실시예에서 이용된 모든 아라비도프시스(*Arabidopsis*) 돌연변이주 및 야생형 식물은 Columbia(Col) background에 있는 것이다. 종자는 별도로 언급하지 않는 한, 20%의 상업적으로 입수 가능한 표백제 및 0.1% Triton X-100으로 5분 동안 멸균하고, 멸균수로 3차례 세정하고, 4 °C에서 3일 동안 저장하였다. 종자는 1x MS 염 및 0-3% 수크로오스 (pH5.8)를 함유하는 0.6%의 아가 고체 배지 상에 뿌려주었다. 성장 조건은 토양 또는 MS 플레이트 상에서 16시간 낮/8시간 밤 주기를 갖는 25 °C에서 이루어졌다.

[42] gsl8-1(SALK_111094), gsl8-2(GABI_851C04), gsl8-3(SALK_057120), gsl8-4(SALK_109342), gsl8-5(SAIL_21_B02), gsl8-6(SAIL_679_H10) 및 korrigan (SAIL_1219_D08)은 ABRC(Arabidopsis Biological Resource Center)로부터 입수하였다. 상기 모든 대립 유전자에서 T-DNA 삽입 부위를 결정하기 위하여, 각각의 좌측 보더 프라이머(left border primer) 및 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 증폭된 PCR 산물을 서열 분석하였다. PCR을 기반으로 한 genotyping을 위한 프라이머 서열은 Salk Institute Genomic Analysis Laboratory at http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html.로부터 수득하였다. *GSL8* 및 *KORRIGAN*의 모든 돌연변이 대립유전자의 동형접합은 PCR genotyping 및 RT-PCR에 의해 확인되었다. 모든 다른 GSL 유전자의 T-DNA 돌연변이주는 표 1에 나타내었다. 칼로스는 1주령의 야생형 및 *gsl8* 묘목으로부터 잘라낸 야생형 및 *gsl8* 자엽(cotyledons)으로부터 유도하여 Encina et al. (Encina, C. L., Constantin, M., and Botella, J. 2001. An easy and reliable method for establishment and maintenance of leaf and root cell cultures of arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol. Rep.***19:** 245-248.)에 개시된 배지 상에서 배양하였다.

[43] 표 1

GLS 패밀리 유전자에 대한 T-DNA 삽입주

GSL 유전자	T-DNA
GSL1-2	SALK_006933
GSL1-3	GABI_236G11
GSL2-1	SALK_009234
GSL2-2	SALK_026354
GSL2-3	SALK_072226
GSL2-4	GABI_202H11
GSL3-1	SALK_011560
GSL3-2	GABI_173H06
GSL3-3	SAIL_1276_E05
GSL4-1	GABI_747G02
GSL4-2	SALK_047978
GSL4-3	GABI_340H04
GSL4-4	SALK_076074
GSL5-1	GABI_089H05
GSL5-3	SALK_002911
GSL5-4	SAIL_294_D06
GSL7-1	SALK_048921
GSL7-2	GABI_236G12
GSL7-3	GABI_190G11
GSL7-4	SAIL_114_A01
GSL8-1	SALK_111094
GSL8-2	GABI_851C04
GSL8-3	SALK_057120
GSL8-4	SALK_109342
GSL8-5	SAIL_21_B02
GSL8-6	SAIL_679_H10
GSL9-1	SALK_046971
GSL9-2	SALK_009569
GSL9-3	SALK_104018

GSL10-1	GABI_038F11
GSL10-3	SALK_112778
GSL10-4	SALK_143945
GSL11-1	SALK_019534
GSL11-2	SALK_042354
GSL11-3	GABI_631C08
GSL12-1	SALK_003469
GSL12-2	SAIL_402_B10
GSL12-3	CSHL_GT938

[44] 표 2

PCR에 의한 GSL8에서 T-DNA의 유전형 분석에 이용된 프라이머

프라이머 명칭	프라이머 서열	서열번호
GSL8-1 LP	5'-TAGTTCCGCAGACAAAGTTGC-3'	5
GSL8-1 RP	5'-TCACATGCATATAGCTGTGGG-3'	6
GSL8-2 LP	5'-TTCAGAAGTTGCATCTGCATG-3'	7
GSL8-2 RP	5'-ACACTCTGGAAGAAAGCGGAC-3'	8
GSL8-3 LP	5'-CTTATGTATGGCGCCTACAGC-3'	9
GSL8-3 RP	5'-CACCACAGGTGAATTCAGATATG-3'	10
GSL8-4 LP	5'-GCATCACACCAGCCTAAAATC-3	11
GSL8-4 RP	5'-ATATGCTGCGATGTTTTCACC-3'	12
GSL8-5 LP	5'-CCCAAGCCTCGTCTTTCTAAG-3'	13
GSL8-5 RP	5'-GGTTTACTTGCCCTCACAAATC-3'	14
GSL8-6 LP	5'-GGGACTGTGCATTTGAAAGTG-3'	15
GSL8-6 RP	5'-TTTCATTCGGCAGTGATTTTC-3'	16
SALK LB1	5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'	17
SAIL LB3	5'-TAGCATCTGAATTTCATAACCAATCTCGATACAC-3'	18
GABI LB1	5'-CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC-3'	19

[45]

[46] 실시예 **1-2: RNA** 추출 및 **RT-PCR**

[47] 식물 조직을 회수하고 총 RNA를 TRIzol(Invitrogen)을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 분리하였다. DNA가 제거된 총 RNA의 1㎍을 올리고(dT) 프라이머 및 역전사효소 (M-MLV RTase, SolGent)를 사용하여 역전사하였다. PCR 증폭을 위한 조건은 96℃에서 3분, 이어서 94℃에서 30초, 55℃에서 45초 및 72℃에서 30초를 유지하는 것을 1 주기로 하여 30회 수행하였다. 액틴 2 전사체가 내부 대조군으로서 증폭되었다. 프라이머 서열은 다음과 같다:

[48] GSL8의 경우에는 AtGSL8-d1 5'-CCCTCTGGATTTGAATGGCA-3'(서열번호: 1)과

[49] AtGSL8-r1 5'-GGCTAAAGAGAGTAGAGCCC-3'(서열번호: 2),

[50] 액틴2의 경우에는 Act2-d1 5'-TCAATCATGAAGTGTGATGTGG-3'(서열번호: 3)과

[51] Act2-r1 5'-TTAGAAACATTTTCTGTGAACGAT-3'(서열번호: 4).

[52]

[53] **실시예 1-3: 현미경 분석**

[54] 돌연변이 배아의 표현형 분석을 위하여 발생중인 종자를 야생형 및 이형접합체형 gsl8 식물의 상이한 발달 단계에서 장각과(silique)로부터 수집하고, 즉시 Hoyer's 용액(50g의 클로랄 하이드레이트, 3.75g의 아라빅 검 및 15ml의 증류수에 용해된 100% 글리세롤 2.5ml)으로 30분 동안 세정하였다. 세정된 종자는 Nomarski DIC optics을 구비한 Olympus FV1000 공초점 현미경으로 분석하였다.

[55] 전자 현미경으로 스캐닝하기 위하여 야생형 및 gsl8 돌연변이의 신선한 자엽 및 잎을 0.1M sodium cacodylate (pH 7.4) 완충용액에 용해된 2.5% 글루타르알데히드로 4℃에서 하룻밤 동안 고정하고, 이어서 동일한 완충용액에 용해된 1% osmium tetroxide(OsO_4)로 4℃에서 하룻밤 동안 고정하였다. 샘플은 점진적 에탄올 시리즈에서 (30, 50, 70, 80, 95 및 100%; 각각 1시간 동안) 탈수되었고, Autosamdri-815 critical point dryer (Tousimis Co., USA)에서 건조시켰다. 시료는 carbon tape stub 상에 올려놓고, 금으로 코팅한 후 JSM-6380LV (JEOL co., Japan)로 관찰하고 디지털 현미경 카메라로 기록하였다.

[56] 조직학적 및 TEM 분석을 위하여 조직 샘플을 50mM PBS(pH6.8)에 용해된 2% 글루타르알데히드로 4℃에서 12 내지 24시간 동안 고정하고, 1% osmium tetroxide(OsO_4) 완충용액으로 4℃에서 하룻밤 동안 후고정하였다. 이어서 시료를 에탄올 시리즈를 통하여 탈수하고 Epon-812 레진에 포매하고 60℃에서 48시간 동안 중합체화하였다. semithin 절편(1㎛) 및 ultrathin 절편(70nm)을 ultracutmicrotome (EM UC6, Leica)을 사용하여 절단하였다. Semithin 절편은 톨루이덴 블루 O(toluidine blue O)로 염색하여 광 현미경(Axioplan 2, Zeiss) 하에서 조사하였고 사진촬영을 디지털 카메라로 수행하였다. Ultrathin 절편은 슬롯 상에 올려서 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 염색하고, 리드 아세테이트(lead citrate)로 염색하여 Philips TECNAI 12 투과 전자 현미경으로

촬영하였다.

[57]

[58] **실시예 1-4: 염료 로딩 에세이**

[59] 염료 로딩 에세이는 Wright et al.(Wright, K. M. and Oparka, K. J. 1996. The fluorescent probe HPTS as a phloem-mobile, symplastic tracer: An evaluation using confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Bot.* 47: 439-445)로부터 수정된 것이다. 즉, 멸균된 야생형 종자 및 *gsl8*과 korrigan 이형접합성 식물의 자손은 3% 수크로오스 및 0.6% 식물 아가를 갖는 MS 플레이트 상에서 5-10일 동안 배양하였다. 야생형 묘목 (5일째) 및 확인된 동형접합성 *gsl8-4* 및 Korrigan 돌연변이 묘목 (10일째)의 뿌리 tip 또는 자엽 tip을 날카로운 칼날로 절개하여 염료의 침투를 가능하게 하고. 1.0-2.0㎕의 HPTS-아세테이트 (5 mg/ml)를 적용하였다. 상기 묘목은 30-60분 동안 이동(translocate)하게 한 후 해부(dissection) 현미경(SZX12, Olympus)으로 촬영하고 공초점 현미경(FV1000, Olympus)으로 조사하였다.

발명의 실시를 위한 형태

[60] **실시예 2: 세포질분열 중 중요 역할 인자를 동정하기 위하여 GSL 패밀리 멤버의 T-DNA 삽입주를 분리함**

[61] GSL 패밀리 11멤버 중에서 GSL10을 제외한 10개의 유전자에 대하여 동종접합의 T-DNA 타겟 라인을 수득하였다. GSL10에서의 돌연변이 대립유전자는 수컷 배우자체(gametophytic)에 치명적이라는 것이 알려져 있다(TA., Brownfield L., Neu C., Twell D., and Schulze-Lefert P. 2008. Dual function of Arabidopsis glucan synthase-like genes GSL8 and GSL10 in male gametophyte development and plant growth. *Plant J.* 54: 911-23). GSL 패밀리의 10개의 동종접합의 돌연변이 중에서 GSL8에서의 돌연변이가 심각한 묘목 표현형을 유발한(도 1c) 반면, 모든 다른 GSL 돌연변이는 야생형과 유사한 형태학적 및 발생학적 표현형을 보여주었다.

[62]

[63] **실시예 3: *gsl8* 돌연변이 묘목은 세포 패터닝 결함을 갖는 다면적 표현형을 보임**

[64] GSL8에 대하여 동종접합의 T-DNA 삽입주를 분리하였고(표 3), 또한, 공지된 2개의 대립유전자에 추가하여 4개의 돌연변이 대립유전자를 분리하였다(TA., Brownfield L., Neu C., Twell D., and Schulze-Lefert P. 2008. Dual function of Arabidopsis glucan synthase-like genes GSL8 and GSL10 in male gametophyte development and plant growth. *Plant J.* 54: 911-23). 총 6개의 독립적인 동종접합(homozygous)의 *gsl8* 돌연변이 대립유전자에서 묘목은 치사되고 대부분 동일한 복수의 표현형을 보여 GSL8 유전자 기능의 파괴는 심각한 표현형을 발현하게 한다는 것을 보여주었다(도 1a 내지 1c). 동정된 동종접합의 *gsl8*을 확인하기 위하여 야생형 및 GSL8 이종접합체(heterozygote) 간의 상호교배를

수행하였다. *gsl8*의 전달이 수컷 배우자체를 통하여 심각하게 감소되었지만 확인되었으며, 이러한 결과는 성공적인 동형접합의 *gsl8* 돌연변이의 분리를 뒷받침한다.

[65]

[66] 돌연변이 *gsl8*은 자엽(cotyledon)이 불규칙한 형태를 보였으며 표피(epidermal)의 포장(pavement) 세포는 다수의 돌기(bump)와 홈(valley)을 가졌다. 하배축(hypocotyl) 및 뿌리는 야생형보다 *gsl8* 돌연변이에서 두껍고 2배 짧았다(도 1c). 어두운 조건에서 자란(etiolate) *gsl8* 돌연변이 묘목은 열린 자엽, 지방(fat) 하배축 및 야생형과 비교하였을 때 4배 감소된 높이를 보였으나, 하배축 길이는 밝은 조건에서 자란 *gsl8* 식물과 비교하였을 때 상당히 연장되었다.

[67] 세포 연장의 섭동(perturbance)에 더하여 세포 분열의 결함이 확인되었다. *gsl8* 돌연변이 자엽에서 칼로스 유도 속도는 야생형 보다 늦었다(도 1D). 이러한 관찰과 일치하게 줄기 정단 분열조직 세포(shoot apical meristem cell)는 불규칙적인 패턴을 보였고 분화되거나 더 커진 형태를 보으는데, 이는 분열 활성의 결실을 의미한다(도 1G, H). 자엽의 횡단면에서 *gsl8* 돌연변이체는 더 큰 공간의 아포플라즘(apoplasm)을 갖는 정돈되지 않은(mis-arranged) 중엽세포(mesophyll cell)를 갖는 것으로 확인되었다(도 1E, 1F). 묘목 단계에서 표현형의 결함은 구상 단계(globular stage) 배아에서부터 시작되었다. 구상 단계 배아는 매끄럽지 않은 불규칙적인 모양을 보였고, 이 결함은 이후 단계에서 더욱 명확해졌다(도 1O, P). 성숙한 *gsl8* 돌연변이 배아는 비대칭적인, 하나 또는 세 개의 자엽 모양을 포함한 여러 종류의 표현형을 보였다(도 1P).

[68]

[69] 돌연변이 *gsl8* 하배축은 층에 약 13개의 내배엽 세포(endodermal cell)를 보이는데 반하여 야생형 하배축은 8-9개의 내배엽 세포를 가지고 있다(도 2A, B). *gsl8* 돌연변이체에서 관 조직(vascular tissue)은 특히 사관부 세포(phloem cell)에서 더 많은 세포 분열을 보였다(도 2C, D). 뿌리에서 *gsl8* 돌연변이 묘목은 4개의 컬러멜라 세포(columnellar cell) 층을 갖는 야생형 보다 7개까지 더 많은 세포층을 갖는 것으로 확인되었다(도 2E). 도 2F와 G에 나타낸 바와 같이 멤브레인 비투과성 형광 염료인 HPTS의 뿌리 tip 세포로의 빨아올림에 의해 목부 도관(xylem vessel) 발생의 결함이 확인되었다.

[70] 야생형 Arapidopsis에서 기공은 "단일 세포 공간배열(one-cell-spacing)" 법칙에 따라 두 개의 기공은 그들 사이에 적어도 하나의 비기공 표피 세포이 위치함에 의해 분리되어 있다(Geisler, M., Nadeau, J., & Sack, F. D. 2000. Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in arabidopsis are disrupted by the too many mouths mutation. *Plant Cell* 12: 2075-20 Bergmann, D. C. & Sack, F. D. 2007. Stomatal development. *Annu Rev. Plant Biol.* 58: 163-181). 그러나 *gsl8* 돌연변이체에서는 26개의 비기공 세포가 뭉쳐있는 경우도 있었다.

이러한 패턴은 루신이 풍부한 반복적 도메인을 포함한 멤브레인이 결합된 수용체에서 결함이 있는 tmm 돌연변이와 가장 유사하였다(Nadeau, J. A. & Sack, F. D. 2002. Control of stomatal distribution on the arabidopsis leaf surface. *Science* 296: 1697-1700).

[71]

[72] 또한, *gsl8*은 플라스티드(plastid) 분화에도 영향을 미쳤다. *gsl8* 돌연변이 자엽에서 엽록체는 야생형에 비하여 덜 쌓인(stacked) 틸라코이드 멤브레인(thylakoid membrane) 및 더 큰 크기의 전분 과립을 포함하고 있다. 일부 *gsl8* 돌연변이의 뿌리는 뿌리 캡(cap)에서 프로플라스티드(proplastid)는 아밀로플라스티드(amyloplastid)로 분화하지 못하여 아그라비트로픽 반응(agravitropic response)을 보였다(도 3).

[73]

[74] **실시예 4: GSL8은 세포질분열에 필수적임**

[75] 도 4A 내지 C에 나타낸 바와 같이 세포벽 스터브(stub)가 프로피디움 아이오다이드로 염색된 *gsl8* 묘목의 7일째 자엽에서 위, 중간, 아래 공초점 층으로부터 관찰되었다. 투과 전자 현미경으로 3일째의 *gsl8* 돌연변이체 묘목으로 관찰하였고 자엽에서 세포벽 스터브를 갖는 다핵세포가 발견되었다(도 4D-F). *gsl8* 돌연변이에서 배아의 비정상이 세포질분열의 결함으로부터 유발된 것인지 여부를 확인하기 위하여 이형접합체 *gsl8* 식물의 장각과로부터 다양한 발생 단계에서 비정상적인 배아를 수집하여 TEM을 사용하여 분석하였다. 예상된 바와 같이 묘목 단계에서 보여진 바와 같이 정렬되지 않은 세포 파일, 세포벽 스터브 및 다핵 배아 세포를 포함한 유사한 돌연변이 표현형을 보여주었다 (도 4G-I). 이러한 결과는 GSL8이 초기 배아 단계에서부터 세포질분열에 필수적이라는 것을 보여준다.

[76] *gsl8* 돌연변이의 15일령 묘목에서 일부 세포벽 분해 징후를 관찰할 수 있었다(도 4J-L). 이는 아폽토시스(apoptosis)와 관련이 있고, 또한 *gsl8* 돌연변이체의 묘목이 치사되고 3주내에 사멸되는 관찰과도 일치한다.

[77] GSL6(CalS1)은 발생중인 세포판에 위치하고 두 개의 세포판 연관 단백질(cell plate-associated proteins), 프라그모플라스틴 (phragmoplastin) 및 UDP-글루코오스 트랜스퍼라제와 상호작용하는 것으로 알려져 있다 (Hong, Z., Delauney, A. J., and Verma, D. P. S. 2001a. A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell* 13: 755-768; Hong, Z., Zhang, Z., Olson, J. M., and Verma, D. P. S. 2001b. A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate. *Plant Cell* 13: 769-779). 그러나, 세포질분열 중에 GSL6에 대한 직접적인 기능적 증거는 없는 상태이다. 세 개의 동형접합 *gsl6* 돌연변이 대립유전자를 분리하였다. 그 중 어떠한 것도 야생형에 비해 독특한 표현형을 보이지 않았다(도 5 참조). 세포질분열 중에 GSL6의 역할 및 기능의 중복성이 존재할 수 있다는 의문을

가지게 되었다. GSL 패밀리 중에서 새로운 세포질분열 돌연변이체를 분리하였고, 그의 돌연변이 표현형은 GSL6 또는 다른 GSL에 의해 보완되지 않았다. GSL8은 세포질분열에 필수적인 가장 중요한 칼로스 신타제이다.

[78]

[79] **실시예 5: 심플라즈믹으로 분리된 세포 패치는 세포질분열 결함 돌연변이체의 공통된 표현형임**

[80] *gsl8* 식물은 자엽의 표피 세포에서 비균질적 안토시아닌 축적을 입증하였는데, 여기서 상기 축적은 사이토졸을 채우는 것으로 보인다(도 6A). 플라스모데스마타 체널 크기(SEL)가 안토시아닌 크기(449 Da) 보다 더 크다는 것이 주어진 바 안토시아닌이 결핍된 세포가 분리된 것은 놀라운 것이다. 이는 심플라즈믹 분리(symplasmic isolation)의 결과이거나, 안토시아닌이 세포내에 붙잡혀있기 때문인 것으로 추정된다. 이를 확인하기 위하여, 자엽의 침윤에 의해 멤브레인 비통과성 형광 HPTS 염료를 로딩하였다. 야생형 묘목에서 HPTS는 사관부를 통해 자엽, 하배축 및 뿌리로 이동하였다. 일단 HPTS가 사관부 이동 경로로 들어가면 사관부로부터 근접한 세포로의 유출은 식별이 어렵다(도 6B). HPTS 염료의 세포내 위치가 사이토플라즘이라는 것은 염료의 이동이 심플라즈믹 세포간 염료 이동에 의한 것임을 의미한다 (도 6D, F).

[81] 반대로 *gsl8* 돌연변이체에서 HPTS의 관 흐름 패턴은 염료가 전체 세포를 통해서 이동하므로 명료하지 않았다(도 6C). 따라서, *gsl8* 돌연변이에서 세포간 염료 이동은 야생형에서보다 빠르다. 예상된 바와 같이 종종 심플라즈믹으로 분리된 표피 및 중엽세포를 발견하였는데(도 6E), 이는 플라스모데스마타의 구조 및/또는 기능에서의 붕괴를 의미한다.

[82] *korrigan* 돌연변이 묘목은 g*sl8* 돌연변이체와 유사한 난쟁이 표현형을 유발하였다. 발생 표현형의 많은 측면에서 상기 돌연변이체는 묘목이 치사되는 것을 포함하여 g*sl8* 돌연변이체와 동일한 표현형을 공유하였다. *gsl8*과 유사하게 *korrigan* 돌연변이 또한 심플라즈믹으로 분리된 염료 로딩 패턴을 보여주었다(도 6G, H).

[83]

[84] 심플라즈믹 분리 표현형에 추가 고찰을 얻기 위하여 플라스모데스마타(PD) 구조 및/또는 빈도가 *gsl8* 돌연변이체에서 변화되는지 여부를 확인하였다. 표피 세포 경계에서 PD 구조 및 빈도는 야생형과 비교하였을 때 *gsl8* 돌연변이체에서 정상이었다(도 7A, B). 이는 *gsl8* 돌연변이에서 심플라즈믹 분리는 PD 빈도 및 구조에서의 변화가 아니라 PD의 기능 상실로부터 기인한 것임을 의미한다.

[85] 칼로스는 플라스모데스마타 채널을 제어하는 것으로 공지된 조절인자이다. 칼로스 침착이 심플라즈믹 분리의 한 원인인지 확인하기 위하여 *gsl8* 돌연변이체에 칼로스 염색을 실시하였다. *gsl8* 돌연변이 묘목에서 급작스런 칼로스의 침착이 발견되었고, 이는 심플라즈믹 분리와의 잠재적인 연관성을 의미한다(도 7D, E). 그러나, 이는 칼로스 침착이 동일한 심플라즈믹으로 분리된

세포 패치(patch)에서 증가되었는지 확인할 필요가 있다. *gsl8* 돌연변이에서 GSL1발현이 감소하는 한편, GSL2, 3, 4 및 7의 발현이 증가하였다(도 7F). GSL 패밀리 멤버의 발현 파괴에 더하여, 세포 패터닝에 관여하는 일부 세포의 발현이 변화되었다. GSL 발현의 파괴는 GSL8 활성을 보완하기 위하여 유발된다. 세포 패너팅 관련 유전자에서 보여진, 다른 유전자의 발현에서의 광범위한 변화는 *gsl8*에서 일어나는 것인바, 세포질분열 돌연변이체에서 보여지는 많은 이차 결함은 다양한 유전자의 전사 조절로부터 유발될 수 있다.

산업상 이용가능성

[86] 본 발명에 따라 동정된 식물세포의 세포질분열 중에 형성되는 세포의 구성성분인 칼로스를 형성하는 GSL8 단백질은 세포질분열, 세포 패터닝, 플라스모데스마타 기능 및 플라스티드 분화를 조절할 수 있다.

청구범위

[1] 식물세포의 세포질분열 중에 형성되는 세포판의 구성성분인 칼로스를 합성하는 GSL8 단백질.

[2] 제 1항에 있어서, 상기 GSL8 단백질은 아라비도프시스(*Arabidopsis*)로부터 유래된 것을 특징으로 하는 GSL8 단백질.

[3] 제 1항에 있어서, 식물세포의 세포질분열 조절인자로서의 GSL8 단백질.

[4] 제 1항에 있어서, 식물세포의 세포 패터닝 조절인자로서의 GSL8 단백질.

[5] 제 1항에 있어서, 식물세포의 플라스모데스마타의 조절인자로서의 GSL8 단백질.

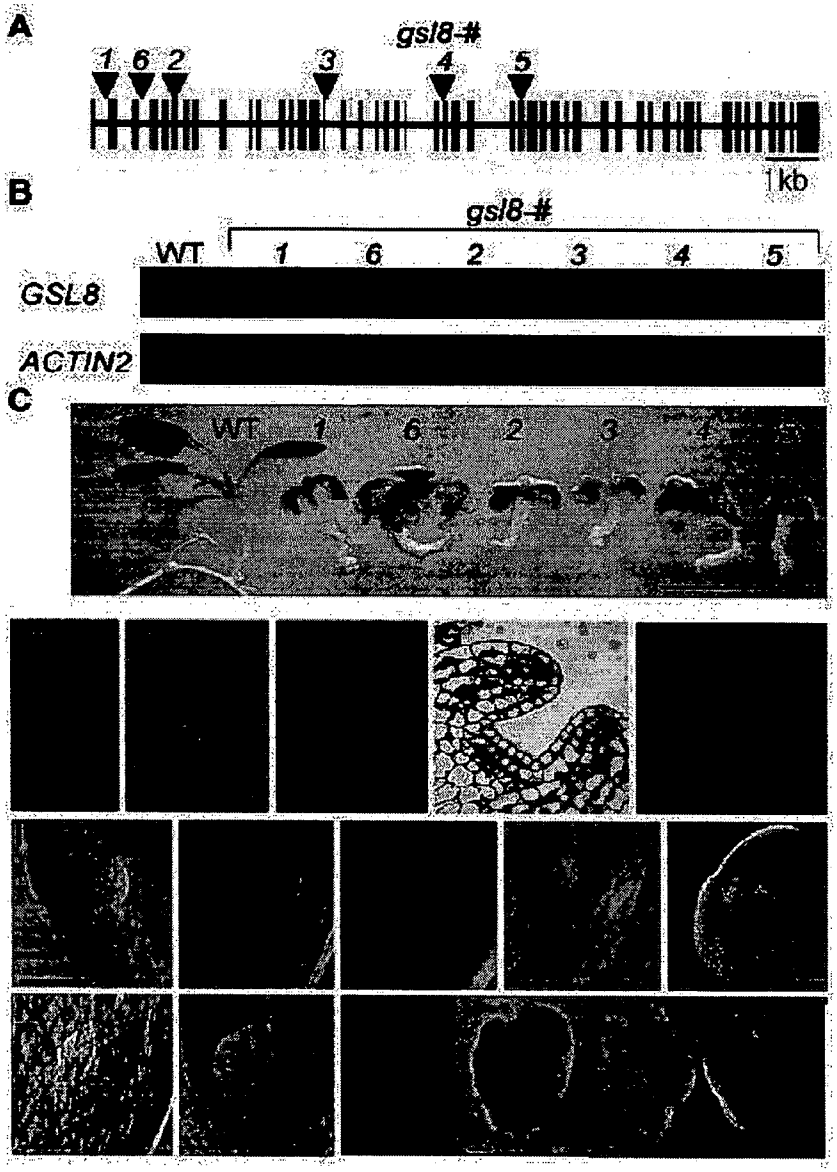
[6] 제 1항에 있어서, 식물세포의 플라스티드 분화 조절인자로서의 GSL8 단백질.

[7] 제 1항 또는 제 2항에 따른 GSL8 단백질을 코딩하는 GSL8 유전자.

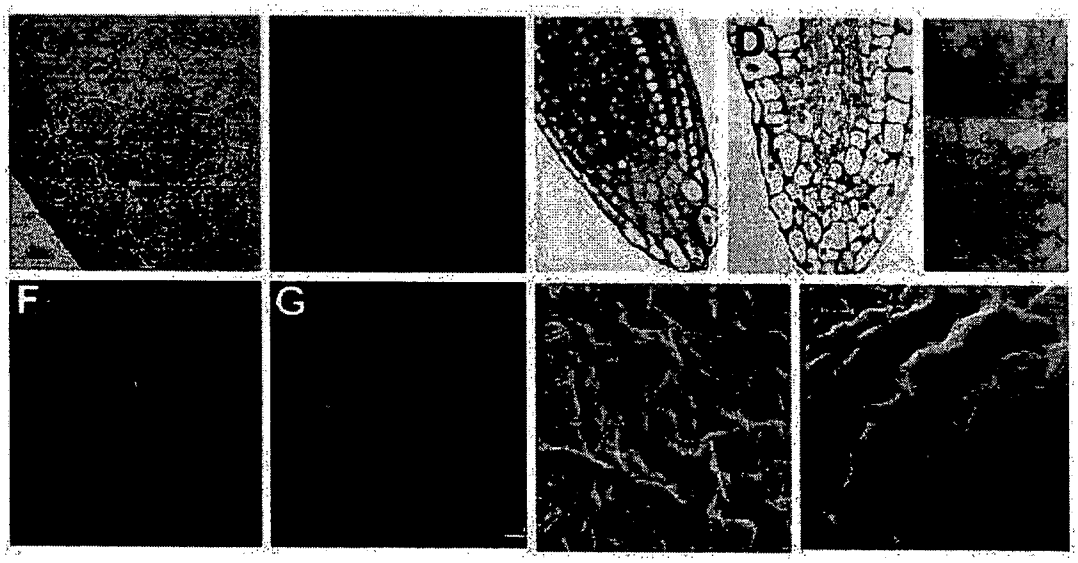
[8] 제 7항에 따른 유전자로 형질전환된 식물 세포.

[9] 제 8항에 따른 세포를 포함하는 형질전환된 식물.

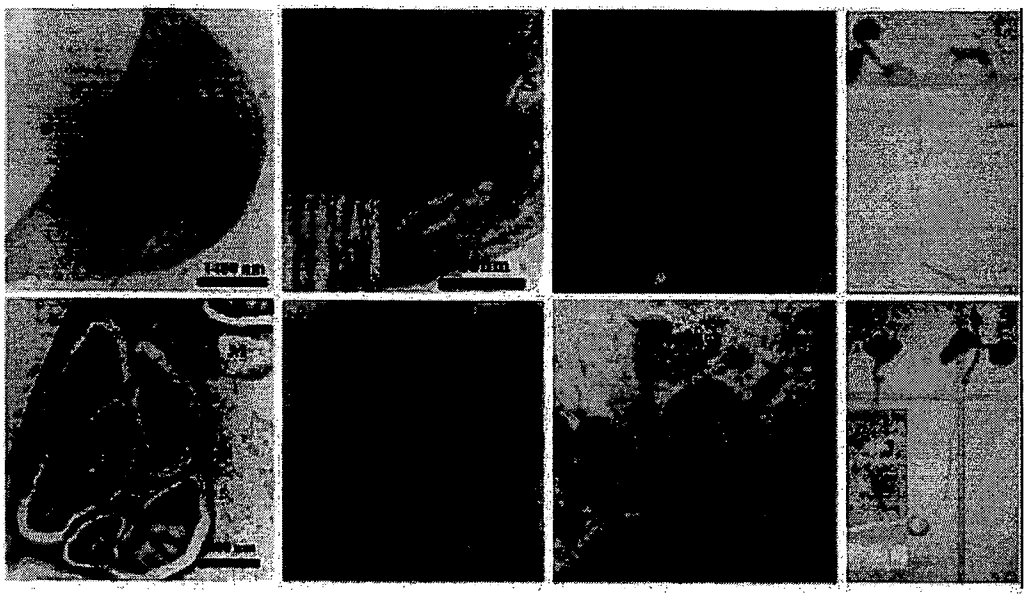
【Fig.1】


A
gsl8-#
1 6 2 3 4 5
1 kb
B
gsl8-#
WT 1 6 2 3 4 5
GSL8
ACTIN2
C
WT 1 6 2 3 4 5
G

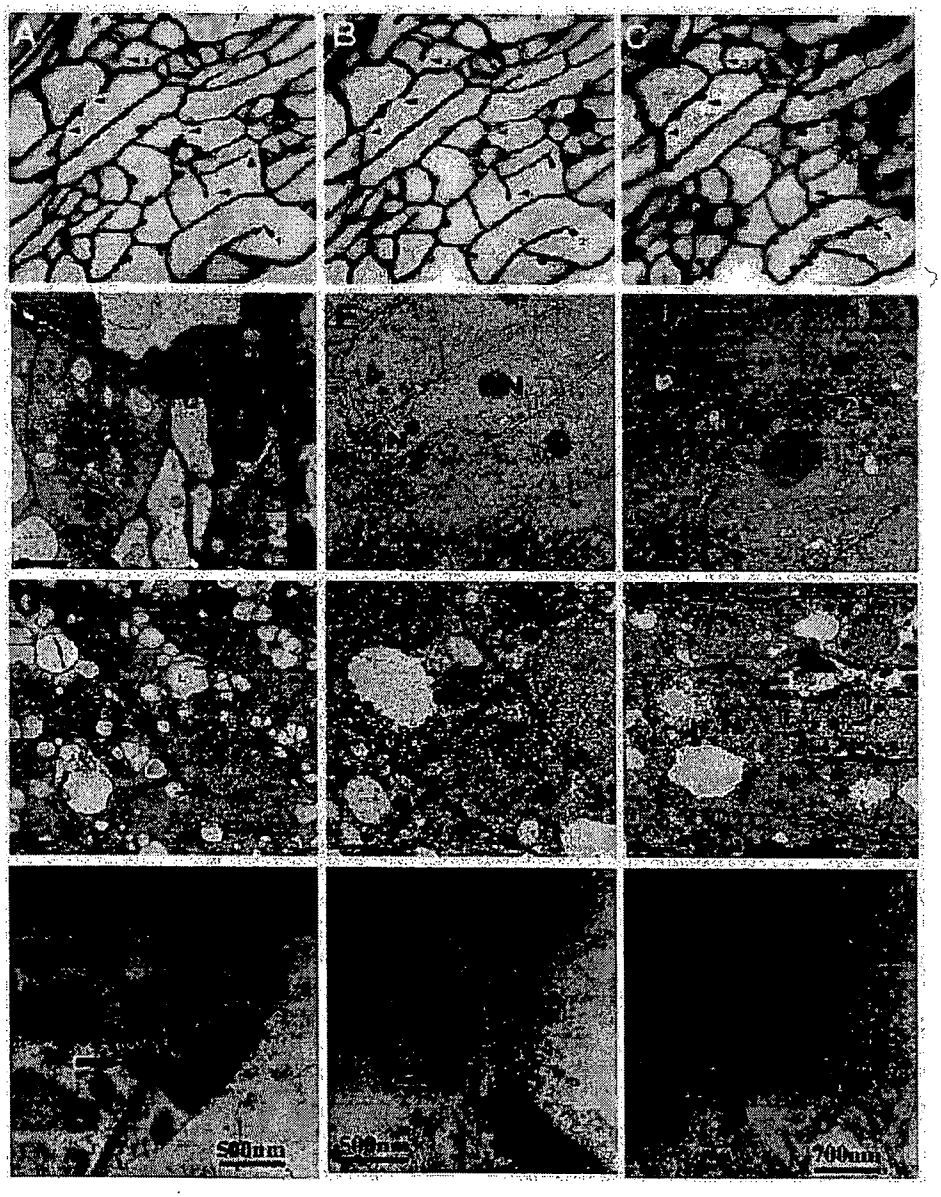
【Fig.2】


D
F
G

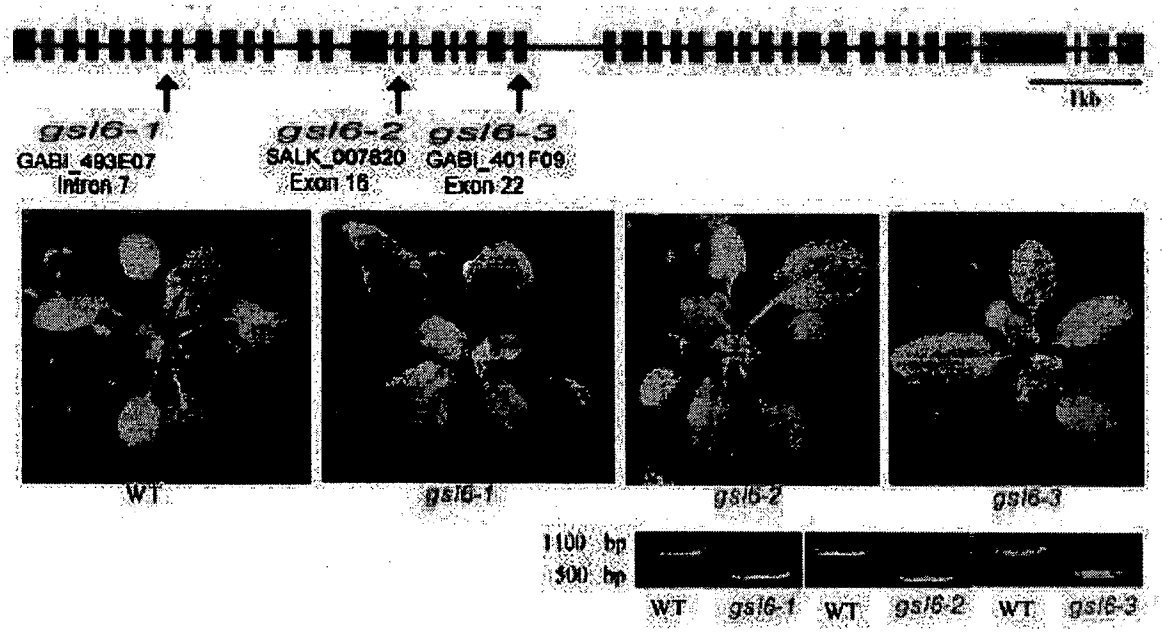
【Fig.3】



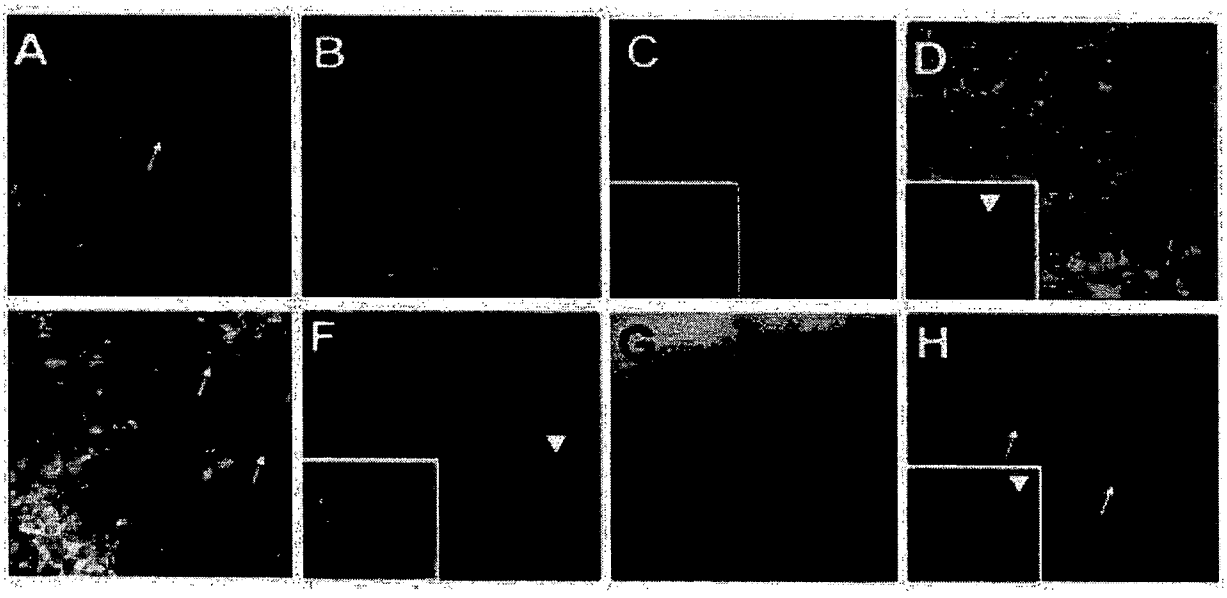
【Fig.4】



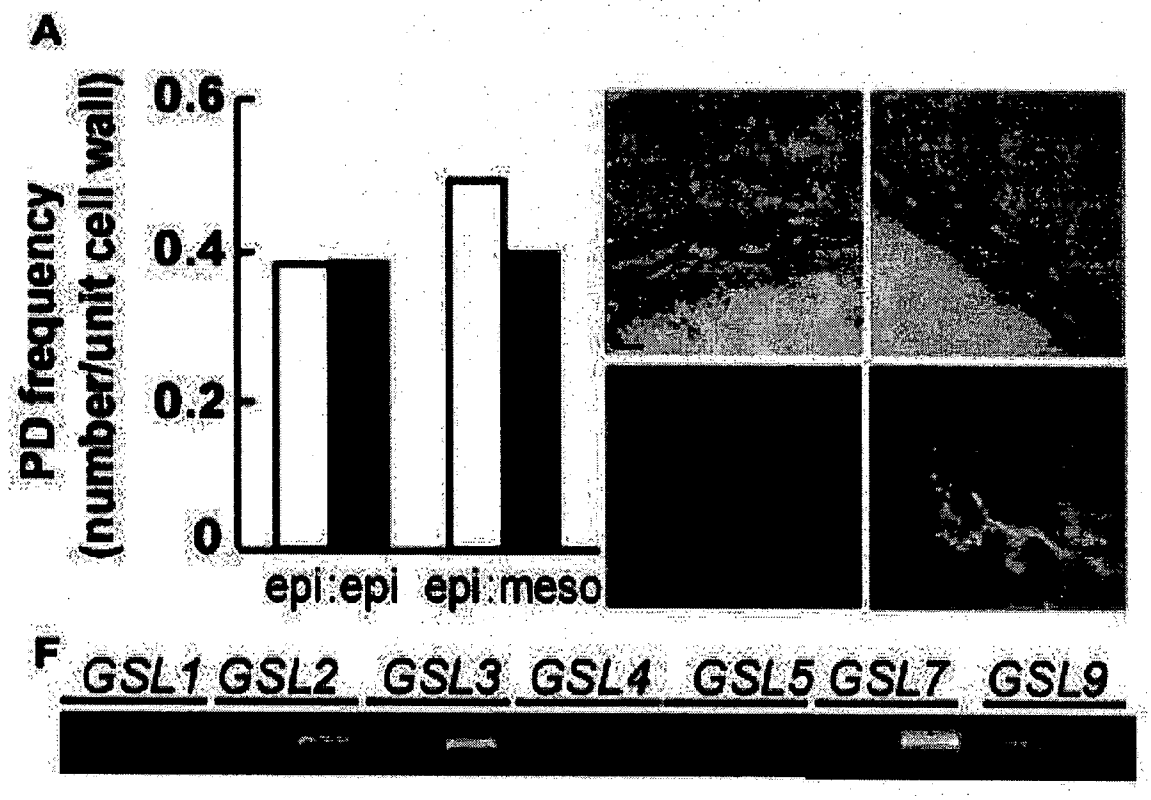
【Fig. 5】


1kb
gsl6-1
GABI_493E07
Intron 7
gsl6-2
SALK_007820
Exon 16
gsl6-3
GABI_401F09
Exon 22
WT
gsl6-1
gsl6-2
gsl6-3
1100 bp
300 bp
WT
gsl6-1
WT
gsl6-2
WT
gsl6-3

【Fig.6】


A
B
C
D
F
G
H

【Fig.7】


A
PD frequency (number/unit cell wall)
0.6
0.4
0.2
0
epi:epi
epi:meso
F
GSL1 GSL2 GSL3 GSL4 GSL5 GSL7 GSL9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2009/003356

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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)

IPC 8 C07K 14/415, A01H 1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

N.A.

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

eKOMPASS (KIPO internal), WPI, USPTO, PAJ, PubMed, INSPECT "GSL8, plant, Arabidopsis, cytokinesis, callose synthase, etc."

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Chen, XY., et al. (May 2009, Epub 13 Mar 2009) "The Arabidopsis callose synthase gene GSL8 is required for cytokinesis and cell patterning." Plant physiol. Vol. 150(1): 105-113. - see the whole document	1-9
PX	Chen, XY. (Chen, Xing-Yan) (Aug 2008) "Characterization of callose synthase GLS8 during cytokinesis and proteomics of weakly bound cell wall proteins in rice calli." Doctoral Thesis, Department of Molecular Biology (cooperation) Graduate school of Gyeongsang National University - see abstract	1-9
X	GenBank Accession Number NM_179940, which appears on the NCBI website (13 May 2003): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?30686933:OLD03:3055362 - see the whole description	1-7
X	Toller, A., et al. (Epub 27 Feb 2008) "Dual function of Arabidopsis glucan synthase-like genes GSL8 and GSL10 in male gametophyte development and plant growth." Plant J. Vol. 54(5): 911-923. - see abstract; page 911 ~ page 912; Table 1; page 919, the right column; page 920; page 921, the 2nd paragraph of the left column	1-9

☒ 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
24 FEBRUARY 2010 (24.02.2010)	**25 FEBRUARY 2010 (25.02.2010)**
Name and mailing address of the ISA/ Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2009/003356

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Voigt, C. A. et al., (2006) "A comprehensive view on organ-specific callose synthesis in wheat (Triticum aestivum L.): glucan synthase-like gene expression, callose synthase activity, callose quantification and deposition." Plant Physiology and Biochemistry Vol. 44: 242-247. - see abstract; page 243; for sequence, http://cellwall.stanford.edu/)	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2009/003356

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   ☒ a sequence listing

   ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   ☐ contained in the international application as filed

   ☒ filed together with the international application in electronic form

   ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2009/003356

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/415(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
IPC 8 C07K 14/415, A01H 1/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
N.A.

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS (KIPO internal), WPI, USPTO, PAJ, PubMed, INSPECT "GSL8, plant, Arabidopsis, cytokinesis, callose synthase, etc."

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	Chen, XY., et al. (May 2009, Epub 13 Mar 2009) "The Arabidopsis callose synthase gene GSL8 is required for cytokinesis and cell patterning." Plant Physiol. Vol.150(1):105-113. - see the whole document	1-9
PX	Chen, XY.(첸씽안) (Aug 2008) "Characterization of callose synthase GLS8 during cytokinesis and proteomics of weakly bound cell wall proteins in rice calli." 국립경상대학교 대학원 박사학위논문 분자생물학과(함동) - see abstract	1-9
X	GenBank Accession Number NM_179940, which appears on the NCBI website (13 May 2003): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?30686933:OLD03:3055362 - see the whole description	1-7
X	Toller, A., et al. (Epub 27 Feb 2008) "Dual function of Arabidopsis glucan synthase-like genes GSL8 and GSL10 in male gametophyte development and plant growth." Plant J. Vol.54(5):911-923. - see abstract; page 911 - page 912; Table 1; page 919, the right column; page 920; page 921, the 2nd paragraph of the left column	1-9

☒ 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
2010년 02월 24일 (24.02.2010)	**2010년 02월 25일 (25.02.2010)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 선사로 139,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
신원혜
전화번호 82-42-481-5591

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2009/003356

C(계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	Voigt, C.A. et al., (2006) "A comprehensive view on organ-specific callose synthesis in wheat (Triticum aestivum L.): glucan synthase-like gene expression, callose synthase activity, callose quantification and deposition." Plant Physiology and Biochemistry Vol.44:242-247. - see abstract; page 243; for sequence, http://cellwall.stanford.edu/)	1-9

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2009/003356

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 대상의 유형
- [x] 서열목록
- [ ] 서열목록 관련 테이블

b. 대상의 형태
- [ ] 서면
- [x] 전자적 형태

c. 제출시기
- [ ] 출원시 국제출원에 포함
- [x] 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출
- [ ] 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. [ ] 추가로 서열목록 및/또는 서열목록 관련 테이블에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견: