

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 6월 30일 (30.06.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/104916 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/009411
- (22) 국제출원일: 2015년 9월 7일 (07.09.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0190188 2014년 12월 26일 (26.12.2014) KR
- (71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동), Gyeongsangbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 이영숙 (LEE, Youngsook); 37662 경상북도 포항시 남구 대잠동길 6 번길 25-1, B-1 호 (대잠동), Gyeongsangbuk-do (KR). 이은정 (LEE, Eunjung); 12457 경기도 가평군 청평면 경춘로 77, 2층, Gyeonggi-do (KR). 오민우 (OH, Minwoo); 11805 경기도 의정부시

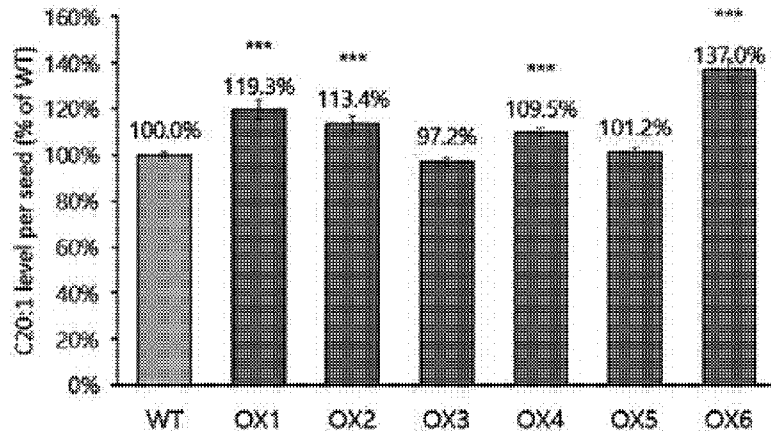
오목로 171, 202 동 1401 호 (민락동, 서광청구아파트), Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로 85 길 28, 6층 (대치동), 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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, 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, ST, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION, CONTAINING BASS2 PROTEIN OR GENE ENCODING SAID PROTEIN, FOR INCREASING SIZE OF PLANT SEEDS AND CONTENT OF DEPOT FAT IN SEEDS

(54) 발명의 명칭: BASS2 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량 증가용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a technique of increasing the size of plant seeds and the content of depot fat in the seeds by using a pyruvic acid transporter in charge of transporting pyruvic acid in a plant and, more specifically, to a composition for increasing the size of plant seeds and the content of depot fat in the seeds, the composition containing the BASS2 protein, which is a pyruvic acid transporter, or a gene encoding the protein, and to a method for increasing the size of plant seeds or the content of depot fat in the seeds, the method comprising a step of introducing the gene and a promoter for overexpressing the gene into a plant. According to the present invention, the fatty acid precursor can be increased by increasing the amount of pyruvic acid transported to the chromatophore at the time of forming seeds, thereby increasing the size of the seeds and the content of depot fat in the seeds, thus expecting the increase of productivity due to the increase in the seed yield. In addition, the content of depot fat in the seeds can be further increased through the increase in the size of the seeds, which correspond to a main plant fat storage organ, thereby significantly improving productivity of plant fat (oil) in a restricted space.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2016/104916 A1



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 공개:
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 식물에서 피루브산의 수송을 담당하는 피루브산 수송체를 이용하여 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시키는 기술의 제공에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 피루브산 수송체인 **BASS2** 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량 증가용 조성물, 상기 유전자 및 상기 유전자를 과발현시키기 위한 프로모터를 식물체로 도입하는 단계를 포함하는 식물 종자의 크기 또는 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시키는 방법 등에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 종자 형성 시 색소체로 수송되는 피루브산의 양을 증가시킴으로써 지방산 전구체를 증가시킬 수 있으며, 이로써 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시켜, 종자 수확량의 증가로 인한 생산성 증가를 기대할 수 있는 장점이 있다. 또한, 식물 지방의 주요 저장 기관인 종자의 크기 증가를 통해 종자 내 저장 지방의 함량을 더욱 증가시킬 수 있으므로 제한된 공간에서 식물 지방(기름)의 생산성을 현저히 향상시킬 수 있는 장점이 있다.

명세서

발명의 명칭: BASS2 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량 증가용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 BASS2 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 이용하여 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시키기 위한 조성물 및 그 방법 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 식물은 물과 이산화탄소를 흡수하여 광합성을 통해 에너지를 직접 생산할 수 있으며, 식물을 통해 생산되는 에너지원은 수크로오즈(sucrose), 글루코오즈(glucose), 녹말(starch) 등을 포함하는 탄수화물, 단백질, 및 지방이 대표적이다.
- [3] 이 중 식물 지방은 인간에게 필수적인 에너지를 제공할 뿐만 아니라 화석 연료를 대체할 수 있는 미래 바이오 에너지 자원이 될 것으로 기대되고 있기 때문에 식물 지질 생산 및 조절 기작에 대한 이해가 필수적이다.
- [4] 또한, 식물성 지방의 수요는 날이 갈수록 늘어나고 있으나, 그 공급은 수요를 따라가지 못하고 있다. 지속적인 육종과 교잡 개량으로 현재 지방종자의 기름 생산량은 최대치에 이르렀으며, 현재까지의 육종과 교잡 방법으로는 한정된 재배 면적에서 수요를 따라갈 수 없을 것으로 예상된다. 이러한 한계성을 극복하기 위해 최근 대두되는 것이 유전자 변형 작물이다. 전 세계적으로 막대한 수요가 예상되는 식물성 지방의 생산을 위해서는 기름 생산량이 높아진 유전자변형 작물의 개발이 필수적이라 예상된다. 이와 관련하여 종자 단위무게 당 기름 함량과 전체 생산량을 높이기 위해 전 세계적으로 많은 학자들이 연구하고 있으나, 식물 저장 기름의 대부분을 차지하는 종자 내 트리아실글리세롤의 합성과 그 과정의 조절에는 여러 유전자가 복잡하게 관여하고 있어서, 이 목표는 쉽게 달성되지 않고 있다.
- [5] 식물 종자의 저장 기름을 향상시키기 위해 Monsanto, Dupont과 같은 거대 다국적 기업들이 연구하고 있다. 그러나 종자의 저장 지방이 늘어나도 식물의 전체 성장과 종자 꼬투리 수의 감소 등으로 인하여 전체적인 생산성은 줄어드는 경우가 많아, 아직 큰 성과가 보고되어 있지 않다. 식물 지방의 대부분을 저장하고 있는 종자에서 저장 기름이 증가하면서도 종자의 크기나 꼬투리의 수가 변하지 않거나, 또는 더욱 이상적으로, 종자의 크기와 꼬투리 수를 모두 증가시킬 수 있는 유전자의 발굴이 시급하다.
- [6] 한편, 식물의 지방 생산 과정 중에 피루브산은 중간물질로서 중요하다. 식물은 피루브산을 세포질에서 색소체로 수송하여 아미노산 대사와 에너지 생산뿐만

아니라 지방산과 이차대사물질 합성의 전구체로 사용한다. 이렇게 피루브산을 세포질에서 색소체로 수송하는 일은 인간의 BILE ACID SODIUM SYMPORTER(BASS) 단백질과 유사한 수송 단백질이 담당하고 있으며, 애기장대에는 이와 비슷한 단백질을 코딩하는 유전자가 6개 존재한다. 그 중에서 특히 BILE ACID SODIUM SYMPORTER FAMILY PROTEIN 2(BASS2)가 앞의 색소체에 위치하여 피루브산 수송에 직접 기능하는 것으로 알려졌다(Furumoto et al., Nature, 2011). 색소체 내로 수송된 피루브산은 아세틸 코에이(acetyl-coA)로 바뀌고, 이후 말로닐 코에이(malonyl-coA)로 변경된다. 생성된 아세틸 코에이와 말로닐 코에이는 각각 지방산 합성효소 콤플렉스(Fatty Acid Synthase complex)의 효소 작용에 의해 탄소가 2개씩 붙어서 16:0-ACP(acyl carrier protein), 18:0-ACP 및 18:1-ACP의 형태로 완성된다. 이후 ATP Binding Cassette transporter A subfamily 9(ABCA9) 단백질에 의해 소포체로 수송되어 이후 지방산 변형 및 조합 과정을 거쳐서 세포막을 구성하는 인지질 및 저장 지방인 트리아실글리세롤(TRYACYLGLYCEROL, TAG) 등의 합성에 사용된다.

- [7] 애기장대를 포함하는 Brassicae 계통은 종자에 기름을 저장하는 식물로써, 종자 무게의 37% 가량을 지방으로 보관한다. 식물의 종자 지방은 영양소 측면뿐만 아니라, 많은 에너지를 저장할 수 있기 때문에 바이오 에너지 생산과 연관되어 매우 중요한 물질이다. 따라서 지방산 합성에 사용되는 전구물질의 수송을 증가시켜 sink strength를 높인다면 종자에서 합성되어 저장되는 지방의 양을 크게 늘릴 수 있을 것으로 예상된다.

- [8] 이에, 현재까지 종자의 지방 함량을 증가시키기 위한 많은 연구들이 수행되어 왔으나, 주로 지방산 합성 효소, 저장 중성지방인 트리아실글리세롤 조합 효소 및 이들의 단백질의 전사 조절 인자를 과발현하는 것에 초점이 맞춰져있으며, 지방 및 지방 전구 물질 수송체를 이용한 연구에 대해서는 거의 알려진 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명자들은 식물의 종자 내 지방 함량을 증가시키기 위하여, 피루브산 수송체인 BASS2 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 이용하여 식물 종자의 크기 및/또는 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시키는 기술을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

- [10] 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

- [11] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 식물의 BASS2(BILE ACID:SODIUM SYMPORTER 2) 단백질 및 이를 암호화하는

유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량 증가용 조성물을 제공한다.

[12] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 상기 유전자를 과발현시키기 위한 발현벡터 또는 상기 발현벡터로 형질전환된 미생물을 포함하는 것일 수 있다.

[13] 또한, 본 발명은 식물의 BASS2(BILE ACID:SODIUM SYMPORTER 2) 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 식물체로 도입하는 단계를 포함하는, 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시키는 방법을 제공한다.

[14] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 BASS2 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩타이드일 수 있다.

[15] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발현벡터는 상기 유전자를 과발현시키기 위한 프로모터가 포함되어 있는 것일 수 있다.

[16] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 종자 내 저장 지방은 트리아실글리세롤일 수 있다.

[17] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물은 배추, 무, 브로콜리, 갯, 애기장대, 유채, 카멜리나, 해바라기, 아마, 목화, 콩, 홍화, 카놀라, 참깨, 들깨, 땅콩, 피마자, 카렌둘라, 장미, 코코넛, 야자수, 포도, 살구, 벼, 옥수수, 잔디, 미세조류, 및 자두로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[18] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량이 증가된 식물체를 제공한다.

[19] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물체는 식물의 조직, 세포, 및 종자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[20] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 크기 및 저장 지방의 함량이 증가된 종자를 제공한다.

[21] 이에 더하여, 본 발명은 상기 조성물의, 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량 증가 용도를 제공한다.

발명의 효과

[22] 본 발명은 식물의 색소체에서 피루브산 수송에 기능하는 수송체인 BASS2 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자를 이용하여, 발달하는 도중의 종자와 종자를 보호하는 구조에 과발현시켜, 종자 형성 시 색소체로 수송되는 피루브산의 양을 증가시킴으로써 지방산 전구체의 증가를 야기시킬 수 있으며, 궁극적으로는 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 양을 증가시킬 수 있는 장점이 있다.

[23] 또한, 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시킴으로써 지질 수확량의 증가로 인한 생산성 증가를 기대할 수 있으며, 식물 지방의 주요 저장 기관인 종자의 크기 증가를 통해 종자 내 저장 지방의 함량을 더욱 증가시킬 수

있으므로 제한된 공간에서 식물 지방(기름)의 생산성을 현저히 향상시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 피루브산 수송체인 BASS2의 CDS 지역을 pBinGlyBar1의 Glycinin 프로모터 뒤에 삽입한 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.
- [25] 도 2는 피루브산 수송체 BASS2를 과발현시킨 식물의 발달하는 실릭(silique)에서 BASS2의 전사가 매우 증가하였다는 것을 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [26] 도 3은 피루브산 수송체 BASS2의 과발현 형질전환체 종자의 크기를 측정한 결과를 야생종과 비교하여 나타낸 것이다.
- [27] 도 4는 피루브산 수송체인 BASS2 과발현 종자의 전체 지질 함량을 측정하여 야생종과 비교한 결과를 FATTY ACID METHYL ESTER(FAME)로 나타낸 것이다.
- [28] 도 5는 피루브산 수송체 BASS2의 과발현 형질전환체 종자에서 추출한 총 지질 함량 중에 중성지방을 대표하는 C20:1의 양을 측정한 결과를 야생종과 비교하여 나타낸 것이다.
- [29] 도 6은 피루브산 수송체 BASS2의 과발현 종자에서 분석한 총 지질의 지방산 조성을 분석하여 퍼센트로 나타낸 것이다.
- [30] 도 7은 피루브산 수송체 BASS2의 과발현 종자에서 추출한 단백질 및 녹말, 수크로오스 양을 분석하여 야생종에 비교하여 나타낸 것이다.
- [31] 도 8a는 씨를 심은 후 야생종과 피루브산 수송체 BASS2의 과발현 형질전환체의 중심 줄기에서 실릭수를 측정하여 나타낸 것이다.
- [32] 도 8b는 씨를 심은 후 야생종과 피루브산 수송체 BASS2의 과발현 형질전환체의 중심 줄기에서 실릭 당 존재하는 종자의 개수를 측정하여 나타낸 것이다.
- [33] 도 8c는 씨를 심은 후 야생종과 피루브산 수송체 BASS2의 과발현 형질전환체의 단일 식물체당 종자 개수를 측정하여 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [34] 본 발명자들은 식물의 색소체에서 피루브산 수송에 기능하는 피루브산 수송체 BASS2(BILE ACID:SODIUM SYMPORTER 2) 단백질을 과발현시켜 피루브산의 색소체로의 수송 증가를 유도하면, 식물의 종자 발달 과정 시 지방 합성에 기여하여 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시킴을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [35] 이에, 본 발명은 식물의 BASS2(BILE ACID:SODIUM SYMPORTER 2) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량 증가용 조성물을 제공함을 그 특징으로 한다.
- [36] 본 발명에서 BASS2 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로

구성되는 폴리펩타이드로, 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체에서 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시키는 활성을 의미한다.

- [37] 또한, 본 발명에서 BASS2 단백질을 암호화하는 유전자는 BASS2 단백질을 암호화하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 서열번호 2로 표시되는 BASS2 CDS 서열일 수 있으며, 상기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 2의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 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 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [38] 본 발명에 따른 상기 조성물은 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시키는 것으로, 본 발명의 일실시예에서는 BASS2가 과발현된 형질전환 식물(형질전환체)의 경우 야생종에 비해 종자 크기가 증가하는 표현형이 나타남을 확인하고(도 3 참조), 지질 함량을 확인한 결과, 전체 지질 함량이 야생종에 비해 현저하게 증가함을 확인하였으며(도 4 참조), 특히, 저장 지방인 트리아실글리세롤의 함량이 두드러지게 증가함을 확인하였다(도 5 참조).
- [39] 상기로부터 본 발명은 식물에서 BASS2의 과발현은 세포질에서 색소체로의 피루브산 수송이 증가하여 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방 함량이 증가함을 규명하였으므로, 본 발명은 식물의 BASS2 단백질 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량 증가용 조성물을 제공할 수 있다.
- [40] 본 발명의 일실시예에서는 대두(콩)의 프로모터를 이용하여 BASS2를 과발현하는 형질전환 식물체를 제조하였다(도 1 참조). 따라서 본 발명에 따른 상기 조성물은 BASS2 단백질을 암호화하는 유전자 및 상기 유전자를 과발현시키기 위한 프로모터가 삽입된 형질전환 벡터 또는 상기 형질전환 벡터로 형질전환된 식물을 제공하는 것일 수 있다.
- [41] 본 발명에서 상기 용어 과발현은 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 본 발명의 BASS2 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미하며, 과발현시키는 방법은 특별히 제한되지 않고 다양한 공지된 기술을 이용하여 수행할 수 있다. 예컨대, 구조 유전자로부터 상부스트림에 위치한 리보솜 결합 부위 또는 프로모터 및 조절영역을 돌연변이 시키거나 도입하여

적절한 유전자의 복제수를 증가시킴으로써 수행할 수 있고, 구조 유전자로부터의 상부스트림이 도입된 발현 카세트가 동일한 방식으로 작용할 수 있다. 또한, 본 발명의 BASS2 단백질을 암호화하는 유전자 유도성 프로모터가 발현을 증가시킬 수 있으며, mRNA의 수명을 연장시키는 방법으로 발현을 증가시킬 수도 있다. 이에 더하여, 배지의 조성 및/또는 배양 기술을 변화시킴으로써 상기 유전자를 과발현시킬 수도 있다.

[42] 상기에서 용어 "형질전환"은 원래의 세포가 가지고 있던 것과 다른 종류의 외래 유전자가 있는 DNA 사슬 조각 또는 플라스미드가 세포들 사이에 침투되어 원래 세포에 존재하던 DNA와 결합함으로써 세포의 유전형질을 변화시키는 분자생물학적 기술을 의미하는 것으로서, 본 발명에서 형질전환은 BASS2 단백질을 암호화하는 유전자가 과발현 프로모터와 함께 식물 내로 삽입되는 것을 의미한다.

[43] 또한, 용어 "형질전환 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 상기 적정 핵산 서열은 프로모터가 될 수 있으며, 그 외에도 추가적으로 인핸서, 전사종결자 및 폴리아데닐레이션 신호 등을 더 포함할 수 있다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 전사종결자 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다. 상기 형질전환 벡터는 상기 유전자의 염기서열이 삽입되어 식물 세포로 직접 도입될 수 있거나 식물에 감염을 유발하는 미생물 내부로 도입될 수 있는 식물 발현 벡터일 수 있다. 형질전환 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 튜메팩시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 이러한 조작에 사용될 수 있는 아그로박테리움의 스트레인(strain)은 다수가 있으며 본 업계에 공지되어 있다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터는 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 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, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 상기 벡터는 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리하게 사용할 수 있다. 바람직하게는 상기 형질전환 벡터는 상기 유전자의 발현을 확인하거나 형질전환체를 선별할 수 있는 마커를 더 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산

- 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 표지 유전자로는 카나마이신, 스펙티노마이신 등의 항생제에 대하여 내성을 나타내는 유전자나 GUS(β -glucuronidase) 또는 GFP(Green Fluorescence Protein)를 암호화하는 유전자를 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 마커는 상기 벡터와 함께 식물에 전달되어, 특정한 항생제를 포함하는 배지에서 배양함으로써 형질전환체의 선별을 가능케 한다.
- [44] 또한, 용어 "프로모터"는 식물발현용 프로모터로 CaMV(Cauliflower Mosaic Virus) 35S 프로모터, 아그로박테리움 튜메팩시엔스 Ti 플라스미드(*Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid)의 NOS(nopaline synthase) 프로모터, OCS(octopine synthase) 프로모터, 또는 MAS(mannopine synthase) 프로모터를 비롯하여 그 외 공지된 프로모터를 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [45] 또한, 상기에서 미생물은 식물에 감염을 유발시키는 것이라면 제한 없이 사용될 수 있다.
- [46] 이에 더하여, 본 발명은 식물의 BASS2 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 식물체로 도입하는 단계를 포함하는 식물 종자의 크기 또는 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [47] 이때, 상기 유전자는 발현벡터에 삽입된 것일 수 있으며, 상기 유전자가 삽입된 발현벡터를 식물체에 형질전환시키는 방법은 바람직하게는 아그로박테리움 튜메팩시엔스-매개 DNA 전이(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated DNA transfer)법을 이용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 전기충격(electroporation), 미세 입자 주입 방법(micro-particle injection) 또는 유전자 총(gene gun) 방법 등을 이용해 제조된 재조합 아그로박테리움을 침지하는 방법을 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않고 다양한 공지의 방법을 이용할 수 있다.
- [48] 본 발명에서 "식물 종자의 크기 증가"는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 식물 종자의 크기 증가는 물론이고, 종자의 무게, 부피, 꼬투리의 수, 꼬투리의 크기의 증가 및 이로 인한 종자 수확량 내지는 생산성의 증가를 모두 포함한다. 또한, "종자 내 저장 지방의 함량 증가"는 식물의 종자에 저장되어 있는 지방(또는 기름)의 함량을 증가시키는 것을 의미하며, 이러한 종자 내 저장 지방의 함량 증가는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 저장 지방 자체의 함량 증가는 물론이고 상술한 종자의 크기 증가를 통하여 결과적으로 발생하는 종자 내 저장 지방의 함량 증가 및 이로 인한 식물 지방(또는 기름)의 생산성 증가를 모두 포함하는 의미이다. 상기 종자 내 저장 지방의 대표적인 예로는 트리아실글리세롤이 있다. 트리아실글리세롤(Triacylglycerol; Triacylglyceride; Triglyceride)은 한 개의 글리세롤을 골격으로 하여 3개의 지방산이 붙은 구조로서, 식물 지방과 동물 지방의 주요 성분이다. 이러한 트리아실글리세롤은 동물에서는 탄수화물 부족 시 에너지원으로 변환되어 사용되며, 식물의 경우 종자(씨앗)에 주로 저장되어 종자의 발아 시 영양분으로 사용되는 대표적인 저장

지방이다.

[49] 본 발명에서 식물은 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량 증가를 필요로하는 모든 종류의 작물류 또는 화훼류일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나 배추, 무, 브로콜리, 갯, 애기장대, 유채, 카멜리나, 해바라기, 아마, 목화, 콩, 홍화, 카놀라, 참깨, 들깨, 땅콩, 피마자, 카렌둘라, 장미, 코코넛, 야자수, 포도, 살구, 벼, 옥수수, 잔디, 미세조류, 또는 자두 등일 수 있다. 그러나 본 발명은 식물에서 BASS2 단백질의 증가가 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량 증가 효과를 나타냄을 규명한바, 이를 적용 가능한 식물체는 어느 하나에 제한될 수 없음이 당업자에게 있어 자명하다.

[50] 이에 더하여, 본 발명은 상기 식물 종자의 크기 또는 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시키는 방법에 따라 종자의 크기 또는 종자 내 저장 지방의 함량이 증가된 식물체 및 상기 방법에 의해 제조된 크기 또는 저장 지방의 함량이 증가된 종자를 제공한다.

[51] 상기 식물체는 바람직하게 식물의 조직, 세포, 또는 종자일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 "식물의 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직, 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함하며, 상기 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다. 또한, 상기 "식물의 세포"는 어떤 식물 세포도 가능하며, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 어떤 형태도 가능하다.

[52]

[53] 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.

[54]

[55] [실험예]

[56] 본 발명에서 RNA 분리 및 cDNA 합성과 PCR은 다음과 같은 조건 및 방법으로 수행되었다. 먼저, 시료를 액체질소를 사용하여 급속냉각시키고 고르게 분쇄하였다. 이렇게 분쇄된 시료에 900 μ l의 TRIzol을 넣고 잘 섞은 후 65 °C 에서 10분간 둔 후 200 μ l 클로로포름(chloroform)을 넣고 섞어 준다. 그 후 12000 rpm 4 °C 에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮긴다. 여기에 600 μ l의 이소프로판올(isopropanol)을 첨가하고 실온에 10분간 두었다가 12000 rpm 4 °C 에서 10분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 그 후 500 μ l의 75% 에탄올을 이용해 펠렛을 씻어내고 다시 12000 rpm 4 °C 에서 10분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 남은 펠렛은 65 °C 에서 5분 동안 에탄올을 깨끗이 말린 후 DNase I을 30분 동안 처리하여 DNA를 제거하였다. 그 후 75 °C 에서 10분간 반응시켜 DNase I을 불활성화시킨 후 획득한 RNA를 이용하여 cDNA 합성에 사용하였다.

- [57] 상기 얻어진 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하기 위해 GoScript reverse transcriptase(Promega)와 oligo dT 프라이머를 사용하여 제조사의 방법에 따라 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 중합효소 연쇄반응(PCR) 및 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 수행하였다(94 °C 3분 및 94 °C 5초, 56 °C 15초, 72 °C 30 초, 45 사이클, 95 °C 15초, 60 °C 30초, 95 °C 15초). 각 샘플당 사용된 전체 cDNA 양을 상대적으로 비교하여 주는 normalization control로 UBIQUITIN11(UBQ11) 유전자를 사용하였다.
- [58]
- [59] 본 발명에서 지질 추출 및 중성 지방 분리 정량은 다음과 같은 조건 및 방법으로 수행되었다. 먼저, 종자 30개를 유리 튜브에 담은 뒤, 정량 비교에 기준으로 사용하는 50 nmol C17:0 트리아실글리세롤을 넣어준다. 여기에 1 ml의 5% 황산/메탄올 용액과 300 μ l의 톨루엔을 넣어서 30초간 섞어준다. 그 후 90 °C 에서 90분간 두었다가 식혀준다. 여기에 1.5 ml의 0.9% 수산화칼륨 용액과 2.5 ml의 헥산(hexane)을 넣어서 여러 번 흔들어준 뒤, 1500 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 새로운 튜브에 옮긴다. 질소 가스를 이용하여 상층액을 증발시킨 후, 남아있는 펠렛에 5 방울의 헥산을 넣어서 녹인 뒤 이 용액을 가스 크로마토그래피-질량 분석기(Gas chromatography-Mass spectrophotometry)를 이용하여 분석하였다.
- [60]
- [61] [실시예]
- [62] 실시예 1. 발달하는 실력에서 피루브산 수송체 BASS2를 과발현하는 식물 제작/발굴
- [63] 피루브산(pyruvate)은 해당작용(glycolysis)을 통해 세포질에서 생성되며 색소체로 수송되어 이소프렌(isoprene) 및 지방산 합성의 전구체로 사용된다. 이에, 본 발명자들은 종자 발달 과정 시에 색소체로의 피루브산 수송 증가가 지방 합성에 기여하는지 알아보기 위해, 피루브산 수송체를 암호화하는 유전자인 BASS2(BILE ACID:SODIUM SYMPORTER 2)를 애기장대의 발달하는 실력(developing silique)과 종자에 발현시킬 수 있는 벡터를 제작하였다. 이를 위해, 애기장대 식물에서 RNA를 추출한 뒤 cDNA를 합성하여 AtBASS2 cDNA에 특이적으로 결합할 수 있는 전방향 프라이머 AtBASS2_F1(서열번호 3: 5'-GAATTCATGGCTTCCATTTCCAGAATCT-3')와 역방향 프라이머 AtBASS2_R1(서열번호 4: 5'-CTCGAGTTACTCTTTGAAGTCATCCTTG-3')를 이용하여 PCR을 수행하였다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 합성된 피루브산 수송체 BASS2 유전자의 CDS 지역을 pBinGlyBar1 벡터 내 대두의 Glycinin 프로모터 뒤에 도입하였다. 그리고 제작한 벡터를 애기장대 야생종에 도입하여 BASS2 형질전환체 라인을 제작하고 선별하였다.
- [64]
- [65] 실시예 2. 형질전환식물의 BASS2 과발현 양상 분석

- [66] 상기 실시예 1에서 제작한 피루브산 수송체 BASS2 형질전환체 라인의 발달하는 실리와 종자에서 BASS2가 과발현하는지 확인해 보았다. 이를 위해, 흙에서 자란 야생종과 BASS2 형질전환체 식물의 개화 후 일수(days after flowering: DAF) 12~14에 발달하는 실리와 종자들을 각각 수집하고 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성한 다음 상기 cDNA를 주형으로 AtBASS2 cDNA에 특이적으로 결합할 수 있는 전방향 프라이머 AtBASS2_F2(서열번호 5: 5'-AGGTGACTTACCTGAGAGTACT-3')와 역방향 프라이머 AtBASS2_R2(서열번호 6: 5'-GTAAGTAGCAACGTTTGACGC-3')를 이용하여 quantitative real-time PCR을 수행하였다(조건: 94 °C 3분, [94 °C 5초, 56 °C 15초, 72 °C 30 초] * 45 사이클, 95 °C 15초, 60 °C 30초, 95 °C 15초). 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, BASS2 형질전환체에서는 전사 정도가 야생종에 비해 현저하게 높은 것을 확인하였다.
- [67] 상기 결과는 이들 형질전환체의 발달하는 실리와 종자에서 BASS2의 발현이 크게 증가하였음을 의미한다.
- [68]
- [69] 실시예 3. 피루브산 수송체 BASS2 과발현 형질전환체의 종자 크기 분석
- [70] 피루브산 수송체 BASS2의 과발현(OX)이 종자 형성 시 종자의 크기 및 지질 함량에 차이를 일으키는지 확인하기 위해, 도 2의 식물체에서 종자를 수확하여 사진을 찍은 뒤 이미지 프로그램(Image J)을 사용하여 종자의 단면적 넓이를 측정하고, 야생종과 비교하여 계산하였다. 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, BASS2 형질전환체 6개 중 4개에서 야생종에 비해 종자 크기가 더 커지는 것을 확인하였다. 이러한 표현형은 BASS2 형질전환 라인에 따라 종자 크기 증가량이 차이가 있었으나, 약 103%~112%까지 종자 크기가 증가하였음을 확인하였다.
- [71] 상기 결과로부터 BASS2 과발현 형질전환체의 종자 크기가 증가하는 표현형이 피루브산 수송체 BASS2의 도입으로부터 기인하였을 가능성이 높음을 확인하였다.

[72]

- [73] 실시예 4. 피루브산 수송체 BASS2 과발현 형질전환체의 종자 내 총 지질 및 저장 지방 함량과 조성 분석

- [74] 상기 실시예 3에서 확인한 BASS2가 과발현된 형질전환 식물체에서 종자의 크기 증가가 지방 함량 증가에 의한 것인지 알아보기 위하여, 종자의 지질을 추출하여 함량을 분석하였다. 이를 위해, 황산/메탄올 용액을 이용하여 종자 내에 존재하는 모든 지질 산물을 FAME(FATTY ACID METHYL ESTER)으로 분해하였고, 이들을 헥산에 녹인 뒤 GC-MS를 이용하여 지방산의 정량화 및 조성을 분석하였다. 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 종자의 크기가 증가하였던 BASS2 과발현 형질전환체 라인들에서 종자에 존재하는 전체 지질 함량이 현저하게 증가하였음을 알 수 있었다. 상기 결과는 피루브산 수송체 BASS2 과발현 형질전환체 종자의 크기와 지질 함량은 비슷하게 증가하는

경향을 나타냄을 의미한다.

- [75] 다음으로, 종자의 전체 지질 중 저장 지방인 트리아실글리세롤(TRIACYLGLYCEROL)의 함량 분석을 위해, 이를 대표하는 지방산인 C20:1의 양을 측정하여 야생종과 비교한 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 종자의 크기 증가와 전체 지질 함량이 증가한 피루브산 수송체 BASS2 과발현 형질전환체 라인에서 모두 동일하게 C20:1의 양이 야생종에 비해 현저히 증가하였음을 확인하였다.
- [76] 또한, 피루브산 수송체 BASS2 과발현 형질전환체 종자에서 추출한 지방산의 조성을 분석한 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 모든 지방산의 비율이 야생종과 유사한 것으로 나타났다.
- [77] 상기 결과로부터 BASS2 과발현 형질전환체의 종자에서 모든 지방산의 함량이 다 같이 증가하며, 이로 인해 종자의 저장 지방인 트리아실글리세롤의 축적량 역시 증가함을 알 수 있다.

[78]

[79] 실시예 5. 피루브산 수송체 BASS2 과발현 형질전환체 종자의 단백질과 탄수화물 함량 분석

- [80] 상기 실시예 3에서 확인한 BASS2가 과발현된 형질전환 식물체에서 종자의 크기 증가가 지방 함량뿐만 아니라 다른 종자 대사물질인 단백질 및 탄수화물의 함량 증가에 의한 것인지 알아보기 위하여, 종자의 단백질 및 수크로오스와 녹말을 추출하여 함량을 분석하였다. 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 종자의 크기가 증가하였던 BASS2 과발현 형질전환체 라인들에서 종자에 존재하는 단백질 및 수크로오스와 녹말의 양이 야생종보다 약간 감소하거나 증가하였으나 현저하게 다르지 않음을 알 수 있었다.
- [81] 상기 결과로부터 야생종에 비해 BASS2 과발현 형질전환체 종자의 크기가 증가한 것은 단백질 또는 탄수화물의 증가에 의한 것이 아니라 지방 함량 증가에 기인한 것임을 알 수 있다.

[82]

[83] 실시예 6. 피루브산 수송체 BASS2 과발현 형질전환체의 종자 수확량 분석

- [84] 종자 크기 및 단일 종자 내 지질 함량의 증가로 인해 단일 식물체에서 종자 수확량이 감소할 가능성이 있으므로, 이를 확인하기 위하여, 피루브산 수송체 BASS2 과발현 형질전환체의 중심 줄기에 맺힌 실력의 수 및 실력에 존재하는 종자의 수를 관찰하였다. 그 결과, 도 8a 및 8b에 나타낸 바와 같이, OX4와 OX6을 제외한 모든 라인에서 실력의 수 및 종자의 수가 야생종과 유사하였다. 또한, 단일 식물체에서의 종자 수확량을 계산한 결과, 도 8c에 나타낸 바와 같이, 야생종과 값이 다르지 않음을 확인하였다.
- [85] 상기 결과를 통해 BASS2 과발현 형질전환체에서 보이는 표현형이 단일 식물의 종자 수확량에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

[86]

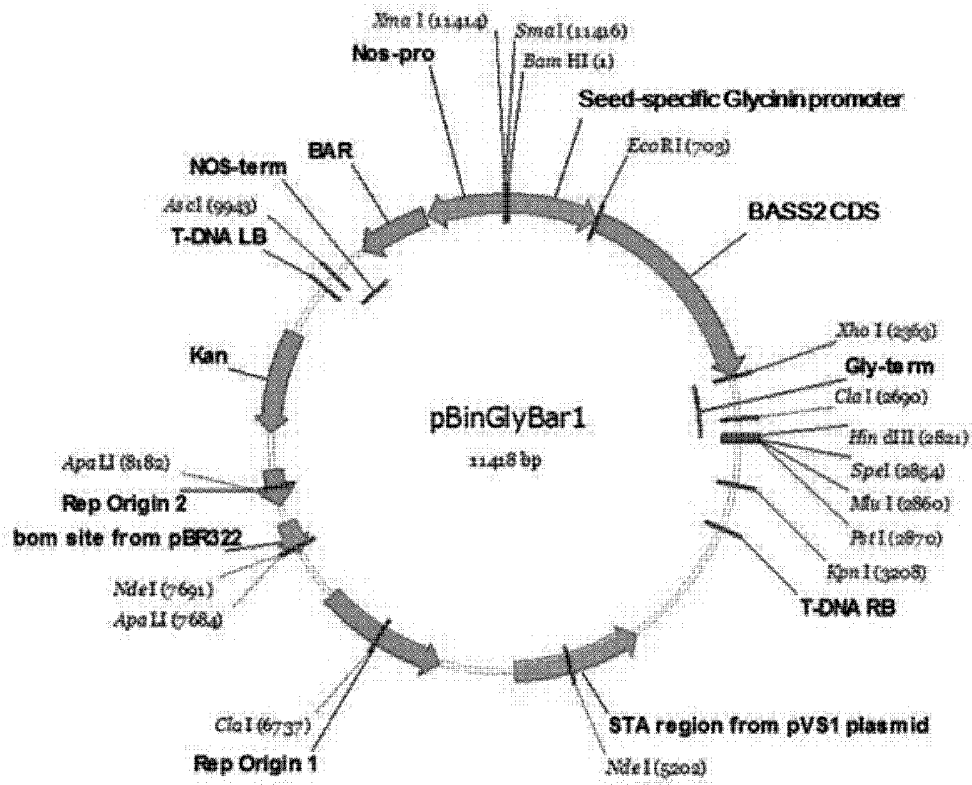
- [87] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

청구범위

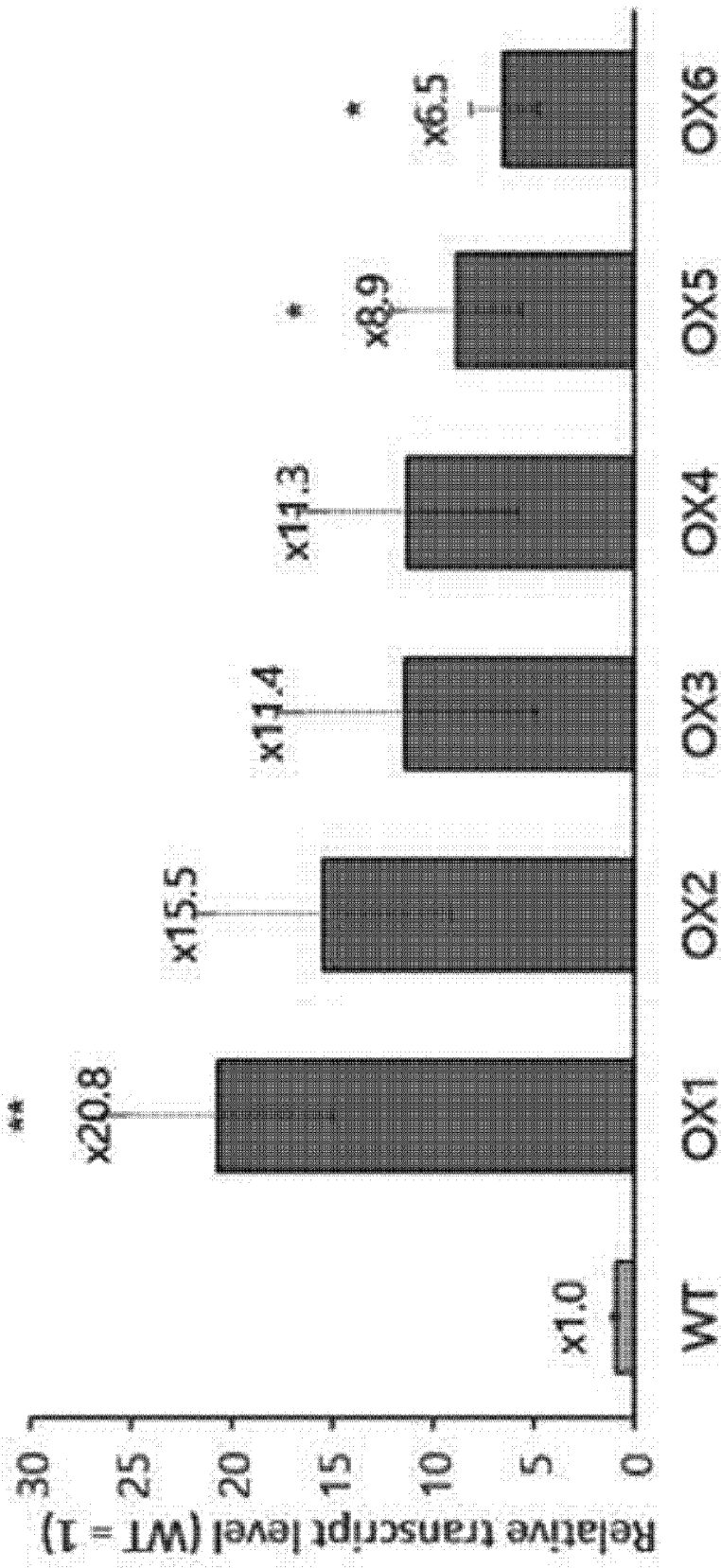
- [청구항 1] 식물의 BASS2(BILE ACID:SODIUM SYMPORTER 2) 단백질을 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량 증가용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 BASS2 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 상기 유전자를 과발현시키기 위한 발현벡터 또는 상기 발현벡터로 형질전환된 미생물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 종자 내 저장 지방은 트리아실글리세롤인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 식물은 배추, 무, 브로콜리, 갓, 애기장대, 유채, 카멜리나, 해바라기, 아마, 목화, 콩, 홍화, 카놀라, 참깨, 들깨, 땅콩, 피마자, 카렌둘라, 장미, 코코넛, 야자수, 포도, 살구, 벼, 옥수수, 잔디, 미세조류, 및 자두로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 6] 식물의 BASS2(BILE ACID:SODIUM SYMPORTER 2) 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 식물체로 도입하는 단계를 포함하는, 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량을 증가시키는 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 BASS2 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
상기 발현벡터는 상기 유전자를 과발현시키기 위한 프로모터가 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 9] 제6항에 있어서,
상기 종자 내 저장 지방은 트리아실글리세롤인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 10] 제6항에 있어서,
상기 식물은 배추, 무, 브로콜리, 갓, 애기장대, 유채, 카멜리나, 해바라기, 아마, 목화, 콩, 홍화, 카놀라, 참깨, 들깨, 땅콩, 피마자, 카렌둘라, 장미, 코코넛, 야자수, 포도, 살구, 벼, 옥수수, 잔디, 미세조류, 및 자두로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 11] 제6항의 방법에 따라 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량이 증가된 식물체.

- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 식물체는 식물의 조직, 세포, 및 종자로 이루어진 군으로부터
선택되는 것을 특징으로 하는, 식물체.
- [청구항 13] 제6항의 방법에 의해 제조된 크기 및 저장 지방의 함량이 증가된 종자.
- [청구항 14] 제1항의 조성물의, 식물 종자의 크기 및 종자 내 저장 지방의 함량 증가
용도.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 BASS2 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는
폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는, 용도.
- [청구항 16] 제14항에 있어서,
상기 종자 내 저장 지방은 트리아실글리세롤인 것을 특징으로 하는, 용도.
- [청구항 17] 제14항에 있어서,
상기 식물은 배추, 무, 브로콜리, 갓, 애기장대, 유채, 카멜리나, 해바라기,
아마, 목화, 콩, 홍화, 카놀라, 참깨, 들깨, 땅콩, 피마자, 카렌둘라, 장미,
코코넛, 야자수, 포도, 살구, 벼, 옥수수, 잔디, 미세조류, 및 자두로
이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 용도.

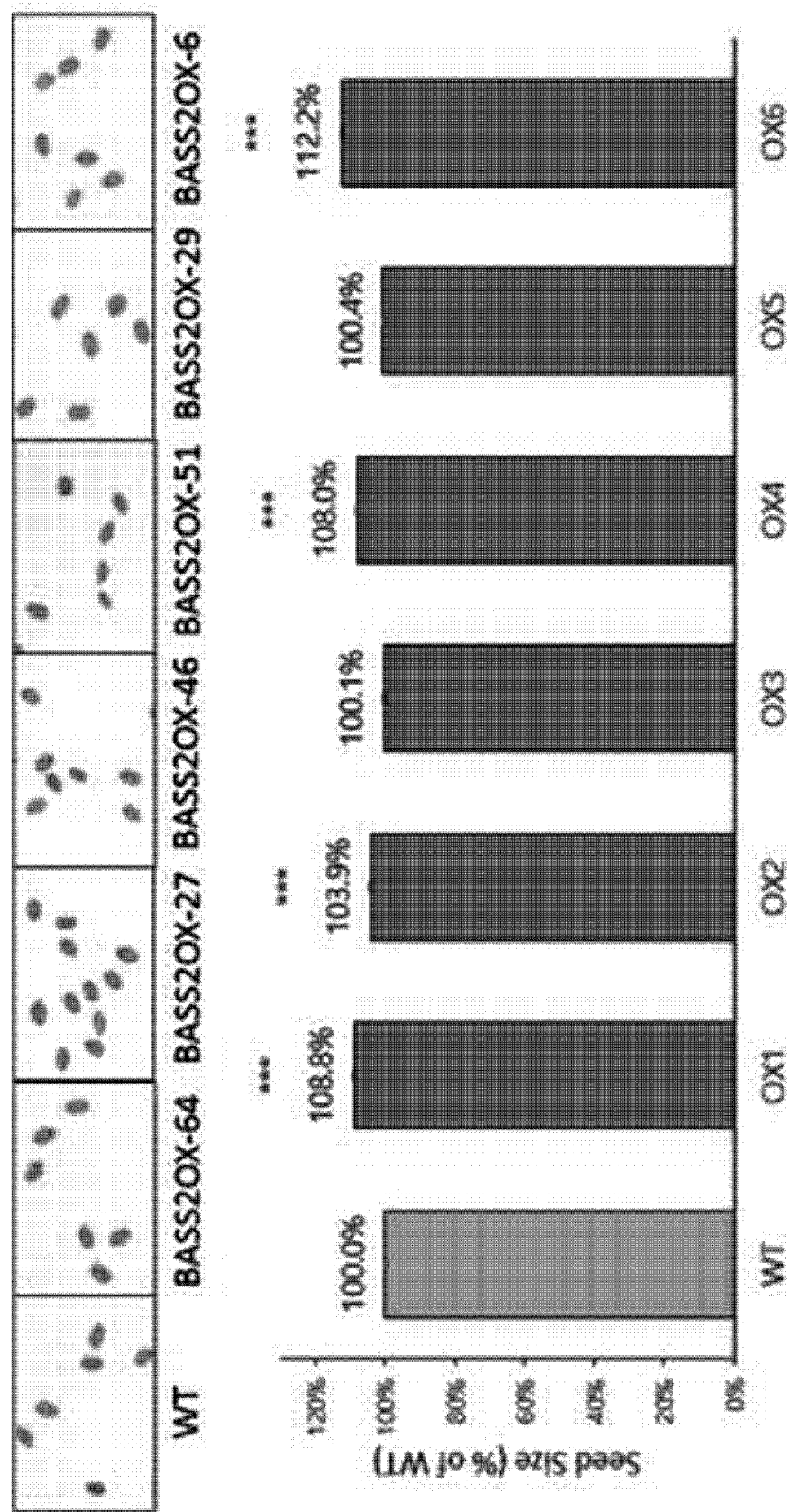
[도1]



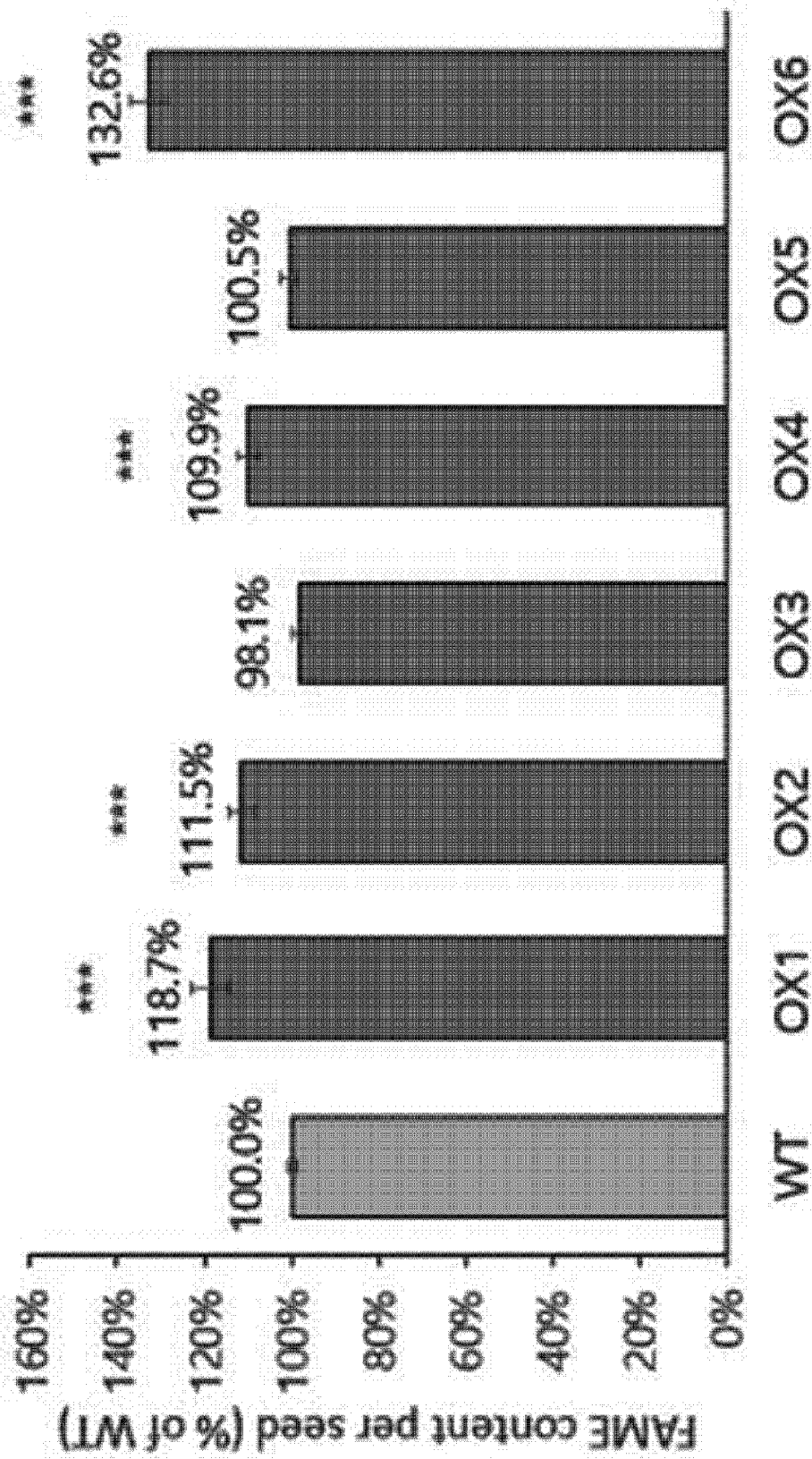
[도2]



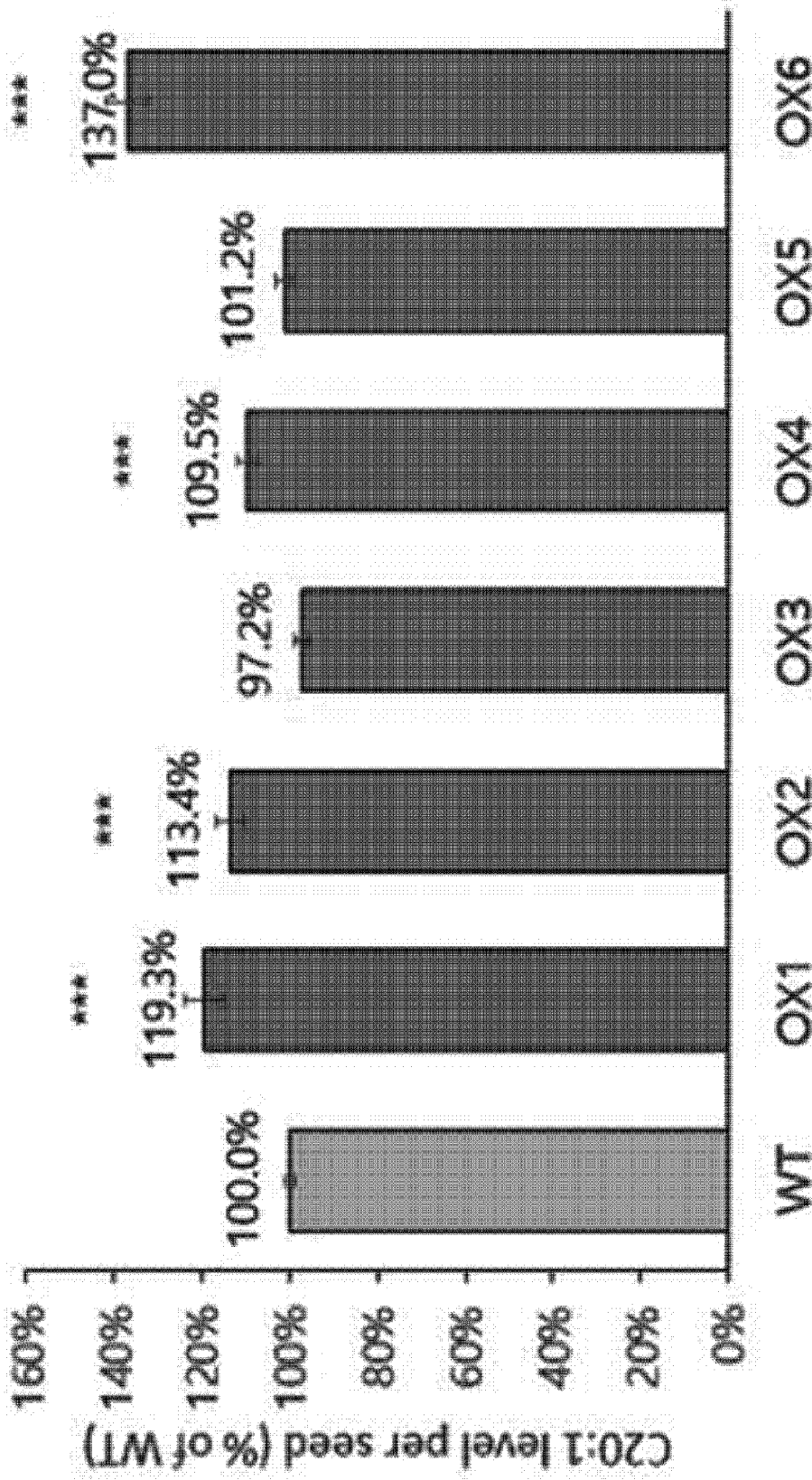
[도3]



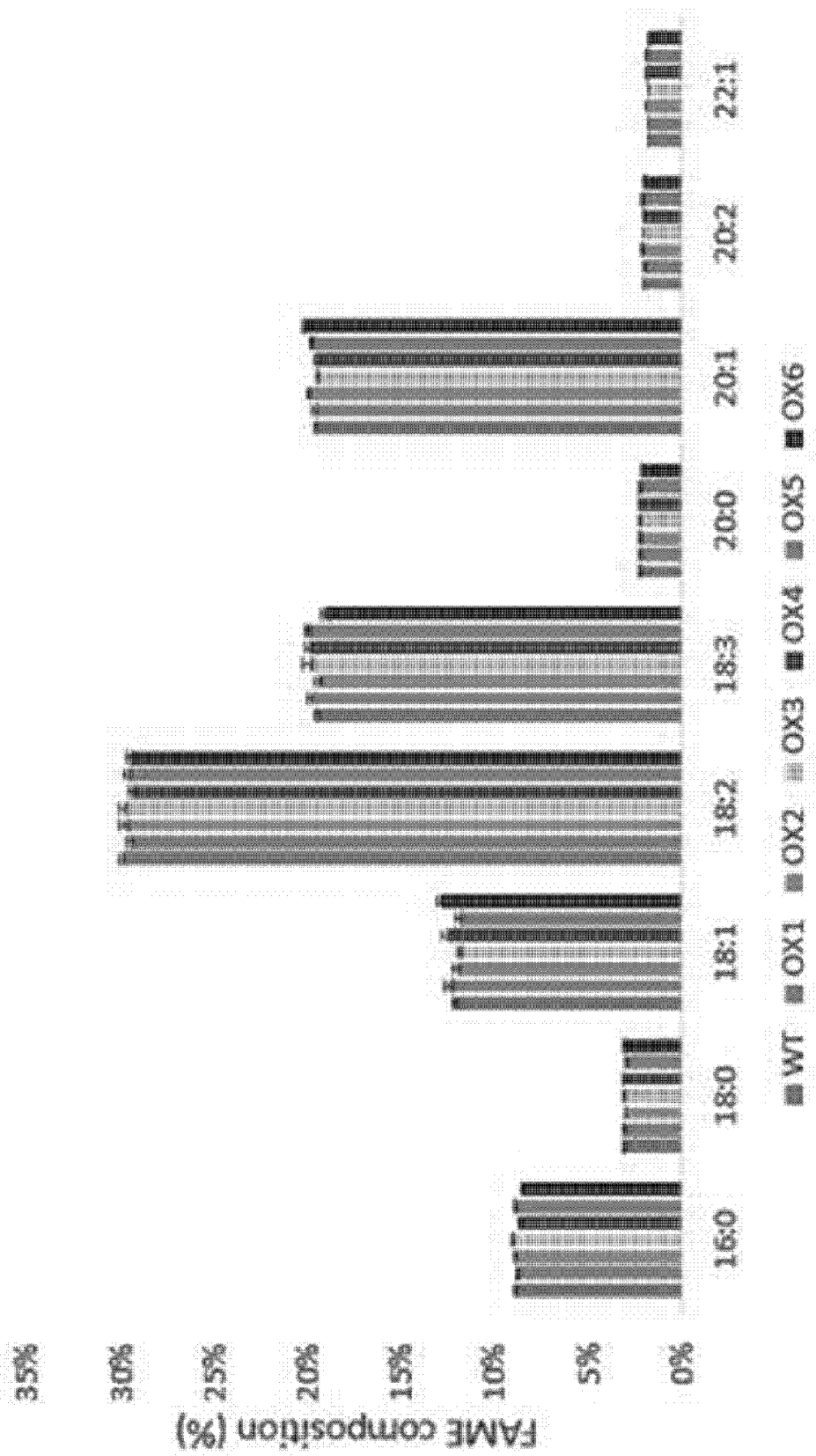
[도4]



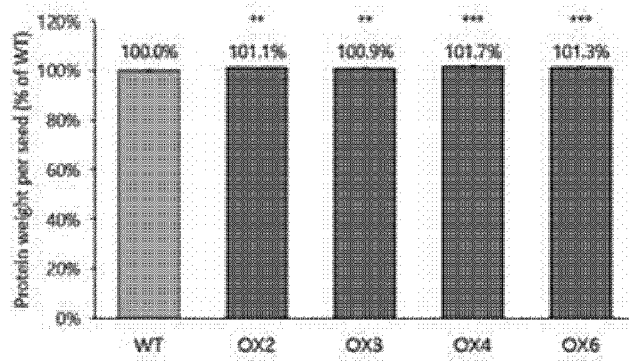
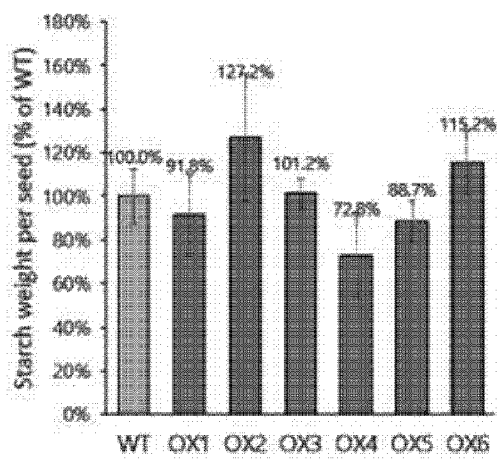
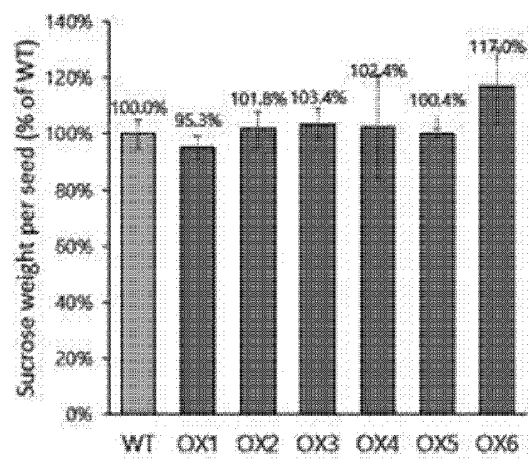
[도5]



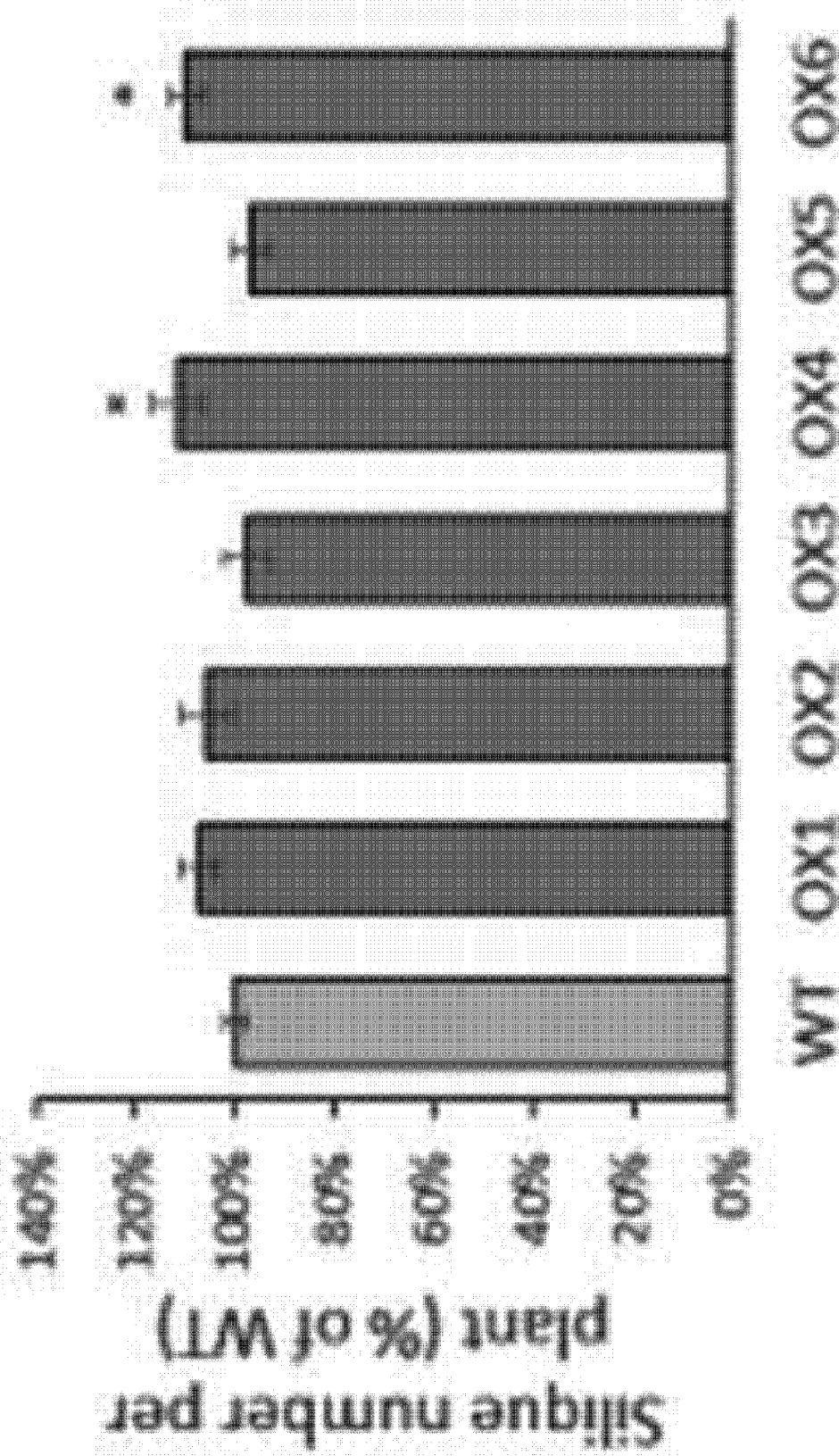
[56]



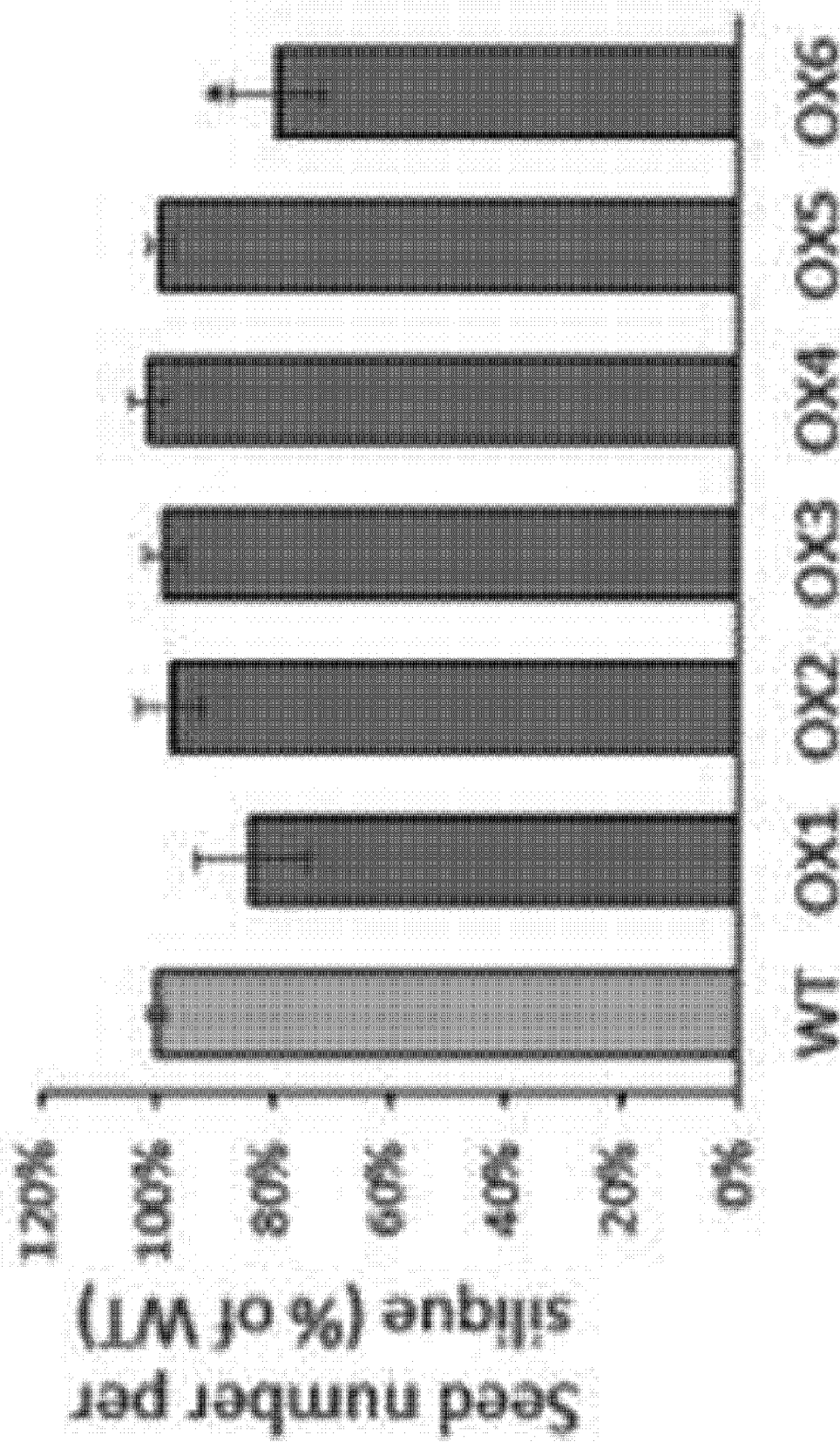
[도7]

Protein Content**Starch Content****Sucrose Content**

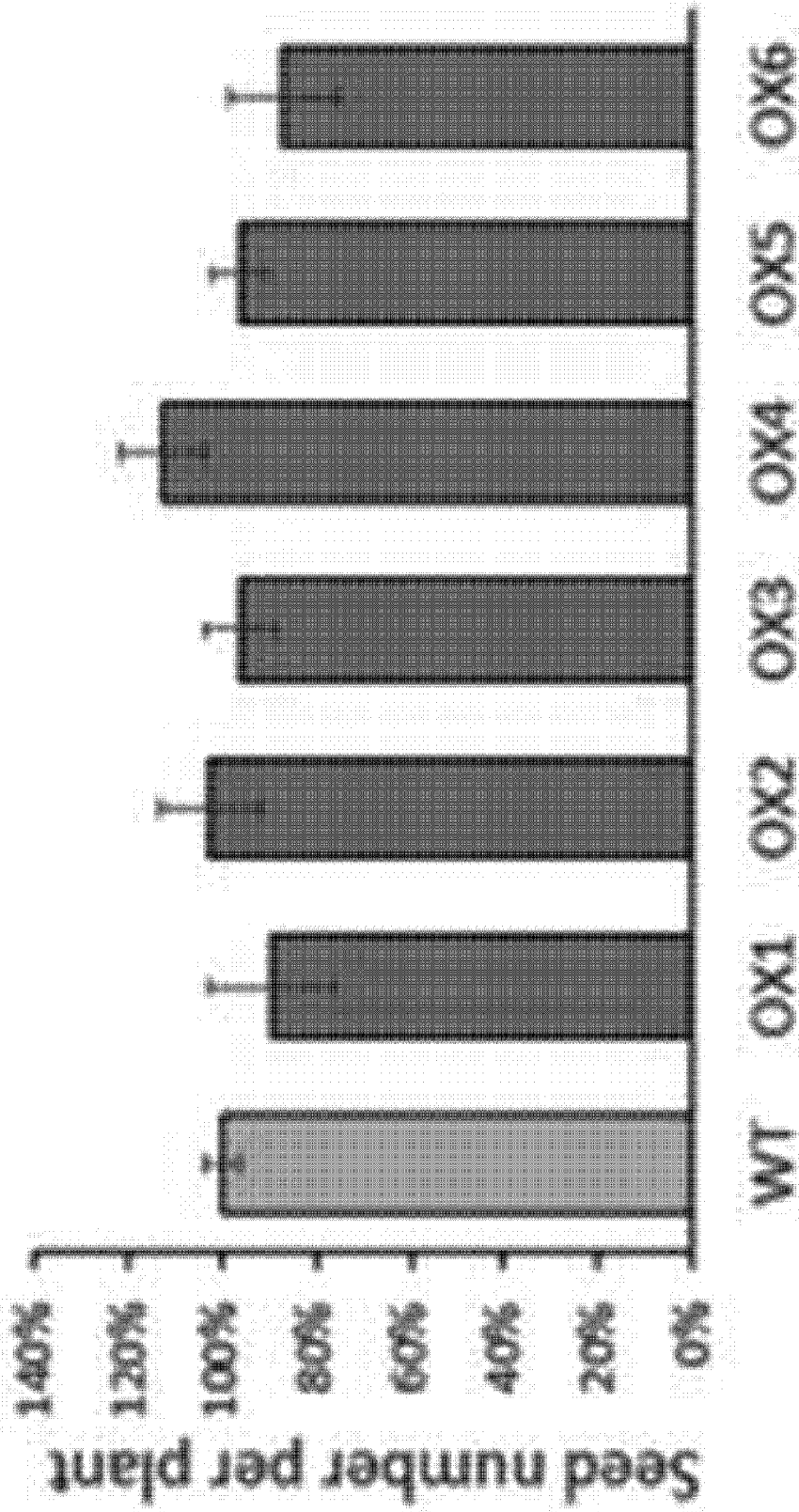
[도8a]



[도8b]



[도8c]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/009411**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/82(2006.01)i, C07K 14/415(2006.01)i, A01H 5/00(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; C12N 15/29; A01H 5/00; 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: BASS2, BILE ACID:SODIUM SYMPORTER 2, plants seed, fat, storage, expression vector, induction, size

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2012-0080077 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) 16 July 2012 See claims 1-14.	1-17
A	LUDEWIG, F. et al., "Role of Metabolite Transporters in Source-sink Carbon Allocation", Frontiers in Plant Science, 02 July 2013, vol. 4, paper no. 231, inner pages 1-16 See abstract; page 7; figure 2.	1-17
A	NCBI, GenBank Accession No. NP_850089.1, "Sodium/Pyruvate Cotransporter BASS2 [Arabidopsis Thaliana]", 22 January 2014 See sequence.	1-17
A	KR 10-2012-0007038 A (DOW AGROSCIENCES LLC.) 19 January 2012 See abstract; claims 1-14.	1-17
A	KULAHOGLU, C. et al., "Comparative Transcriptome Atlases Reveal Altered Gene Expression Modules between Two Cleomaceae C3 and C4 Plant Species", The Plant Cell, August 2014, vol. 26, no. 8, pages 3243-3260 See abstract; pages 3247-3248.	1-17



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

02 FEBRUARY 2016 (02.02.2016)

Date of mailing of the international search report

02 FEBRUARY 2016 (02.02.2016)

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/009411

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0080077 A	16/07/2012	CA 2824015 A1	12/07/2012
		EP 2661959 A1	13/11/2013
		KR 10-1283857 B1	08/07/2013
		US 2013-0283481 A1	24/10/2013
		WO 2012-093764 A1	12/07/2012
KR 10-2012-0007038 A	19/01/2012	AU 2010-233155 A1	14/10/2010
		CA 2758195 A1	14/10/2010
		CN 102458098 A	16/05/2012
		EP 2416643 A2	15/02/2012
		JP 2012-523237 A	04/10/2012
		US 2010-0281574 A1	04/11/2010
		US 2011-0167515 A1	07/07/2011
		US 8927806 B2	06/01/2015
		WO 2010-118338 A2	14/10/2010
		WO 2010-118338 A3	31/03/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/82(2006.01)i, C07K 14/415(2006.01)i, A01H 5/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/82; C12N 15/29; A01H 5/00; 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: BASS2, BILE ACID:SODIUM SYMPORTER 2, 식물 종자, 지방, 저장, 발현벡터, 도입, 크기

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2012-0080077 A (포항공과대학교 산학협력단) 2012.07.16 청구항 1-14 참조.	1-17
A	LUDEWIG, F. 등, `Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation`, Frontiers in Plant Science, 2013.07.02., 4권, 논문번호 231, 내부 페이지 1-16 요약; 페이지 7; 도면 2 참조.	1-17
A	NCBI, GenBank Accession No. NP_850089.1, `sodium/pyruvate cotransporter BASS2 [Arabidopsis thaliana]`, 2014.01.22 서열 참조.	1-17
A	KR 10-2012-0007038 A (다우 아그로사이언시즈 엘엘씨) 2012.01.19 요약; 청구항 1-14 참조.	1-17
A	KULAHOGLU, C. 등, `Comparative transcriptome atlases reveal altered gene expression modules between two Cleomaceae C3 and C4 plant species`, The Plant Cell, 2014.08., 26권, 8호, 페이지 3243-3260 요약; 페이지 3247-3248 참조.	1-17

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 02월 02일 (02.02.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 02월 02일 (02.02.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

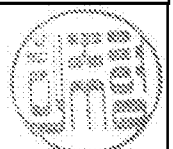
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2012-0080077 A	2012/07/16	CA 2824015 A1	2012/07/12
		EP 2661959 A1	2013/11/13
		KR 10-1283857 B1	2013/07/08
		US 2013-0283481 A1	2013/10/24
		WO 2012-093764 A1	2012/07/12
KR 10-2012-0007038 A	2012/01/19	AU 2010-233155 A1	2010/10/14
		CA 2758195 A1	2010/10/14
		CN 102458098 A	2012/05/16
		EP 2416643 A2	2012/02/15
		JP 2012-523237 A	2012/10/04
		US 2010-0281574 A1	2010/11/04
		US 2011-0167515 A1	2011/07/07
		US 8927806 B2	2015/01/06
		WO 2010-118338 A2	2010/10/14
		WO 2010-118338 A3	2011/03/31