(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0077369
(43) 공개일자 2018년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8216 (2013.01)
C12N 15/8289 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0181063
(22) 출원일자 2016년12월28일
심사청구일자 2016년12월28일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
전종성
경기도 안양시 동안구 동안로 101 103동 1302호 (호계동, 목련선경아파트)
이상규
경기도 용인시 기흥구 서천동로 60 408동 1103호 (서천동, 서천마을4단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 19 항

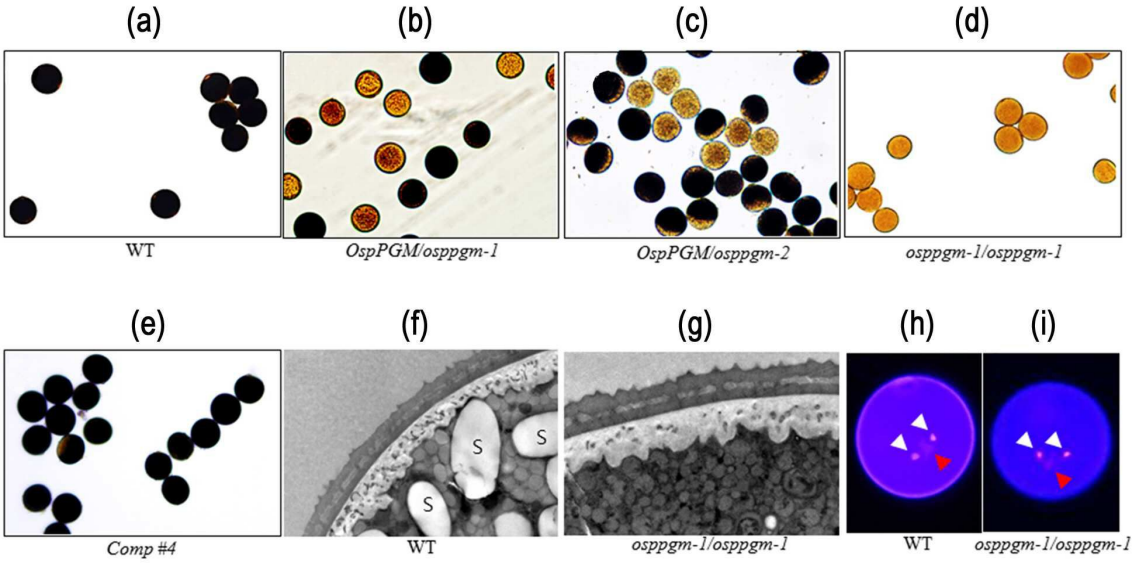
(54) 발명의 명칭 **OspPGM 유전자를 이용한 웅성불임 벼의 제조방법, 벼의 웅성불임 유도용 조성물 및 웅성불임 벼**

(57) 요 약

본 발명은 *OspPGM* 유전자를 이용한 웅성불임 벼의 제조방법, 벼의 웅성불임 유도용 조성물 및 웅성불임 벼에 관한 것이다. 구체적으로는 벼에서 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는 웅성불임 벼의 제조방법, 모본인 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 벼(T1) 및 부본인 웅성 가임의 벼(T1)와 교배시키는 단계를 추가로 포함하

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도5



는 웅성불임 계통 벼(T2)의 제조방법, *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 벼의 웅성불임 유도용 조성물, *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 벼, *OspPGM* 유전자 발현여부를 판단하는 단계를 포함하는 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법, *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 계통 벼에서, *OspPGM* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 벼의 임성 회복 방법, 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 *OspPGM* 유전자를 포함하는 벼의 임성 회복용 조성물, 및 후보물질을 처리한 벼에서 *OspPGM* 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 웅성불임 벼의 제조방법은 벼에서 발현하는 유전자인 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하여 웅성불임 벼를 제조하는 것이 가능하다. 이를 통해 웅성불임 벼를 유도하는 것이 가능하며, 웅성불임 벼의 제조가 가능한 신규 유전자를 발견하였기 때문에 보다 다양한 방법으로 웅성불임 벼를 생산하는 것이 가능하게 되었다.

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
G01N 33/68 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/415 (2013.01)

(72) 발명자
엄준섭
경기도 용인시 기흥구 서천서로 125 305동 106호
(농서동,서천마을휴먼시아3단지)

안진흥
경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 210동 1703호 (
공세동, 탑실마을대주피오레2단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ011798012016
부처명 농림수산식품부
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린사업
연구과제명 광합성 산물의 저장 및 수송 조절을 통한 분배 최적화 연구
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2016.01.04 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

벼에서 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계는 *OspPGM* 유전자의 일부 염기를 치환 또는 결실하여 이루어지는 것인, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단계는 T-DNA 삽입에 의해 이루어지는 것인, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 방법은 모본인 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 벼, 및 부본인 웅성 가임의 벼와 교배시키는 단계를 추가로 포함하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 *OspPGM* 유전자는 엽록체에 존재하는 것인, 웅성불임 벼의 제조방법.

청구항 6

모본인 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 벼(T1), 및 부본인 웅성 가임의 벼(T1)와 교배시키는 단계를 추가로 포함하는, 웅성불임 계통 벼(T2)의 제조방법.

청구항 7

OspPGM 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 제제는 *OspPGM* 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 벼의 웅성불임 유도용 조성물.

청구항 9

OspPGM 유전자의 발현이 억제된, 웅성불임 벼.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 벼의 웅성불임은 가역적인 것인, 웅성불임 벼.

청구항 11

OspPGM 유전자 발현여부를 판단하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법.

청구항 12

OspPGM 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성 불임성 확인용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 제제는 *OspPGM* 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브인 것인, 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 제제는 상기 *OspPGM* 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머인 것인, 조성물.

청구항 15

OspPGM 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 계통 벼에서, *OspPGM* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 벼의 임성 회복 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 단계는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 *OspPGM* 유전자를 포함하는 벡터를 벼에 형질전환시켜 이루어지는 것인, 벼의 임성 회복 방법.

청구항 17

서열번호 1의 염기서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 *OspPGM* 유전자를 포함하는, 벼의 임성 회복용 조성물.

청구항 18

후보물질을 처리한 벼에서 *OspPGM* 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도제의 스크리닝 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 방법은 상기 측정된 발현량이, 후보물질을 처리하지 않은 벼의 발현량에 비하여 억제할 경우, 벼의 웅성불임 유도제로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 벼의 웅성불임 유도제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 *OspPGM* 유전자를 이용한 웅성불임 벼의 제조방법, 벼의 웅성불임 유도용 조성물 및 웅성불임 벼에 관한 것이다. 구체적으로는 벼에서 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는 웅성불임 벼의 제조방법, 모본인 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 벼(T1) 및 부본인 웅성 가임의 벼(T1)와 교배시키는 단계를 추가로 포함하는 웅성불임 계통 벼(T2)의 제조방법, *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 벼의 웅성불임 유도용 조성물, *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 벼, *OspPGM* 유전자 발현여부를 판단하는 단계를 포함하는 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법, *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 계통 벼에서, *OspPGM* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 벼의 임성 회복 방법, 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 *OspPGM* 유전자를 포함하는 벼의 임성 회복용 조성물, 및 후보물질을 처리한 벼에서 *OspPGM* 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 벼는 국내는 물론 전 세계의 3분의 1 이상의 나라에서 주식으로 삼고 있는 쌀의 생산식물로서 경제적으로 중요한 농작물 중 하나이다. 이 작물의 생산량 증대를 위해 웅성불임 도입을 통한 F1 하이브리드 생산은 모든 세계 연구자가 주목하고 있는 기술개발이다. 벼에서도 세포질 웅성불임(CMS) 방식이 가능하나 생산비용이나 실제 이용면에서는 현실적이지 못하고 유전자 조작에 의한 웅성불임 형질전환체 개발 방식에는 타페튬(tapetum) 특이적 프로모터를 이용하면서 외부 독성유전자(박테리아 또는 식물체 유전자)를 이용하여 선택적인 수술 조직의 사멸을 유도함으로써 웅성불임을 만드는 방법이 이용되고 있다.

[0004] 수술은 꽃 식물의 웅성 생식기관으로 타페튬, 엔도세시움(endothecium), 결합조직, 관다발 조직 등의 다수 조직으로 구성되며 꽃가루의 생산을 담당한다. 수술의 발달과정은 수술의 형태가 확립되고 마이크로스포어(microspore) 모세포가 감수분열하여 테트라드의 마이크로스포어를 형성하는 제1기와, 꽃가루와 수술이 분화되고 조직 퇴화, 열개(dehiscence) 및 꽃가루 방출이 일어나는 제2기로 구분되는데, 이러한 발달과정에 관여하는 다양한 유전자 중 일부만이 수술에서 발현된다.

[0005] 그 예로서 대한민국 공개특허 제2005-0075170호(이하 이를 '특허문헌 1' 이라 칭함)는 '벼 수술 특이적 발현 시스테인 프로테아제 유전자, 상기 유전자의 수술 특이적 발현 프로모터, 상기 유전자의 발현 억제를 이용한 웅성불임 도입벼의 생산방법' 에 관한 것이다. 상기 특허문헌 1에서는 시스테인 프로테아제 유전자가 수술 특이적으로 발현됨에 관한 내용이 개시되어 있으며, 이로 인해 상기 시스테인 프로테아제 유전자를 이용하여 웅성불임 벼의 제조가 가능함이 개시되어 있다.

[0006] 또한 대한민국 공개특허 제2009-0069397호(이하 이를 '특허문헌 2' 라 칭함)는 '불투명 심백배유 발현과 웅성불임을 유발시키는 다면발현성을 갖는 식물체의 ＵＧＰａｓｅ１ 유전자' 에 관한 것이다. 상기 특허문헌 2에서는 ＵＧＰａｓｅ１ 유전자가 벼의 웅성불임에 관여하는 내용이 개시되어 있다.

[0007] 이러한 특허문헌 1 및 특허문헌 2에 개시된 유전자 이외에도 많은 유전자가 벼에서 발현될 것으로 예상되나, 이

에 관여하는 유전자는 아직 소수의 유전자만이 발견된 실정이다. 보다 다양한 유전자가 벼에서 발현됨을 발견하고, 이를 벼의 웅성불임에 도입하는 것이 가능함에도 불구하고, 이에 관한 연구는 현재 많이 부족한 실정이다.

[0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 벼에서 발현하는 유전자를 발견하고, 이를 웅성불임에 도입하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 화분 발달에 관여하는 *OspPGM* 유전자를 확인하고, 이를 이용하여 웅성불임이 유도된 벼를 제조하는 것이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 대한민국 공개특허 제2005-0075170호

(특허문헌 0002) 특허문헌 2: 대한민국 공개특허 제2009-0069397호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 주된 목적은 벼에서 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는 웅성불임 벼의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 모본인 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 벼(T1), 및 부본인 웅성 가임의 벼(T1)와 교배시키는 단계를 추가로 포함하는 웅성불임 계통 벼(T2)의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 벼의 웅성불임 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 벼를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 *OspPGM* 유전자 발현여부를 판단하는 단계를 포함하는 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 *OspPGM* 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 벼의 웅성 불임성 확인용 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 계통 벼에서, *OspPGM* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 벼의 임성 회복 방법을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 *OspPGM* 유전자를 포함하는 벼의 임성 회복용 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 후보물질을 처리한 벼에서 *OspPGM* 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 벼의 웅성불임 유도제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 본 발명자들은 웅성불임이 유도된 벼를 제조하기 위하여 다양한 연구를 수행하던 중, *OspPGM* 이 화분 발달에 관여하는 유전자임을 확인하고, *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하여 웅성불임 벼를 제조할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0023] 이처럼 벼에서 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하여 웅성불임 벼의 제조가 가능하다는 사실은 지금까지 전혀 알려지지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 규명되었다.

[0025] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 벼에서 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 웅성불임 벼의 제조방법을 제공한다.

[0026] 상기 웅성불임 벼의 제조방법은 벼에서 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제시켜 화분 생성양을 감소시켜 벼의 웅성불임을 유도하는 것이다.

[0027] 본 발명에서 용어 "벼"는 학명이 *Oryza sativa* L.이며, 일년생 초본식물이고, 본 발명에서의 벼에는 자포니카(Japonica)형, 인디카(Indica)형 및 자바니카(Javanica)형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어, "*OspPGM*"는 서열번호 1로 표시되는 유전자를 의미할 수 있으나, 이와 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 상기 실질적인 동일성은 서열번호 1의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 또는 상기 유전자는 서열번호 1의 유전자가 코딩하는 단백질 *OspPGM*과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 의미할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 용어, "웅성불임"은 웅성기관의 형태적 또는 기능적 이상 때문에 수분, 수정, 종자현상이 이루어지지 않는 현상을 의미하며, 환경적인 일시적 변이로서 발현하는 경우와 유전형질로서 발현하는 경우가 있으나, 본 발명에서의 웅성불임은 유전형질로서 유도되는 것일 수 있다. 특히, 본 발명에서의 웅성불임은 화분 생산에 관여하는 핵의 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하여 유도되는 것일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 상기 단계는 *OspPGM* 유전자의 1 이상의 일부 염기를 치환 또는 결실하여 이루어지는 것일 수 있다. 예를 들어 전장 DNA 중 10%, 구체적으로는 0.01% 이상의 염기를 치환 또는 결실하여 이루어지는 것일 수 있다.

[0031] 또한 상기 단계는 T-DNA 삽입에 의해 이루어지는 것일 수 있다. 본 발명에서의 T-DNA는 *OspPGM* 유전자의 인트론 또는 엑손에 삽입되는 것일 수 있다. 예를 들어 상기 T-DNA 삽입 벼의 T2 자손에 대한 유전자형 분석결과에 따르면 다음 세대에 동일-분리(co-segregation)되며, *OspPGM* 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이체 중 동형접합체를 포함하는 식물은 화분 발달에 있어 전체적으로 심각한 지연을 보이면서 웅성불임 벼가 제조될 수 있다. 즉, 상기 웅성불임 벼는 비정상적인 화분 발달을 보여, 수술이 매우 적은 수의 화분을 포함하고 있을 수 있다. 또한 본 발명에서 상기 T-DNA가 *OspPGM* 유전자에 삽입되는 위치는 특별한 제한이 있는 것은 아니며, 구체적인 일 실시예에 의하면 5번째 인트론 또는 10번째 인트론에 삽입되는 것일 수 있다.

[0032] 또한 상기 단계는 T-DNA와 같은 식물 게놈내 삽입이 가능한 외래 유전자 외에도, TOS17과 같은 내생 트랜스포존을 이용하거나 엑스레이(X-ray)나 감마레이(gamma-ray) 등을 주사하여 돌연변이를 유발하거나, RNAi 또는 안티센스 방법을 이용하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 일예로, 상기 방법은 모본인 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 벼, 및 부본인 웅성 가임의 벼와 교배시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이와는 반대로 부본이 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 벼, 및 모본인 웅성 가임의 벼와 교배시키는 단계를 추가로 포함하게 되면 웅성불임의 벼를 제조할 수 없다.

[0034] 또한 상기 *OspPGM* 유전자는 엽록체에 존재하는 것일 수 있다. 따라서 상기 방법은 세포질이 아닌 엽록체에 존재하는 유전자의 기능을 상실시키는 것일 수 있다.

[0036] 다른 양태로서, 본 발명은 모본인 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 벼(T1), 및 부본인 웅성 가임의 벼(T1)와 교배시키는 단계를 포함하는, 웅성불임 계통 벼(T2)의 제조방법을 제공한다.

[0037] 상기 모본인 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 벼(T1)와 부본인 웅성 가임의 벼(T1)를 교배시켜야 웅성불임 계통의 벼(T2)를 제조할 수 있으며, 이와 반대로 부본이 OspPGM 유전자의 발현이 억제된 벼(T1)와 모본인 웅성 가임의 벼(T1)를 교배시키는 경우에는 웅성불임 계통의 벼(T2)를 제조할 수 없다.

[0038] 상기 교배에서 교배 방법은 가장 일반적으로 벼 교배 육종에 가장 많이 사용하는 절영법을 이용하여 진행한다.

[0040] 다른 양태로서, 본 발명은 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물을

제공한다.

[0041] 상기 제제는 *OspPGM* 유전자 또는 mRNA에 직접 또는 간접적으로 결합하여 OspPGM 의 발현을 억제할 수 있는 물질을 의미한다.

[0042] 예를 들어 상기 제제는 *OspPGM* 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 siRNA, shRNA, miRNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 *OspPGM* 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하여 *OspPGM* 단백질 합성을 위한 번역을 억제할 수 있다.

[0044] 다른 양태로서, 본 발명은 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된, 웅성불임 벼를 제공한다.

[0045] 상기 벼는 자포니카(Japonica)형, 인디카(Indica)형 및 자바니카(Javanica)형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며 모든 벼 품종에 적용 가능하다.

[0046] 상기 벼의 웅성불임은 가역적인 것일 수 있다. 즉, 상기 웅성불임의 벼의 임성은 정상적인 *OspPGM* 유전자의 도입에 의해서 회복될 수 있다.

[0048] 다른 양태로서, 본 발명은 *OspPGM* 유전자 발현여부를 판단하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법을 제공한다.

[0049] 상기 *OspPGM* 유전자의 발현여부를 판단하여 그 발현이 억제된 경우 벼의 웅성불임성을 확인할 수 있다.

[0050] 상기 판단하는 단계는 상기 *OspPGM* 유전자의 mRNA 수준 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하여 이루어지는 것일 수 있다.

[0051] 상기 유전자의 mRNA 수준은 별도의 제제를 이용하여 측정할 수 있다. 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 예를 들어 상기 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.

[0052] 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RTPCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블럿팅(Northern blotting), DNA 칩 분석법일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0053] 상기 단백질의 수준은 별도의 제제를 이용하여 측정할 수 있다. 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 예를 들어 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0054] 상기 "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미한다. 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 될 수 있다.

[0055] 상기 "앱타머"는 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앱타머는 그 염기서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앱타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 앱타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있으나 이들에 한정되지 않는다.

[0056] 상기 단백질의 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블럿(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색 법(immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence),

[0057] 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0059] 다른 양태로서, 본 발명은 *OspPGM* 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성 불임성 확인용 조성물을 제공한다.

[0060] 상기 제제는 상기 *OspPGM* 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브 일 수 있다.

[0061] 상기 제제는 상기 *OspPGM* 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머 일 수 있다.

[0063] 다른 양태로서, 본 발명은 *OspPGM* 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 계통 벼에서, *OspPGM* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 벼의 임성 회복 방법을 제공한다.

[0064] 일예로 상기 단계는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 *OspPGM* 유전자를 포함하는 벡터를 벼에 형질전환시켜 벼의 임성 회복을 유도할 수 있다.

[0065] 구체적으로, 상기 단계는 서열번호 1의 유전자와 액틴 프로모터, 사이토크롬 C, 유비퀴틴 프로모터(ubiquitin(ubi) promoter (Pubi)) 등과 같은 식물에서 작용가능한 강프로모터를 작동가능하게 연결키거나, 적절한 위치에 인핸서와 서열번호 1의 유전자를 포함하는 DNA 단편을 삽입하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 다른 양태로서, 본 발명은 *OspPGM* 유전자를 포함하는, 벼의 임성 회복용 조성물을 제공한다.

[0068] 상기 *OspPGM* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 유전자를 의미할 수 있으나, 이와 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 상기 실질적인 동일성은 서열번호 1의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 또는 상기 유전자는 서열번호 1의 유전자가 코딩하는 단백질 *OspPGM*과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 의미할 수 있다.

[0070] 다른 양태로서, 본 발명은 후보물질을 처리한 벼에서 *OspPGM* 유전자 또는 그의 단백질의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0071] 상기 발현양을 측정하는 방법은 상기한 것과 같다.

[0072] 상기 방법은 상기 측정된 발현량이, 후보물질을 처리하지 않은 벼의 발현량에 비하여 감소한 경우, 상기 후보물질은 벼의 웅성불임 유도제로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0074] 본 발명에 따른 웅성불임 벼의 제조방법은 벼에 유전자인 *OspPGM* 유전자의 발현을 억제하여 웅성불임 벼를 제조하는 것이 가능하다. 이를 통해 웅성불임 벼를 유도하는 것이 가능하며, 웅성불임 벼의 제조가 가능한 신규 유전자를 발견하였기 때문에 보다 다양한 방법으로 웅성불임 벼를 생산하는 것이 가능하게 되었다. 본 *OspPGM* 유전자 활성을 조절한 웅성불임 계통의 경우 환경의 영향을 거의 받지 않고 안정적으로 이용할 수 있기 때문에 세

포질 유전자적 웅성불임 계통과 온도 및 일장감응성 핵 유전자 웅성불임 계통을 대체할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0076] 도 1은 *OspPGM*의 발현양상을 통해서 *OspPGM*가 화분 발달 단계 중 전분이 합성되는 발달 단계 후기에만 특이적으로 발현하는 것을 확인한 전기영동사진이다.

도 2는 *OspPGM*-GFP의 세포 내 발현 위치를 보여주는 사진으로, 구체적으로 (a)는 *OspPGM*-GFP를 나타내는 것이고, (b)는 이를 자발형광 처리한 것이며, (c)는 빛을 조사한 것이고, (d)는 이들 결과를 합한 것이다.

도 3은 *osppgm-1* 및 *osppgm-2* 돌연변이체 내에서 *OspPGM* 게놈구조 및 T-DNA 삽입 위치를 나타내는 모식도이다. 박스 및 실선은 엑손 및 인트론을 각각 나타낸다. T-DNA의 위치는 삼각형에 의해 나타내었다.

도 4는 *osppgm-1/osppgm-1* homozygote의 성장한 후 표현형을 보여주는 사진이다.

도 5는 (a)는 야생형, (b)는 *OspPGM/osppgm-1*, (c)는 *OspPGM/osppgm-2*, (d)는 *osppgm-1/osppgm-1*, (e)는 Comp #4 의 요오드 염색 결과를 보여주는 사진이다. 또한 (f)는 야생형, (g)는 *osppgm-1/osppgm-1* 의 TEM 사진, (h)는 야생형, (i)는 *osppgm-1/osppgm-1* 의 꽃가루 핵 염색 결과를 보여주는 사진이다. 또한 흰 화살표는 generative nucleus, 붉은 화살표는 vegetative nucleus 이다.

도 6은 야생형, Copm #4, *osppgm-1/osppgm-1* 계통의 (a) 전분과 (b) 자당의 양을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0079] **실시예 1: 재료 및 방법**

[0081] <실시예 1-1: 식물재료>

[0082] 온실 재배 자포니카(japonica) 벼(품종명: 동진벼) 야생형 및 돌연변이체를 실험에 사용하였다. 벼를 온실에서 명암주기가 14/10 이고 습도가 대략 80%인 조건에서 낮에는 30℃로, 밤에는 20℃의 온도에서 재배하였다. RT-PCR을 위하여 야생형 벼로부터 꽃밥(anther)를 각각 다른 발달 단계에서 회수하였다.

[0084] <실시예 1-2: RT-PCR 분석>

[0085] 전체 RNA는 Trizol 시약을 사용하여 추출하였다. 그리고 역전사는 iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 수행하여 전장 RNA로부터 제1가닥 cDNA를 합성하였다. 벼 유비퀴틴5(ubiquitin 5; OsUBQ5, LOC_Os01g22490) 유전자는 cDNA의 상대적인 양을 정량하기 위해 내부 대조군으로서 증폭되었다. 상기 프라이머들은 게놈 DNA 혼입을 배제하기 위하여 각 유전자의 적어도 하나의 인트론을 포함하는 부위 안에서 디자인되었다. 표 1은 RT-PCR에 사용된 프라이머 서열을 나타내는 것이다.

표 1

[0086]

프라이머 이름		서열	서열번호
OspPGM	Forward	CTGCTCAGATTATCACTAAAATTG	서열번호 2
	Reverse	AGAGCTAGGTCTATTAAAGGCTTC	서열번호 3
OscPGM	Forward	ACGATATGACTATGAGAATGTTGA	서열번호 4
	Reverse	AGATGTAAAAAGGCTATCAAACAG	서열번호 5
OsUBQ5	Forward	GACTACAACATCCAGAAGGAGTC	서열번호 6
	Reverse	TCATCTAATAACCAGTTCGATTTC	서열번호 7

[0088] <실시예 1-3: *OspPGM*-GFP 융합 단백질의 세포 위치 확인>

[0089] 정지 코돈이 없는 상태인 *OspPGM* 전장 cDNA는 프레임 안에서 GFP와 융합시켰다. *OspPGM* 전장 cDNA는 SalI 제한부위(5'-CACCGTCGACATGGCCTCGCACGCGCTCCGCCTC -3', 서열번호 8)를 포함하는 정방향 프라이머와 SmaI 제한부위(5'-TCCCCCGGGATGTTATGACAGTAGGCTTATCTC-3', 서열번호 9)를 포함하는 역방향 프라이머를 사용한 PCR에 의해 증폭되었다. 증폭된 산물은 각각의 효소로 분해시켜 pC1300intC (Ouwerkerk et al., 2001)로부터 유래한 pJJ461의 CaMV35S 프로모터 및 GFP 사이에 클로닝하였다. 상기 GFP 융합 구축물을 옥수수 엽육세포 원형질체 내로 형질전환시켰다. GFP 신호는 공초점현미경(LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 모니터링하였다.

[0091] <실시예 1-4: *osppgm* T-DNA 삽입 돌연변이체의 제작>

[0092] *osppgm-1* 및 *osppgm-2* 돌연변이 대립유전자를 벼 T-DNA 삽입 시퀀스 데이터베이스(Jeon et al., 2000; An et al., 2003; Jeong et al., 2006; http://www.postech.ac.kr/life/pfg/risd/index.html)로부터 확인하였다. 게놈 DNA는 간단한 mini-prep(Chen and Ronald, 1999) 방법을 사용하여 벼의 어린 잎으로부터 분리하였다. 화분을 정교한 파이펫의 팁을 이용하여 현미경 하에서 옮겼다. 그리고 이의 게놈 DNA 템플릿으로 활용하기 위해 PCR 튜브에서 작은 막대를 사용하여 분쇄하였다. T-DNA 삽입으로 인한 유전자형은 *osppgm-1*에 대한 PF1/PR1 및 L1/PR1 프라이머 세트, *osppgm-2*에 대한 PF2/PR2 및 PF2/G1 세트를 사용하여 게놈 DNA PCR 분석에 의해 결정하였다. 상기 사용된 프라이머들의 서열은 표 2에 표시되었다.

표 2

[0093]

프라이머 이름	서열	서열번호
PF1	CTATGTAGAATAGCTGTTTTGCACCCAAC	서열번호 10
PR1	TATAGCACTACGGGCATATTCTTCATTTG	서열번호 11
L1	CGATTTTTGAAATGCGAGAGCG	서열번호 12
PF2	TGCTGCTAGGAACCAAGAGTAAATCAATA	서열번호 13
PR2	TCAAACACAAGATGAAATGGGAAATAAAC	서열번호 14
G1	ATCCAGACTGAATGCCCACA	서열번호 15

[0095] <실시예 1-5: 역교배>

[0096] 역교배를 위해, *OspPGM/osppgm-1* 및 *OspPGM/osppgm-2* 를 자포니카 cv. Ilpum 야생형 벼와 교배하였다. 교배된 계통의 유전자형은 상기 T-DNA 삽입을 위해 사용한 프라이머와 동일한 프라이머 세트(표 2)를 사용하여 PCR 함으로써 결정하였다.

[0098] <실시예 1-6: osppgm 돌연변이체의 약배양>

[0099] *OspPGM*의 동형접합 돌연변이체를 만들기 위해, 약배양은 *OspPGM/osppgm-1* 및 *OspPGM/osppgm-2*의 이형접합체로부터 분리된 꽃밥들을 사용한 것을 제외하고는 Eom et al. (2016)에 기술된 방법을 이용하여 수행하였다. 70%(v/v) 에탄올로 원추화서(panicle)의 표면 살균 후 소수화서(spikelet)로부터 분리한 꽃밥을 한달 동안 25℃에서 2.0 mg/L NAA, 0.2 mg/L 키네틴 및 5% 겔라이트를 포함하는 N_6 캘러스 유도 배지 상에서 배양하였다. 유도된 캘러스를 재분화를 위해 0.2 mg/L IAA, 2.0 mg/L 키네틴, 2 g/L 카세인 가수분해물, 2 mg/L ABA, 40 g/L 말토오스 및 5% 겔라이트를 포함하는 N_6 재생 배지로 이동시켰다.

[0101] <실시예 1-7: PAGE에 의한 *PGM* 활성 분석>

[0102] 동형접합 *osppm-1* 돌연변이체의 in-gel PGM 활성 분석은 Egli et al. (2010)의 방법을 약간 변형하여 진행하였다. 구체적으로 잎 샘플을 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, 10 mM $MgCl_2$,100 mM KCl, 42 mM β-mercaptoethanol 및 15% (v/v) 글리세롤을 포함하는 매우 차가운 추출 버퍼에서 균질화시켰다. 단백질을 8% (w/v) acrylamide (30% acrylamide / 0.8% bis-acrylamide) 및 375 mM Tris-HCl(pH 8.8)을 포함하는 비변성 폴리아크릴아마이드 겔에 용해시켰다. 상기 겔을 1분 동안 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 및 5 mM $MgCl_2$을 포함하는 세척 용액으로 세척시킨 후 37℃에서 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 5 mM $MgCl_2$, 5.3 mM Glc-1-P, 0.25 mM NADP, 0.25 mM NAD, 0.1 mM phenazine methosulfate, 0.25 mM nitroblue tetrazolium 및 40 units Glc-6-P dehydrogenase를 포함하는 염색 용액에 두었다.

[0104] <실시예 1-8: 과당과 전분의 측정>

[0105] 벼 잎 100㎎과 화분을 포함할 정도로 성숙한 꽃밥 3㎎은 각각 12주 연령의 벼 및 벼의 성숙한 꽃으로부터 분리하였다. 용해성이 있는 당분인 과당과 비용해성인 전분을 에탄올 가용성 분획 및 불용분획에서 NAD(P)H 결합 효소 테스트(Lee et al., 2008)을 사용하여 측정하였다. 상기 측정된 대사물질의 함량은 수취한 잎의 무게를 기준으로 정규화하였다.

[0107] <실시예 1-9: 화분 염색 및 광학 현미경분석>

[0108] 화분의 핵을 염색하기 위하여, 화분을 65℃에서 1시간 동안 4 ng/mL Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 포함하는 포스페이트-버퍼 식염수에서 배양하였다. 화분내 전분은 10 % (v/v) Lugol 용액(Sigma)으로 염색하였다. 핵 및 전분이 염색된 화분은 각각 Olympus BX61 현미경으로 UV 및 백색광 하에서 모니터링하였다.

[0110] <실시예 1-10: 투과전자현미경(Transmission electron microscopy) 분석>

[0111] 발달과정 중 성숙단계에서의 화분을 3% glutaraldehyde를 포함하는 인산염 버퍼에 고정시켰다. 그 후 2% osmium tetroxide를 사용하여 후속 고정시켰다. 탈수시킨 샘플을 Spurr의 저점성 포매 혼합물에 위치시켰다. 얇은 절편(40-60 nm 두께)을 2.5% 우라닐 아세테이트 및 2.5% 구연산 납염 수용성 용액으로 염색시켰다. 그리고 이를 전자현미경(Tecnai G2 Spirit (FEI Co., Hillsboro, OR, USA))을 이용하여 관찰하였다.

[0113] **실시예 2: 벼 유래 *OspPGM* 유전자의 화분 발달 단계 별 발현 분석**

[0114] 상기 실시예 1-2와 같이 RT-PCR을 수행한 후, 이에 의해 합성된 DNA를 화분 발달 단계별로 관찰하였다.

[0115] 그 결과, 도 1과 같이 색소체에 존재하는 *OspPGM*(Oryza sativa plastidic phosphoglucomutase) 유전자는 화분이 성숙한 bicellular, mature 단계, 즉 전분이 합성되는 발달 단계 후기에만 발현 양이 특히 향상하는 것을 확인할 수 있었다. 이와는 대조적으로 세포질에 존재하는 *OscPGM*(Oryza sativa cytosolic phosphoglucomutase) 유전자의 발현양상은 크게 변화하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이는 색소체에 존재하는 *OspPGM* 유전자가 화분 발달에 관여함을 시사한다.

[0117] **실시예 3: *OspPGM*의 세포 내 위치 확인**

[0118] 실시예 1-3에 의해 GFP 융합 구축물을 공초점현미경에 의해 모니터링 하였다. 도 2는 *OspPGM*의 세포내 발현 위치를 확인한 사진으로서, 이를 통해 상기 *OspPGM*이 엽록체에 존재하는 것이 확인되었다.

[0120] **실시예 4: *OspPGM* 돌연변이체 제작**

[0121] 실시예 1-3에서의 방법을 이용하여 *OspPGM* 돌연변이체 제작 준비를 하였다. 이와 같은 제작 준비 후, 벼의 *OspPGM* 유전자에 T-DNA를 삽입하여 야생형 *OspPGM* 유전자의 기능을 상실시킨 2개의 *OspPGM* 돌연변이체를 제작하였으며, 이를 각각 *osppgm-1*, *osppgm-2*로 명명하였다(도 3). 구체적으로 Ti 플라스미드 바이너리 벡터(binary

vector) pGA2144 (Jeon et al., The Plant Journal (2000) 22(6), 561-570)와 벼 세포 (동진벼의 종자에서 유도된 캘러스)를 공배양시켜 T-DNA를 식물체 내로 삽입시켰다. *osppgm-1*은 5번째 인트론에 T-DNA 삽입을 포함하고, *osppgm-2*는 10번째 인트론에 T-DNA 삽입을 포함한다.

[0123] **실시예 5: *OspPGM* 돌연변이체를 포함한 웅성불임 계통 벼(T2)의 제조**

[0124] 상기 실시예 4에 의해 제조된 *OspPGM* 돌연변이체(T1)를 자가수분시켜 T2 자손을 생성하였다. 그 결과 야생형(WT):이형접합(heterozygote):동형접합(hemozygote)의 비율이 정상적인 분리비인 1:2:1로 나타나지 않고 1:1:0으로 나타났다. 이는 전형적인 불임 계통의 후대 유전형 분리이므로, *OspPGM*이 불임을 유발하는 기능을 가질 것으로 예측하였다. 표 3은 T2에서 관찰된 비율(%) / 예측된 비율(%) 및 관찰된 식물수 / 예측된 식물 수를 나타내는 것이다.

표 3

[0125]

T1	T2		
	관찰된 비율(%) / 예측된 비율(%) 관찰된 식물수 / 예측된 식물 수		
OspPGM/osppgm-1	*OspPGM/OspPGM*	*OspPGM/osppgm-1*	osppgm-1/osppgm-1
	48.7 / 25 37 / 76	51.3 / 50 39 / 76	0 / 25 0 / 76
OspPGM/osppgm-2	*OspPGM/OspPGM*	*OspPGM/osppgm-2*	*osppgm-2/osppgm-2*
	48.4 / 25 46 / 95	51.6 / 50 49 / 95	0 / 25 0 / 95

[0127] **실시예 6: *OspPGM/osppgm* 웅성불임 표현형 검증**

[0128] *OspPGM/osppgm* 계통의 웅성불임 표현형 검증을 위하여 실시예 1-5에 의해 역교배를 수행한 이후, 후대 종자의 유전형을 확인한 결과, 부본이 *OspPGM/osppgm* 이고 모본이 *OspPGM/OspPGM* 인 경우에는 후대에 돌연변이 유전형이 나타나지 않았다. 반면, 부본이 *OspPGM/OspPGM* 이고 모본이 *OspPGM/osppgm* 인 경우에만 야생형(WT):이형접합(heterozygote):동형접합(hemozygote)의 비율이 웅성불임 계통의 분리비인 1:1:0의 분리비를 보이는 것을 확인할 수 있었다(표 4). 이에 따라 *OspPGM* 유전자는 웅성불임을 유도하는 기능을 나타냄을 확인하였다.

표 4

[0129]

역교배 대상		역교배 결과	
부본	모본	관찰된 비율(%) / 예측된 비율(%)) 관찰된 식물수 / 예측된 식물 수	
OspPGM/osppgm-1	*OspPGM/OspPGM*	*OspPGM/OspPGM*	*OspPGM/osppgm-1*
		100 / 50 93 / 93	0(n=10) / 50 0 / 93
OspPGM/OspPGM	*OspPGM/osppgm-1*	*OspPGM/OspPGM*	*OspPGM/osppgm-1*
		51.5 / 50 52 / 101	48.5 / 50 49 / 101
OspPGM/osppgm-2	*OspPGM/OspPGM*	*OspPGM/OspPGM*	*OspPGM/osppgm-2*
		100 / 50 97 / 97	0 / 50 0 / 97
OspPGM/OspPGM	*OspPGM/osppgm-2*	*OspPGM/OspPGM*	*OspPGM/osppgm-2*
		48.1 / 50 52 / 108	51.9 / 50 56 / 108

[0131] 한편, *osppgm* 계통들은 자가수정으로 동형접합체를 생산하지 못하기 때문에 실시예 1-6에 의한 약배양을 통해 *osppgm-1/osppgm-1*를 생산하였다. 도 4는 약배양을 통해 동형접합체인 *osppgm-1/osppgm-1*를 생산한 후, 야생형과 비교하여 성장의 변화가 있는지를 확인한 것이다. 도 4를 통해 돌연변이 *OspPGM* 유전자/돌연변이 *OspPGM* 유전자(*osppgm-1/osppgm-1*) 동형접합체로부터 형질전환되어 재배된 벼는 야생형과 비교하여 성장의 변화를 관찰할 수 없었다.

[0132] 한편, 상실된 유전자 복구를 위하여 *OspPGM/osppgm-1* 계통에 *OspPGM*을 과다 발현한 계통인 Copm#4를 생산하였다. 야생형, *OspPGM/osppgm-1*, *OspPGM/osppgm-2*, *osppgm-1/osppgm-1*, Copm#4 계통의 화분의 전분 양을 요오드 반응으로 측정하였다. 실시예 1-9의 방법으로 염색하였을때, 야생형 및 Copm#4 계통은 모든 화분이 염색되었지만(도 5의 (A) 및 (E)), *OspPGM/osppgm-1* 및 *OspPGM/osppgm-2* 계통의 화분은 50%만이 염색되었다(도 5의 (B) 및 (C)). 반면에 *osppgm-1/osppgm-1*은 전혀 염색되지 않는 것을 확인하였다(도 5의 (D)). 이를 통해 *OspPGM*의 돌연변이체들은 전분 부족으로 인해 웅성불임 표현형을 나타냄을 확인하였다. 또한 실시예 1-10과 같이 TEM을 통해 확인한 결과, 야생형은 전분을 합성함에 반하여, *osppgm-1/osppgm-1* 계통은 전분을 합성하지 않음을 확인하였다(도 5의 (H) 및 (I)).

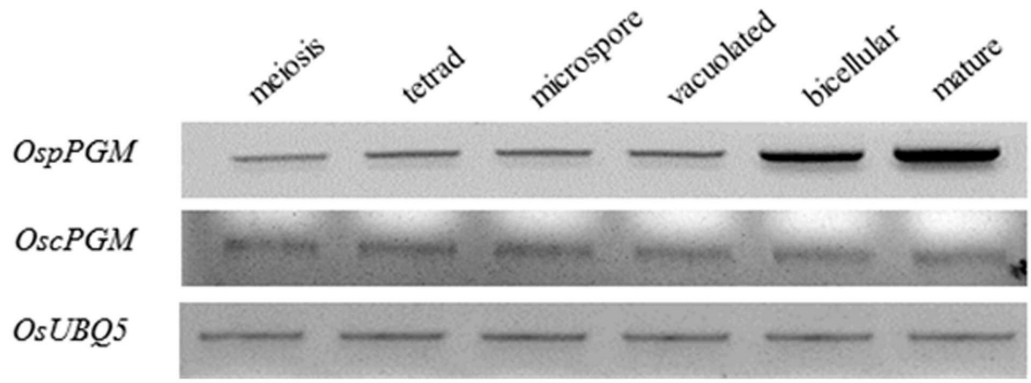
[0133] 또한 도 6은 야생형, Copm#4 및 *osppgm-1/osppgm-1*의 잎에 전분 및 과당 함유량을 나타낸 그래프이다. 도 6을 살펴보면 *osppgm-1/osppgm-1*는 야생형과 유사한 양의 전분 및 과당을 함유하고 있음을 확인할 수 있는 반면에, Copm#4는 전분은 거의 함유하고 있지 않으면서 야생형보다 다소 많은 양의 과당을 함유하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 웅성불임을 보이는 *osppgm-1/osppgm-1*는 화분이나 잎에 전분을 함유하고 있지 않음을 확인할 수 있었다.

[0135] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

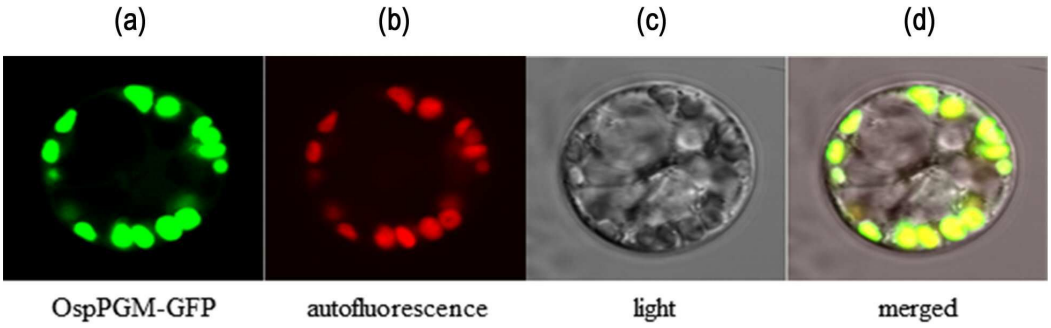
부호의 설명

도면

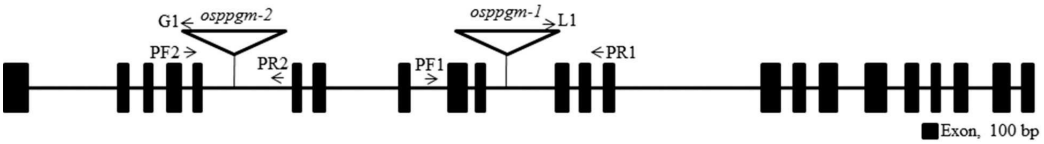
도면1



도면2


(a)
(b)
(c)
(d)
OspPGM-GFP
autofluorescence
light
merged

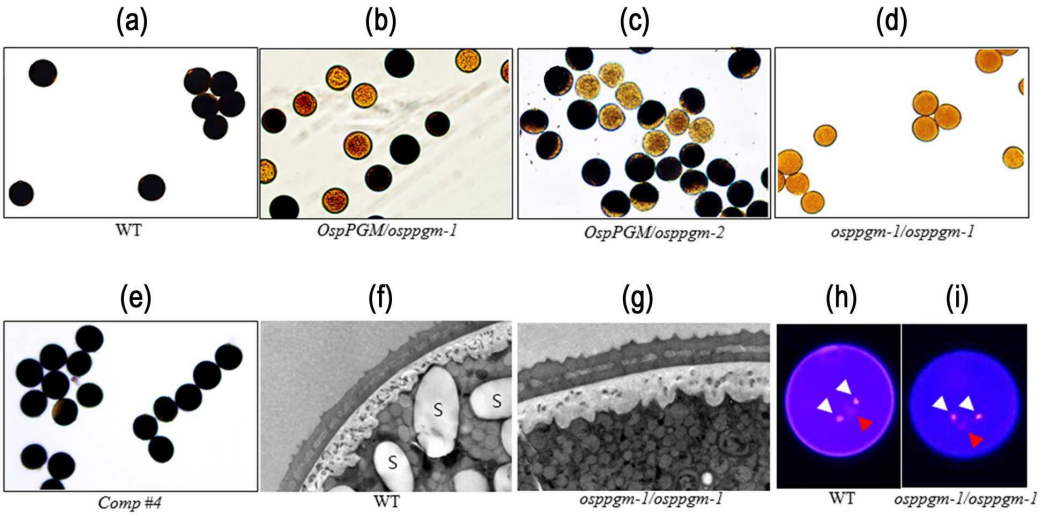
도면3


G1
osppgm-2
PF2
PR2
osppgm-1
L1
PF1
PR1
Exon, 100 bp

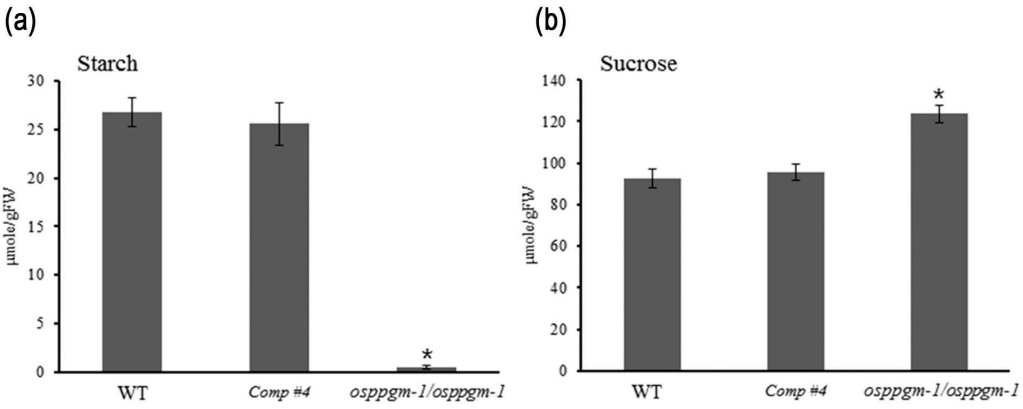
도면4


WT
osppgm-1/osppgm-1

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Preparation method of male sterility rice using OspPGM gene, composition for inducing male sterility of rice and male sterility rice

<130> KPA161096-KR

<160> 15

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 7521

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

gcttcataag atctcgcgcc ccttgcccgc ttccttccgc ggtgcaagcg caacaccacc 60

tcacctcact ccccttctcg cctcttctcc ccttctccac ctcctcttct ctccgcgtgg 120

cggtggcatt gccggccgcc gcatcgtctc gggatggcct cgcacgcgct ccgcctccac 180

ccgctgctct tctccgccgc cgccgcgcgc ccggctccgc tcgcggcgcg gcccggtggt 240

ggtgcccgcc gggtccaccg ccgccactct ctcgccgtcg tccggtgctc ctcctccgcc 300

gcccaggcgc tcaaggtacg atctcccccc tgcccgcgcg ctcgccctcc cggcgctgtt 360

gatgtgtacg tgtgtgttgt ggactcgtcg tggggtgggt gggatttttc agttttgccg 420

tcggtgtgca gctccgggtt ctagactggg ggtggtgttg ctctgcgcga ttgtggcctt 480

aatcatgatt cctcgagatg attttgaata ctggtggtgg tttctgcagt cttccggcga 540

tgggaaggcg atttccgttt ttttttgggg tttaatcaag cggcggcatc agcgctattt 600

tggcgacgga tactgtgggt tttgggtggt ggtggatccg gattttgggt tgcgtttcat 660

gtttctctcg aggccagtca tagcgcacag ctgctgcctt tgtgcacctc ttggatttat 720

ctatgtgatc acgcatccat tttggtggcc tctagatatg gcagtggatg ctgtgattca 780

tgtcatcatg tgcttccagt gcgctgagag ccctttttgt ctgatttggg tgccgtagga 840

ttcttccatt gtgtgcatta taggattatc aactcttaag tctcttttttg cttattgtgt 900

gattgagata cacaaataac agatgatgat tgtgacgttt tatgcagatc aagtcgattc 960

cgaccaagcc cgttgagggg cagaagaccg ggaccagtgg gttgaggaag aaggcaagta 1020

ccagctgttt tatgttccac gatcttgcac ccatttccga tacgcttttt ttttttgggt 1080

gtgtacaatt cccttcatac atctttttttt ggtgttcttt tcaggtgaaa gtgttccagc 1140

aggagaatta cctcgctaat tggattcagg tgtgccacat tttacttgat gttgcacgtc 1200

aatagccttt tctgttttaa tgtgatgaca cctctaagat ggagctacat tcatttatcc 1260

tttctgtggt ttgaaggctc tgttcaattc attgcccccg gaggattatg ttggtggaac 1320

ccttgtgctt ggtggtgatg gccgatactt taacaaggat gctgctcagg tgctgctagg 1380

aaccaagagt aaatcaatac gtgtttgctc cacatttacg catgcatatt tatgactatt 1440

tctgtgggaa tgtagattat cactaaaatt gcagctggga atggtgttgg gaagatccta 1500

gttggcaggt aaggagatac tagatgaagc ttcttggatt tagaagatac aacactaact 1560

attagaagta tggatattca tagaactaaa attccaatgg ataccatcag ggctcctgaa 1620

actacctggt taaactacag ctaatacaca cttctatcct ccacttgcga tgttatccta 1680

tataccaaaa tgcttataat tgcacctaat tatattcaag ggttcaattt gaggattttc 1740

taataaaatg ttcccaaacc aagtactttt aaggctggaa aagggccagt ttctgggcaa 1800

aaaactataa ctagtcaggt tctcatttcc ccacctctga acggatttct gaaccctgac 1860

tttgaaagct tgaagccttc ataccttcac tgggttcggt ctggaaaata tccacatgat 1920

ccttagcata ctcaattaaa ggaagaataa cagattttac caaataaatt aaagcatctg 1980

acaataataa tcacataatt tgattttgac ttagttctga gcatagaaag gacactatgt 2040

tacttccctc aaacatttag catgctcaat tttccagttt atttcccatt tcatcttgtg 2100

tttgatatat actttgtatc ctgtaattgt taaaatattt gtaggaacgg tctgctgtca 2160

acgcctgctg tatctgcagt aattcgtaaa agacaagtat gttttacacc ttttttcatt 2220

cattgtgtgc ttcactatct tttttaattt tctaattcat tgcagttttc aattctgtta 2280

ggccaatggt ggcttcatca tgagtgcaag ccataatcca ggtgggccag ataatgattg 2340

gggtatcaag gtatgccata acttaaattg tatattctct tgtattgcag taattgatta 2400

gattaataat acaattctat ttagtttcgt cctgacaaat atgaaatgaa ctatttgaca 2460

gaatggcaac aaagaaatac ttttctatct ccagaaataa cttaccaatc atagactctt 2520

tgatgaagga tctgagaaaa gaaacacttt gctatttcca taatgttttt atttgtctat 2580

gtttggtctc tcaccctgga caaatgaaaa gaaagggttg ttctgttttt gaagtgcaaa 2640

tctagaaatg ttcttgggtg cccaatattt tctgtgttgg gtccctcatg attcatgaat 2700

gaaataattg aaaatatagc ttcttgtatt tttgattcat gaatgaaata attgaaaatt 2760

tcttgtgtgg caagtattcg gcaaaaaccg aattgtcaac atgcgatagt ataaacatgc 2820

aattttcctc aagtttatta catgatcaag tagcttaata agatgttcaa ttgcagttca 2880

actatagcag tgggcagcca gcaccagaga caattaccga ccaaatatat ggaaacacac 2940

tttcggtatg cacctttact atttattagc atattattta tacattagcc cattatattt 3000

atactatgta gaatagctgt tttgcaccca accctgtttt cagtaacatc ctattggcat 3060

ctaacacgtt ttgtctcatg ttactgcatt tctctttcca atgtcactgc tacagcattt 3120

ttcttcatgg cattatcgta gatgtcgaat aatattgccc ttacatttta cttatttctg 3180

atgatattat ttcttcacca taatgcaaat ctcctgcaga tttctgaaat aaaaacggca 3240

gatattcctg atgttgattt gtcctctcta ggagttgtaa gctatggtga tttcaccgtt 3300

gaagtgatag accctgtctt ggactacctt gagctaatgg aggtatacaa tgaaataatt 3360

atacagagat aatttatttt atatctaaat tatttctttc ctgtttgtgt cttcagaatg 3420

tgtttgactt ccaacttatc aagggcttgt tgtctcggcc agatttcagg ttctgtatat 3480

ttatttgctt ttcacatgtt gtttagtcat taataaataa tactagagtt ttggaaatat 3540

taatgcctga taatctacat gtgtattttt atgaagccta ataatctaca catttatgtc 3600

aacatgtact tcactggttc atttgtttga gcataagttt caaaaaactg ctctttattt 3660

tccttcagtc attcttgagt ttcaaagggg agcacttatg cgatatttgc taaccactac 3720

tacctctgtc ctaaaatata agcactagtc caggtgcata gctaaaatcc ctaatatttt 3780

tgggcggttg tagtagtacc tattacattt tgttgtggtg atgaacttat gattagtagc 3840

agatgcaata actatgtaac tttgtagtgt gataagtaat aaccatatta tttgtttctt 3900

tatttttggg aatatgaatt tatatctgca aataataatg gtaattttcc ttgattttct 3960

aggtttgtat ttgatgccat gcatgctgtg actggtgcat atgcggatcc tatttttgtt 4020

gagaaacttg gagctgatcc ggtggtgtat caattacttg agatgaatca ttttttttttc 4080

ttgaggaatt ccattatttg atgctgaata tacacctggt ttgcaggact atatattaaa 4140

tggtgttcca cttgaagatt ttggcaatgg tcaccctgat cctaatttaa cgtatgtaaa 4200

tcagtcctca aatgaagaat atgcccgtag tgctatactt acttcatgtt aaaaaaaaaa 4260

aaaaactact gtacttactg ttgtttttct acagttatgc caaagagctt gtgtttacca 4320

tgtttggaag cggagcacct gactttggtg cagcaagtga tggtatgcct atattactcc 4380

ctctagtcac agataagtga tgttcaggaa tgtgtgcatt caacacgttt aaacttaacc 4440

atcaatatca ctttgaatat ttagaattca actgttagta atgatttcac aagagcgagt 4500

aggcatcttt tgaagagcca tttttgcttc tctttgaact taatgagaga gataaagata 4560

ctgttaaata ttagatcata gggttgtaac ttttgtacat ttttttgata tatgaacaaa 4620

tttaaactgt ggggacctcc actgctgttc tttgatcaga aaagaaaaat gatatgacta 4680

gttttgtctt caaaatagtt tcagaatatt ataacaatgc tacactcttt gtggaattta 4740

tactagtaat tactaaaaaa atcaactgtt tttggtgacc gtgtcattgt ccaaaattat 4800

ttcttagcac agggaaatac tagtactgca tctgcattaa tagatcttct attgtcttgg 4860

ccgtgtgcac gtaatgcgga tgccagaggt gtaacacttc tccgttgtct aaaaaaatat 4920

cttcaattgt gtctggcaaa atttaaacaa ttctggtata gcagttggat gagaaatacc 4980

tttaagtatt gttgagacta attaacaatt attgatcatt agatttatct ctcctcgaag 5040

tgatgccata acagccatat gtcacttgct ctgaaaattg acgtgtcact gtaactatct 5100

actttggtct cattttctta gtatattatg tgcatatagt tacagcttga atctcctttt 5160

catattattt gtgttgtccg taccttaata ttatcattta atacagttag atttgagaag 5220

ttttacttgc tgcatttgca aacttcattg aatgttctat tttatcactg gttctttctt 5280

tctgtgccct tccttttttt ctttttcttt attttttttt tgtgcgagga acctttttagt 5340

ttagttgctg aagggaatat tgtgtgaaca aataacatta gaggtaaaaa tgcttgcagg 5400

tgatggtgat cgaaacatga ttcttggaag aaggttcttt gttacaccat cagactctgt 5460

tgcaataatt gcagcgaatg cacaggcagc aattccttat ttccaatctg gtccaaaagt 5520

aatgagatgt tacacattat aatgtttttc taaataggat attagactca tcaaagacaa 5580

gaatgatctc ttatgtttga tactttcttc agggtcttgc tagatcaatg ccaacgagtg 5640
gtgctcttga tcgtgtagct gataaattga atgttccgtt ctttgaggta cttttgtcag 5700
tgaattgcat gtgcatgatt tgtttgcaaa atagtcaata ggccatggct tctagaagaa 5760
cagctaagac aatatggtca ctttgcaggt accaacagga tggaaatttt ttggaaacct 5820
aatggatgca ggtaaattgt ctatatgtgg agaggaaagt tttgggacag gatctgatca 5880
catcagggag aaggatggca tatggtaaaa tattgtttat acatggatgc tttttctatt 5940
agatatcctt actgtcctag tatccagttg ttgcctagaa atgccaaaac agagataagt 6000

gcatcagaat tgctttctat gcatgcttga tagtttgcac tcttttcttg agaactgtct 6060
gcatggaact agtcacactc ccgctaacta ctgactttca gggctgttct agcttggctg 6120
tccatacttg cacaccggaa caaggataag aaggccgggg agagattagt gtcagtggaa 6180
gatgtagcta gggaacactg ggcaacctat ggaaggaatt tcttctccag atatgattat 6240
gaggtatttt atctttcata atgaatttct gaaatgataa tttatgagag tttatcttgc 6300
gtaccgaata aaatttctgg tacattattt caacccagaa attccaatga atcactaatc 6360
ttgtactgta caggagtgtg aatctgagag tgcaaataag atgatggagc atcttagaga 6420

tgtgatcgca aaaagcaagc ctggagagaa atatggttgg ttattataga attgtgcttg 6480
tatgttccgt agtgatgata tgtatgatgg ttaccagaaa ggctaatgaa ttattgacct 6540
tatgatgtag gaaactatac ccttcagttt gccgatgatt tcagttacac tgatccggtt 6600
ggcgctctct ctctctctct ctcccttgaa cacccatgtg tgcgtgtttt ggtggatatg 6660
tcagtcatgg tgcgcaattg aaatttacat ttttcctaaa tgttacaggt ggatggtagc 6720
actgtatcta aacaagggct tcgatttgta ttcaccgatg gatctaggat tatcttccgc 6780
ctttcggtac acagctatca ctgatatttt tttctccctt atcttgttgt tggagttgct 6840

gcttctaggc gctcacttgt ttgctcaaac ttccttctct tcttaatgct gagaagcatg 6900
aatctttcac atattcacta aaagccactg attttgccca cttgttttac aatttagtat 6960
atttttctct tatagggaac cggatctgct ggagcaacaa tccgtatata cattgagcaa 7020
ttcgagtctg atgcctcaaa gcatgatctg gatgcacaaa tagctttgaa gcctttaata 7080
ggtaactatc atctgccctc agatgagctt tctatgcatc catttcctga aattatgtgt 7140
atatataaac tactcataaa ctattttaaa tttctgcaga cctagctcta tctgtttcaa 7200
agttgaagga cttcactgga agagataagc ctactgtcat aacataaaca taccggtgac 7260

attagcaatg ttaccacctg tgtattcttt tatttctttg tttttatagc cccttccaac 7320

cgatgaacca ataatgtaat cttaggccaa gttttgtact gagttgatgg caaactgtat 7380

cttggaggta cctttcattg aacatagtat gcaggaatga ataagctttt agagcaatgg 7440

tacatatttc agaacaaact gtatcttgat gttctcgaat ttatcgaatt catcttgagg 7500

atgtcatgtt tctttgaaat a 7521

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT-PCR primer sequence 1

<400

> 2

ctgctcagat tatcactaaa attg 24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT-PCR primer sequence 2

<400> 3

agagctaggt ctattaaagg cttc 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT-PCR primer sequence 3

<400> 4

acgatatgac tatgagaatg ttga 24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT-PCR primer sequence 4

<400> 5

agatgtaaaa aggctatcaa acag 24

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT-PCR primer sequence 5

<400> 6

gactacaaca tccagaagga gtc 23

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT-PCR primer sequence 6

<400> 7

tcatctaata accagttcga tttc 24

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SalI Foward primer

<400> 8

caccgtcgac atggcctcgc acgcgctccg cctc 34

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SmaI Reverse primer

<400> 9

tcccccggga tgttatgaca gtaggcttat ctc 33

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PF1

<400> 10

ctatgtagaa tagctgtttt gcacccaac 29

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR1

<400> 11

tatagcacta cgggcatatt cttcatttg 29

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> L1

<400> 12

cgatttttga aatgcgagag cg 22

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PF2

<400> 13

tgctgctagg aaccaagagt aaatcaata 29

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR2

<400> 14

tcaaacacaa gatgaaatgg gaaataaac 29

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G1

<400> 15

atccagactg aatgcccaca 20