

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 2일 (02.01.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/004842 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/82* (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/007183
- (22) 국제출원일: 2019년 6월 14일 (14.06.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0072954 2018년 6월 25일 (25.06.2018) KR
- (71) 출원인: 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 김재연 (KIM, Jae Yean); 52704 경상남도 진주시 새평거로 75, 406동 804호, Gyeongsangnam-do (KR). 쿠마리테시 (KUMAR, Ritesh); 52828 경상남도

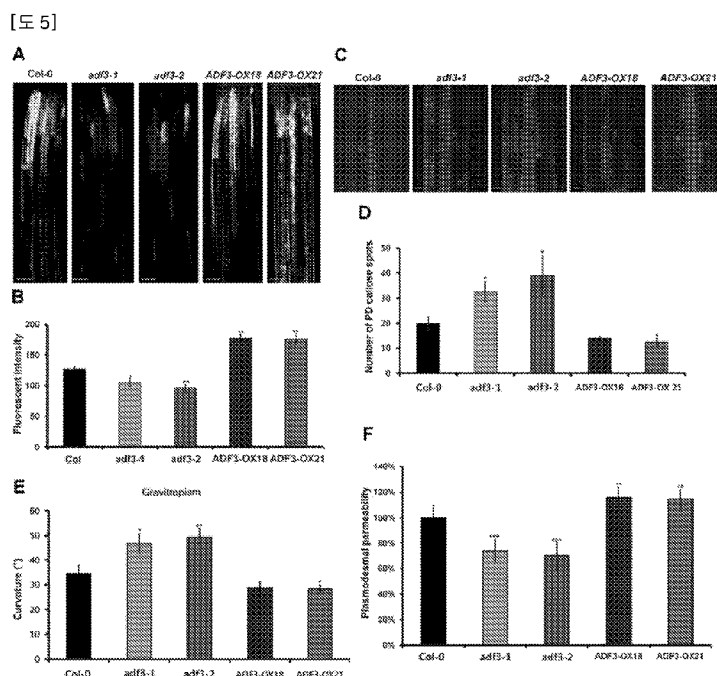
진주시 진주대로 501 경상대학교, Gyeongsangnam-do (KR). 이스완토아리아바구스보에디 (ISWANTO, Arya Bagus Boedi); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교, Gyeongsangnam-do (KR). 이진수 (LEE, Jinsu); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교, Gyeongsangnam-do (KR). 부후이민 (VU, Huy Minh); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교, Gyeongsangnam-do (KR). 우수웨이 (WU, Shuwei); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

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

(54) Title: ARABIDOPSIS THALIANA-DERIVED ADF3 GENE FOR CONTROLLING PLANT TROPISMS, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 식물체의 굴성을 조절하는 애기장대 유래의 ADF3 유전자 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to an Arabidopsis thaliana-derived *ADF3* gene for controlling plant tropisms, and a use thereof. An *ADF3* protein regulates callose accumulation in plasmodesmata so as to control plant tropisms, thereby being effectively usable in the photomorphogenic design of crops or ornamental plants, and in the like.

(57) 요약서: 본 발명은 식물체의 굴성을 조절하는 애기장대 유래의 *ADF3* 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, *ADF3* 단백질은 원형질연락사에서 칼로스 축적을 조절하여 식물체의 굴성(tropism)을 조절할 수 있으므로, 작물 또는 관상 식물의 광이용 형태 디자인 등에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2020/004842 A1

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 식물체의 굴성을 조절하는 애기장대 유래의 ADF3 유전자 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 식물체의 굴성을 조절하는 애기장대 유래 ADF3(actin depolymerizing factor 3) 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 식물체에서 원형질연락사(plasmodesmata)는 이웃한 세포를 연결하는 심플라즈믹(symplasmic) 나노채널로 이루어져 있고, 짧은 거리의 분자 이동을 위한 경로를 제공한다. 상기 나노채널들은 식물세포의 세포벽에서 대사물질, 호르몬, 단백질 및 RNA 분자를 포함하는 신호 전달 물질의 세포 내 이동 또는 전달을 허용함으로써, 세포간 커뮤니케이션에서 중요한 역할을 한다.
- [3] 원형질연락사는 그들의 구조 및 구성요소를ダイナ믹하게 조절하여 식물체의 요구에 부응한다. 칼로스(callose, β -1,3-글루칸)는 원형질연락사의 투과성(permeability) 조절에 중요한 인자 중 하나로, 원형질연락사의 목(neck) 부위에 축적되어 원형질연락사 채널을 수축시킨다. 인접한 세포간의 생체분자의 이동은 정상 식물체의 발달 동안에 원형질연락사에서 칼로스 축적의 조절에 의해, 또는 병원균의 감염, 상처 및 산화 또는 저온 스트레스와 같은 다른 종류의 환경 스트레스에 의해 조절된다. 애기장대에서 칼로스의 합성 또는 분해와 연관된 많은 유전자들 뿐만 아니라, 원형질연락사에 위치하는 칼로스 결합 단백질이 원형질연락사의 투과성의 중요한 조절자로서 확인되었다. 이전의 연구를 통해 GSL8(Glucan Synthase-like 8) 및 CalS8(GSL4) 단백질이 원형질연락사의 칼로스 합성 및 원형질연락사의 투과성 조절에 핵심 효소로 작용함이 보고되었다. GSL8이 결손된 애기장대 식물체는 원형질연락사에 칼로스 축적이 감소되어 과도한 투과성이 야기되고, 굴성 반응 동안에 옥신 구배(gradient) 형성이 파괴되어 배축(hypocotyl)의 굴성 반응이 불가능하였다(Han, X. et al., 2014, Developmental cell 28:132-146).
- [4] 원형질연락사 채널에서 칼로스의 수준 조절은 필수적인 과정이다. 세포 주변에서 수용체를 통한 신호의 감지는 살아있는 생물체의 신호 전달 과정의 기본적인 특성이다. 식물체에서 다양한 유형의 세포 표면 수용체가 아포플라스틱(apoplastic) 환경으로부터 많은 종류의 자극을 인지한다. 수용체-유사 키나제(receptor-like kinase, RLK)는 식물체 계놈에서 매우 중요한 유전자 패밀리를 형성한다. 아직까지 그 자체의 항상성 유지를 위한 내생의 원형질연락사 칼로스의 수용체 또는 센서는 밝혀진 바가 없다.
- [5] 식물체를 제외하고, 인간 또는 다른 생물체에서 가장 흔한 칼로스 수용체는 Dectin-1, Langerin, Complement receptor 3(CR3), lactosylceramide(LacCer, CDw17),

acetylated low density lipoproteins(AcLDLs) 및 CD5이다. Dectin-1은 타입 II 막관통성(transmembrane) 도메인을 가진 표면 단백질로, 대식세포, 호중구 및 수지상 세포에서도 발현되지만, 주로 백혈구에 존재하는 단백질이다. Dectin-1 단백질의 세포외 칼슘-결합 C-타입 렉틴 도메인에 칼로스가 결합하면, 비록 활성화 키나제 도메인이 결여되었으나, ITAM(immunoreceptor tyrosine-based activating motif)의 인산화가 유도되고, ITAM은 과산화물의 생성, 사이토카인 또는 항진균 이펙터의 유도 및 식균작용(phagocytosis)의 증가와 같은 하위의 신호 전달을 촉발시킨다. 그러나 지금까지 식물체에서는 이와 유사한 칼로스에 대한 막관통성 수용체에 대해 보고된 바가 없다.

- [6] 한편, 한국등록특허 제1568911호에는 '칼로스 합성 조절을 통한 식물 생장 및 굴성의 조절방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 식물체의 굴성을 조절하는 애기장대 유래 *ADF3* 유전자 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 애기장대 식물체에서 원형질연락사에 위치하는 *CLRLK1*(C-type lectin receptor-like kinase 1) 단백질이 칼로스의 축적 수준을 감지하며 칼로스 축적의 음성 조절자로 작용하는 것을 확인하였으며, *CLRLK1*의 세포질 키나제 도메인이 *ADF3*(Actin Depolymerizing Factor 3)와 상호작용하는 것을 확인하였다. 또한, *CLRLK1* 또는 *ADF3* 유전자의 과발현 식물체 및 T-DNA 삽입 돌연변이 식물체를 분석한 결과, *CLRLK1* 또는 *ADF3* 유전자의 과발현 식물체에서는 원형질연락사의 칼로스 축적이 감소되고, 원형질연락사의 투과성이 증진되며, 식물체의 굴성 반응이 감소되는 것을 확인하였고, *CLRLK1* 또는 *ADF3* 유전자의 돌연변이 식물체에서는 원형질연락사의 칼로스 축적이 증가되고, 원형질연락사의 투과성이 감소되며, 식물체의 굴성 반응이 증진되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 *ADF3*(actin depolymerizing factor 3) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 *ADF3* 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 굴성(tropism)을 조절하는 방법을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 *ADF3* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 굴성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 굴성이 조절된 형질전환 식물체 및

이의 형질전환된 종자를 제공한다.

- [11] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 굴성 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [12] 본 발명에 따르면 ADF3 단백질의 발현조절을 통해 원형질연락사의 칼로스 수준을 조절함으로써 식물체의 굴성을 조절할 수 있으므로, ADF3 단백질의 발현 수준을 조절하여 작물 또는 관상식물의 굴성촉진 또는 굴성억제 특성을 유도하여 광이용 형태 디자인 등에 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 인간 Dectin-1 단백질과 애기장대 유래 CLRLK1 단백질의 아미노산 서열 비교 결과이다.
- [14] 도 2는 CLRLK1 단백질의 칼로스 반응성을 확인한 결과이다.
- [15] 도 3은 야생형(Col-0), T-DNA 돌연변이체(*clrk1-1* 및 *clrk1-2*) 및 과발현 식물체(CLRLK1-OX9 및 CLRLK1-OX12)에서 원형질연락사의 투과성(A, B, G 및 H), 칼로스 축적(C 및 D), 굴성(E 및 F)을 확인한 결과이다. 스케일 바; 100 μ m, $p(*) < 0.05$, $p(**) < 0.01$, $p(***) < 0.005$.
- [16] 도 4는 CLRLK1과 ADF3 단백질간 상호작용을 Y2H(Yeast two-Hybrid), LCI(Luciferase Complementation Imaging), 면역침전법(coimmunoprecipitation) 및 BiFC(Bimolecular Fluorescence Complementation) 어세이로 분석한 결과(A 내지 D) 및 CLRLK1 및 ADF3 단백질의 칼로스와 상호작용을 BiFC 어세이로 분석한 결과(E 및 F)이다. $p(*) < 0.05$.
- [17] 도 5는 야생형(Col-0), T-DNA 돌연변이체(*adf3-1* 및 *adf3-2*) 및 과발현 식물체(ADF3-OX18 및 ADF3-OX21)에서 원형질연락사의 투과성(A, B 및 F), 칼로스 축적(C 및 D), 굴성(E)을 확인한 결과이다. 스케일 바; 100 μ m, $p(*) < 0.05$, $p(**) < 0.01$, $p(***) < 0.005$.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [18] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 애기장대 유래 ADF3(actin depolymerizing factor 3) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 굴성(tropism)을 조절하는 방법을 제공한다.
- [19] 본 명세서에서 용어 '굴성(tropism)'이란, 식물의 기관이 환경 특히, 광 또는 중력 자극에 반응해서 자극 방향으로, 혹은 반대 방향으로 굽는 운동을 의미한다. 본 발명에 따른 상기 굴성은 구체적으로 굴중성(gravitropism)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [20] 본 발명의 식물체의 굴성 조절 방법에 있어서, 상기 ADF3 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을

포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체의 굴성을 조절하는 활성을 의미한다.

- [21] 또한, 본 발명에 따른 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [22] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물체의 굴성 조절 방법은, 애기장대 유래 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자를 식물세포에서 과발현시켜 야생형 식물체에 비해 식물체의 굴성을 억제시키는 것일 수 있고, 애기장대 유래 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 저해시켜 야생형 식물체에 비해 식물체의 굴성을 향상시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [23] 상기 식물체의 굴성 조절 방법은 구체적으로는, 애기장대 유래 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시켜 원형질연락사(plasmodesmata)에서 칼로스(callose)의 축적을 감소시켜 원형질연락사의 투과성(permeability)의 증가 및 옥신의 심플라스믹(symplasmic) 확산 강화가 일어나 옥신 농도구배의 형성이 저해되어 식물체의 굴성을 억제시키는 것일 수 있고, 애기장대 유래 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 저해시켜 원형질연락사에서 칼로스의 축적을 증가시켜 원형질연락사의 투과성을 감소시키고 옥신 농도구배가 형성되어 식물체의 굴성을 향상시키는 것일 수 있다.
- [24] 옥신(auxin)은 식물 호르몬의 일종으로 식물의 줄기 끝, 뿌리 끝의 성장점에 존재하는 정단 분열조직에서 생성된 세포들이 커지는 부위인 신장대(elongation zone)에서 길이 생장을 촉진하고, 줄기와 뿌리의 발달, 꽃과 과실의 발생, 그리고 굴성운동 등을 유도하는 물질로서, 특히, 내생성(endogenous) 옥신은 자엽(합성 부위)에 존재하지만 배축 후크(hypocotyl hook) 영역에 국한되어 있다.
- [25] 칼로스(callose)는 식물 꽃가루 생성 및 발달, 체관 및 물관세포 형성 동안 다양한 기능을 수행하는 다당류로, 식물발달뿐 아니라 신호전달(원형질연락사), 세포질분열(cytokinesis) 시 세포판 형성, 각종 스트레스 대응(고온, 병해충, 상처 등)에서 중요한 기능을 수행하는 세포벽 베타-1,3-글루칸(beta-1,3-glucan)이다.

- [26] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [27] 본 발명에서, 상기 애기장대 유래 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 재조합 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 재조합 벡터는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스 벡터, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소 (translation control element)를 가지는 것이다.
- [28] ADF3 단백질을 코딩하는 유전자의 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [29] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.
- [30] 본 발명의 재조합 발현 벡터에서, 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터, 히스톤 프로모터 또는 Clp

프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 상부의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "항시성(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이며, 본 발명에서는 항시성 프로모터의 사용이 바람직할 수 있다. 따라서, 항시성 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[31] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(nopaline synthase), 벼 α -아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 대장균의 *rrnB1/B2* 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 터미네이터 영역이 식물 세포에서의 유전자 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[32] 재조합 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 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. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), G418(Geneticin), 블레오마이신(Bleomycin)과 같은 항생제 내성 유전자, *aadA*(aminoglycoside-3'-adenyl transferase) 유전자 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[33] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl_2 방법, 하나한 방법(Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 유전자총-매개 형질전환 방법(bombardment), 아그로박테리움-매개 형질전환법, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 DEAE-덱스트란 처리법 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[34] 본 발명은 또한,

[35] 애기장대 유래 ADF3(actin depolymerizing factor 3) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

[36] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 굴성(tropism)이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[37] 상기 식물세포를 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같다.

[38] 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을

재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지되어 있다.

- [39] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 굴성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다. 본 발명에 따른 형질전환 식물체는 ADF3 단백질 코딩 유전자의 발현이 증가된 경우에는 굴성이 억제된 것을 특징으로 하며, ADF3 단백질 코딩 유전자의 발현이 감소된 경우에는 굴성이 증가된 것을 특징으로 한다.
- [40] 상기 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물이며, 더욱 바람직하게는 애기장대 식물체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [41] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 ADF3(actin depolymerizing factor 3) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 굴성(tropism) 조절용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 애기장대 유래 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자 또는 애기장대 유래 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환함으로써 식물체의 굴성을 조절할 수 있는 것이다.

[42]

- [43] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[44]

[45] 재료 및 방법

[46] 1. 식물 재료 및 성장 조건

- [47] 야생형 애기장대(Col-0), 과발현 및 기능상실 돌연변이 식물체는 16시간 명(22°C)/8시간 암(20°C) 주기의 성장챔버에서 성장시켰다. 두 개의 독립적인 T-DNA 삽입 *clrkl1* 돌연변이체(SALK_069334C; *clrkl1-1* 및 SALK_143434C; *clrkl1-2*) 및 *adf3* 돌연변이체(SALK_065622C; *adf3-1* 및 SALK_139265C; *adf3-2*)는 Arabidopsis Biological Resource Center(ABRC, <http://abrc.osu.edu>)로부터 구매하였다. T-DNA 삽입의 확인은 T-DNA left border 프라이머(LBb1.3)와 CLRLK1 또는 ADF3에 특이적인 프라이머(각각 CLRLK1.1LP/CLRLK1.1RP, CLRLK1.2LP/CLRLK1.2RP 및 *adf3*.1LP/*adf3*.1RP)를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 통해 확인하였다. 이중

돌연변이체 *adf3-2/clrk-2*는 각각의 동형접합성 돌연변이체를 교배하여 생산하였고, F₂ 및 F₃ 자식세대의 분리를 통해 분석하였다.

[48] [표1]

PCR에 사용된 프라이머 정보

프라이머명	염기서열(5'→3')
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC (서열번호 3)
CLRLK1.1LP	TGGATTGGAGGACGAAGTATG (서열번호 4)
CLRLK1.1RP	TCTGTAAACGTATTCGGGTGC (서열번호 5)
CLRLK1.2LP	GGAAGACTTTCCTTGAATGC (서열번호 6)
CLRLK1.2RP	CAACTCTTGCTCAAGGAATCG (서열번호 7)
adf3.1LP	AAGGGAAGACGTGGATGACTC (서열번호 8)
adf3.1RP	TAGGTTGGCAACTTGGCATAG (서열번호 9)

[49]

[50] 2. 벡터 컨스트럭트 및 형질전환

[51] *CLRLK1* 과발현 식물체의 제작 또는 일시적인 로컬라이제이션 분석을 수행하기 위해서, 총 cDNA로부터 증폭된 PCR 산물을 DONR207 플라스미드(Invitrogen, 미국)로 클로닝하였다. 상기 결과로 생성된 엔트리 클론을 게이트웨이 바이러니 벡터인 pMDC83 (Curtis et al., (2003) Plant physiology 133:462-469), pH7RWG2.0(Karimi et al., (2002) Trends in plant science 7:193-195), pGW-HA (Nakagawa et al., (2007) J Biosci Bioeng. 104:34-41), pDEST-GWVYNE 또는 pDEST-GWVYCE에 형질전환하여 GFP, RFP, HA, YFP^N 또는 YFP^C 태그와 융합시켰다. 야생담배에서 GFP-융합된 *CLRLK1* 도메인 결실 돌연변이체 컨스트럭트를 일시적으로 발현시키기 위해서, 각각의 엔트리 클론을 게이트웨이 기술을 이용하여 제조하였고, pMDC83 벡터와 LR 반응을 수행하였다. 상기 *CLRLK1*과 유사하게, *ADF3* 또한 엔트리 클론으로 클로닝을 수행하고 게이트웨이 바이너리 벡터인 pH7RWG2.0, pDEST-GWVYNE 또는 pEG203에 클로닝하여 RFP, YFP^N 또는 Myc 태그와 융합시켰다. PCR 반응으로부터 제조된 모든 컨스트럭트는 DNA 시퀀싱을 통해 검증하였으며, 모든 컨스트럭트는 꽃대침지법(floral dip method)으로 야생형에 도입하였다.

[52]

[53] 3. RNA 추출 및 RT-PCR

[54] 총 RNA의 추출은 한 등(2014, Developmental cell 28:132-146)의 방법으로 추출하였다. RT-PCR을 위해서, 제1가닥 cDNA는 2 μ g의 총 RNA와 oligo(dT) 프라이머를 이용하여, QuantiTect Reverse Transcription 키트(Qiagen, 독일)를 사용하여 합성하였다. RT-PCR 분석은 유전자 특이적 프라이머 세트를 사용하여

수행하였다.

[55]

[56] **4. 면역침전법(Coimmunoprecipitation, Co-IP)**

[57] 아그로박테리움 인필트레이션 야생담배 (*Nicotiana benthamiana*)

잎(6주령)으로부터 1ml의 추출 버퍼(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 10% glycerol, 0.3% sodium deoxycholate, 2 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_4), 2 mM NaF, 50 μM MG132, 1 mM PMSF(phenyl-methyl sulfonyl-fluoride) 및 1x protease inhibitor cocktail)를 사용하여 막 풍부(Membrane-enriched) 총 단백질을 추출하였다. 1분 동안 힘차게 볼텍싱한 후, 얼음에 5분 동안 둔 후, 15,000rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 항-GFP 항체(Invitrogen, 미국)와 결합되어 있는 아가로스 비드 20 μl 와 4°C에서 4시간 동안 360도 회전시켜가며 반응시켰다. 반응 후, 아가로스 비드를 모아 세척 버퍼(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 및 1 mM DDT)로 6회 세척하였다. 면역반응 혼합물을 반으로 나누어 웨스턴 블랏으로 분석하였다. 면역반응 혼합물에서 ADF3-Myc의 증명은 항-Myc 단클론항체(Roche, 스위스)를 사용하여 확인하였으며, CLRLK1-GFP의 존재는 항-GFP 항체를 사용하여 검출하였다.

[58]

[59] **5. LCI(Luciferase Complementation Imaging) 어세이**

[60] LCI 어세이를 위해서, 유전자의 코딩 서열을 포함하고 있는 엔트리(entry) 클론을 게이트웨이 데스티네이션 벡터 LUC^N 및 LUC^C로 각각 클로닝시켰다. 상기 컨스트럭스로 인필트레이션된 6주령 야생담배 잎에 루시페린(luciferin)을 분사하였고, LUC 형광신호를 low-light cooled CCD 이미징 장치(Andor iXon; Andor, 북아일랜드)로 분석하였다.

[61]

[62] **6. 굴성 특이도 분석**

[63] 애기장대 유묘는 MS 고체 플레이트에 수직으로 성장시켰다. 굴광성 분석을 위해, 3일령의 연화된(etiolated) 유묘를 새로운 MS 고체 배지로 옮긴 후, 저장도($2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)의 청색광에 3시간 동안 노출시켰다. 굴중성 반응(gravitropic response)의 경우, 3일령의 연화된 유묘를 새로운 MS 고체 배지로 옮긴 후 플레이트를 90도 회전시켜 6시간 동안 두었다. 자극 처리 기간동안 유묘의 곡률(curvature) 정도는 Image J 프로그램(<https://imagej.nih.gov/ij/>)을 이용하여 측정하였다. 각 실험은 20개체의 유묘를 사용하여 2회 반복 수행하였다.

[64]

[65] **7. Aniline Blue 염색**

[66] 애기장대 배축을 칼로스 염색 버퍼(CSB)에 1시간 동안 두었다. CSB는 0.1%(w/v) aniline blue와 1M 글리신(pH 9.5)을 2:3의 부피비로 혼합하여 제조하였다. CSB에 담귀두었던 시료를 꺼내어 세척하고, 형광을

공초점현미경(confocal microscope)으로 관찰하였다.

[67]

[68] **8. 배측 로딩 어세이**

[69] 3일령의 연화된 애기장대 유묘를 배측 로딩 어세이를 위해 사용하였다. 염색약 로딩을 위해, 5mg/ml의 HPTS(8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt)를 포함하는 각각의 한천 블록을 잘린 배측 위에 올려 5분간 두었다. 그 후 유묘를 15분간 세척하고, 상기 형광염료의 이동을 공초점현미경으로 관찰하였다.

[70]

[71] **실시예 1. 애기장대에서 칼로스 결합 수용체의 확인**

[72] 애기장대에서 Dectin-1 단백질과 유사한 단백질을 확인하기 위해, Dectin-1 단백질의 서열(GenBank accession no. AAF72710 및 CAC43847)을 이용하여 BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 분석한 결과, 애기장대에서 C-타입 렉틴(이하 CTL) 도메인을 가진 단백질 CLRLK1(C-type lectin receptor-like kinase 1)이 확인되었다. CLRLK1 단백질은 시그널 펩타이드(SP), 세포외 CTL 수용체 도메인(RD), 막관통성 도메인(TMD) 및 세포내 키나제 도메인으로 이루어져 있으며, RD 영역은 Dectin-1과 30% 수준의 유사성을 보였다(도 1).

[73] CLRLK1 단백질이 칼로스에 결합하는지 알아보기 위해, 유글레나(*Euglena gracilis*) 유래 칼로스 과립과 셀룰로스를 이용하여 인 비트로 pull-out 어세이를 수행하였다. 그 결과, 재조합 CLRLK1 RD는 두 가지 글루칸에 모두 결합하였으나, 셀룰로스보다 높은 특이성이 있음을 알 수 있었다(도 2). MBP(maltose binding protein)를 음성 대조군으로 사용하였다.

[74]

[75] **실시예 2. CLRLK1 단백질의 칼로스 조절 기능 분석**

[76] CLRLK1 단백질의 칼로스-의존적 원형질연락사의 투과성 조절에서의 기능을 확인하기 위해서, 두 개의 동형접합성 T-DNA 돌연변이체(이하 *clrk1*) 및 과발현 식물체(이하 CLRLK1-OX)를 사용하였다.

[77] 원형질연락사의 투과성을 측정하기 위해, HPTS를 연화된 3일령 애기장대의 배측(hypocotyl)의 잘린 상단에 로딩하고 관찰하였다. 그 결과, *clrk1* 식물체에서는 HPTS의 이동이 지연된 것이 관찰되었고, 이는 원형질연락사의 투과성이 제한된 것을 의미하였다. 반면, CLRLK1-OX 식물체에서는 HPTS의 이동이 야생형 애기장대보다 광범위한 것이 관찰되었고, 이의 결과를 통해 CLRLK1-OX 식물체에서는 원형질연락사의 투과성이 증진되었음을 유추할 수 있었다(도 3A 및 3B). 원형질연락사의 투과성 조절이 칼로스 수준의 변화때문인지 확인하기 위해, 3주령의 연화된 애기장대 배측에 대해서 칼로스 염색을 수행하였다. 그 결과, 야생형 및 CLRLK1-OX 식물체에 비해 *clrk1* 식물체에서 원형질연락사에 칼로스 축적이 현저하게 높은 것을 확인할 수 있었다(도 3C 및 3D).

[78] 일반적으로 원형질연락사의 투과성은 굴성 반응에 대해 역비례한다. 즉, 높은 원형질연락사의 투과성은 약한 굴성 반응을 야기하며, 반대로 낮은 원형질연락사 투과성은 높은 굴성 반응을 야기한다. 야생형, *clrlk1* 및 CLRLK1-OX 식물체의 연화된 배측에 대해 굴중성(gravitropic) 및 굴광성(phototropic) 반응을 분석하였다. 그 결과, 예상된 것과 같이 *clrlk1-1* 및 *clrlk1-2* 식물체가 야생형 식물체에 비해 굴중성 및 굴광성 반응이 보다 강한 것으로 확인되었으며, CLRLK1-OX 식물체는 *clrlk1* 식물체와 비교하여 굴성 반응이 감소된 것으로 확인되었다(도 3E 및 3F). 원형질연락사의 투과성 검정법인 CFDA(Carboxyfluorescein diacetate) 염색약 기반 DANS(Drop-ANd-See) 어세이를 통해 상기와 같은 결과를 추가로 확인할 수 있었다(도 3G 및 3H). 상기의 결과를 통해, CLRLK1 단백질이 원형질연락사의 칼로스 축적에 음성 조절자로 기능하며, 원형질연락사의 투과성에 양성 조절자인 것을 알 수 있었다.

[79]

[80] 실시예 3. CLRLK1 단백질의 ADF3 단백질과의 상호작용 분석

[81] CLRLK1의 작용과 관련된 분자적 기작을 연구하기 위해서, 시그널 펩타이드가 결합된 전장의 CLRLK1 단백질을 바이트(bait)로 하여 Yeast Two-Hybrid(Y2H) 라이브러리 스크리닝을 수행하였다. Y2H 스크리닝 결과 CLRLK1 단백질과 상호작용하는 다수의 잠재적인 파트너들이 확인되었고, 이 중, ADF3(actin depolymerizing factor 3)를 추가 연구를 위해 선택하였다. CLRLK1과 ADF3 단백질간 상호작용을 Y2H, LCI(Luciferase Complementation Imaging) 및 BiFC(Bimolecular Fluorescence Complementation) 분석을 통해 확인하였고(도 4A, 4B 및 4D), 면역침전법(coimmunoprecipitation)을 이용하여 재확인하였다(도 4C). CLRLK1과 ADF3 단백질간 BiFC 분석 결과, 작은 반점의 YFP 신호가 원형질연락사 스팟과 비슷하게 세포의 주변부에서 확인되었고, 실질적으로, YFP 스팟의 대부분이 원형질연락사의 칼로스 스팟과 중첩되는 것으로 관찰되었다(도 4D). 이를 통해 원형질연락사에서 CLRLK1 단백질이 ADF3 단백질과 상호작용하는 것을 알 수 있었다.

[82] 그 후, CLRLK1과 ADF3 단백질간 상호작용과 칼로스 간의 연결을 조사하기 위해, CLRLK1과 ADF3의 BiFC 컨스트럭트를 이용하여 내생의 칼로스 및 라미나린에 대한 반응을 분석하였다. 그 결과, CLRLK1 및 ADF3의 BiFC 컨스트럭트로부터 YFP 신호 축적이 내생의 칼로스에 반응하여 현저하게 증진되는 것을 확인할 수 있었다(도 4E 및 4F). 상기 결과를 통해, 칼로스 매개 원형질연락사의 조절에 CLRLK1 및 ADF3 단백질이 협력적인 역할을 수행하리라는 것을 유추할 수 있었다.

[83]

[84] 실시예 4. ADF3 단백질의 칼로스 축적 및 원형질연락사 투과성에 미치는 영향 분석

[85] 애기장대에는 11개의 ADF(actin depolymerizing factor)가 있으나, 오직 ADF3만

원형질연락사에 위치한다. 본 발명자들은 두 개의 동형접합성 T-DNA 돌연변이체(이하 *adf3*) 및 과발현 식물체(이하 ADF3-OX)를 사용하여, HPTS 배측 로딩 분석을 통해 원형질연락사의 투과성을 분석하였다. 그 결과, *adf3* 식물체에서는 HPTS의 이동이 지연되고, ADF3-OX 식물체에서는 HPTS의 이동이 야생형에 비해 증진된 것을 관찰할 수 있었다(도 5A 및 5B). 상기 원형질연락사의 투과성과 칼로스 수준의 관계를 확인하기 위해 연화된(etiolated) 배측의 전단부를 절단하여 칼로스 수준을 확인하였다. 그 결과, ADF3-OX 식물체에 비해서 *adf3* 식물체에서는 원형질연락사의 칼로스 수준이 현저히 높은 것을 알 수 있었다(도 5C 및 5D).

[86] 또한, 야생형, *adf3* 식물체 및 ADF3-OX 식물체의 배측을 이용하여 굴중성을 조사한 결과, *adf3* 식물체는 야생형에 비해 굴중성 반응이 증진되고, ADF3-OX 식물체는 야생형에 비해 굴중성 반응이 감소된 것으로 확인되었으며(도 5E), 원형질연락사의 투과성 검정법인 CFDA(Carboxyfluorescein diacetate) 염색약 기반 DANDS(Drop-ANd-See) 어세이를 통해 *adf3* 식물체에서 원형질연락사의 투과성이 야생형에 비해 감소되어 있으며, ADF3-OX 식물체에서는 원형질연락사의 투과성이 야생형에 비해 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 5F).

[87] 이상의 결과를 통해, CLRLK1 및 ADF3 단백질이 원형질연락사(plasmodesmata)에서 칼로스(callose)의 축적을 조절함으로써, 원형질연락사의 투과성(permeability)을 조절하고, 식물체의 굴성(tropism)을 조절할 수 있음을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] 애기장대 유래 ADF3(actin depolymerizing factor 3) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 굴성(tropism)을 조절하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 애기장대 유래 ADF3 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 식물체의 굴성을 조절하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 애기장대 유래 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자를 식물세포에서 과발현시켜 야생형 식물체에 비해 식물체의 굴성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 애기장대 유래 ADF3 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 저해시켜 야생형 식물체에 비해 식물체의 굴성을 향상시키는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 애기장대 유래 ADF3(actin depolymerizing factor 3) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 굴성(tropism)이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 애기장대 유래 ADF3 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 제조 방법.
- [청구항 7] 제5항 또는 제6항의 방법에 의해 제조된 굴성이 조절된 형질전환 식물체.
- [청구항 8] 제7항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.
- [청구항 9] 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 ADF3(actin depolymerizing factor 3) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 굴성(tropism) 조절용 조성물.

[도1]

RD (CLRLK1)	-----
Hs-DECTIN1	MEYHPDLENLDEDGYTQLHFDQSNTRIAVVSEKGSAAAPPWRLIAVILGILCLVILVI
Mm-DECTIN1	MKYHSHIENLDEDGYTQLDFSTQDIHKRPRGSEKGSQAPSSPWRPIAVGLGILCFVVVVV

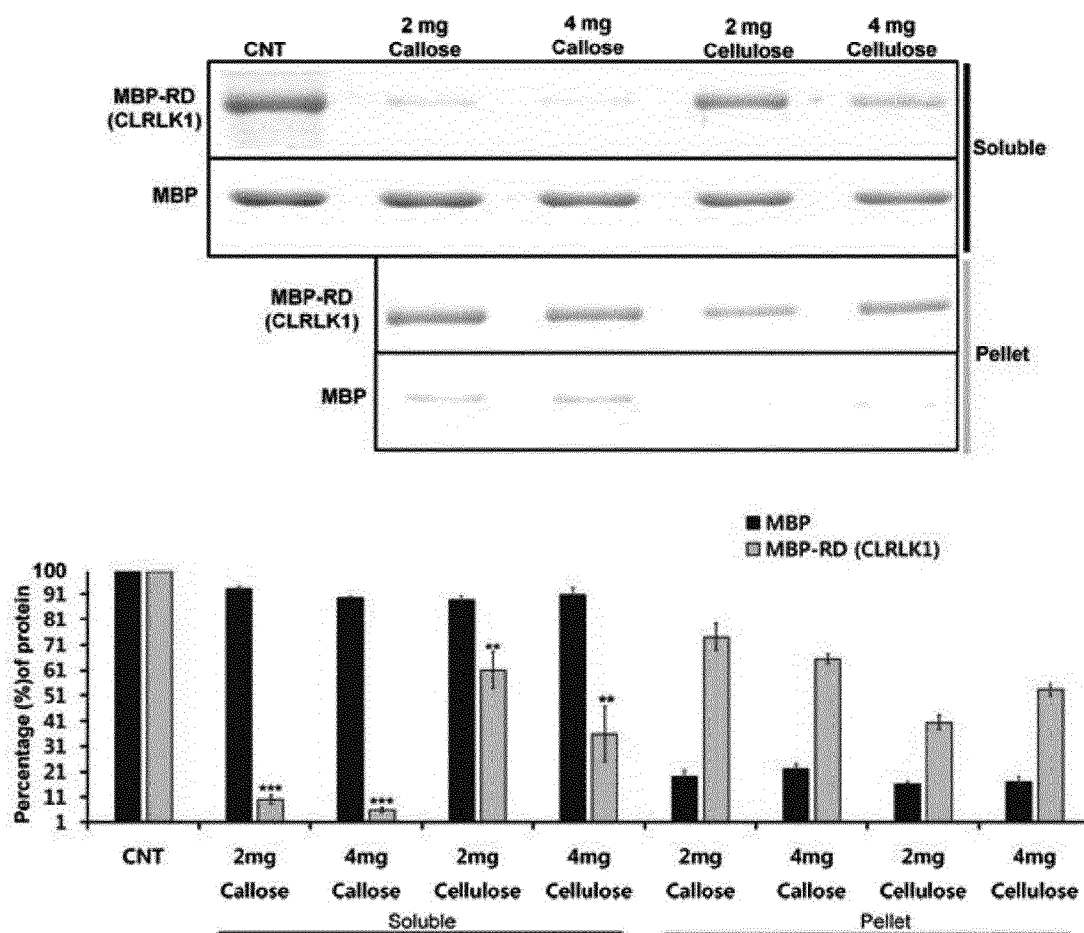
RD (CLRLK1)	-----	ESTQNATDFKKRSQTVSC
Hs-DECTIN1	AVVLGTMAIWRNSGSGNTLENGYFLSRNKENHSQPTQSSLEDSVTPTKAVKTTGVLSSPC	
Mm-DECTIN1	AAVLGALGEYGHNSGRNPEEKDNFLSRNKENH-KPTESSLDEKVAPSKASQTTGGFSQPC	

RD (CLRLK1)	PPDWIIGPNQTKCYAYFKNSTSWEKSEMFCRTYGGHLASLASSKELSFVQKLCNG-NVSS
Hs-DECTIN1	PPNWIIYE--KSCYLFMSLSNSWDGSKRQCQNLGSLNLLKIDSSNELGFIVKQVSSQPDNS
Mm-DECTIN1	LPNWIMHG--KSCYLFSSGNSWYGSKRHCSQLGAHLLKIDNSKEFEFIESQTSSHRINA

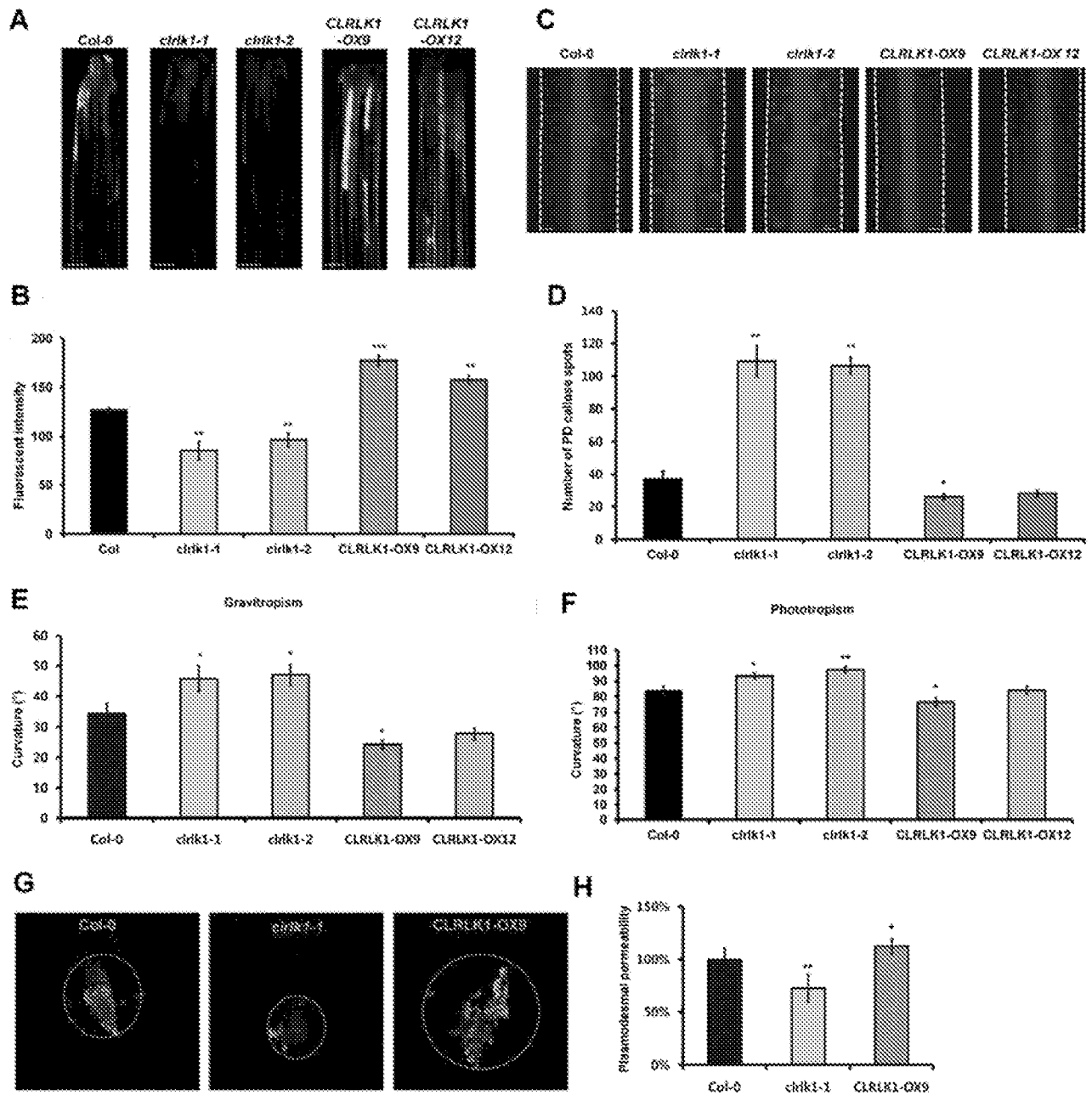
RD (CLRLK1)	CWIGGRSMNSSTSGFRWSWSDPKTPQWNQSMFPKVPIRTRCGNGNGSSSSCRANICIAVTN
Hs-DECTIN1	FWIGLSR--PQTEVPWLWEDGSTFSSN--LF--QIRTTATQENPSPNC-----V--WI
Mm-DECTIN1	FWIGLSR--NQSEGPWFWEDGSAFFPN--SF--QVRNTAPQESLLHNC-----V--WI

RD (CLRLK1)	GSSSIFGERCNASHAFVCAVDSDIKCRNCHKY
Hs-DECTIN1	HVSVIYDQLCSVPSYSICEKKFSM-----
Mm-DECTIN1	HGSEVYNQICNTSSYSICEKEL-----

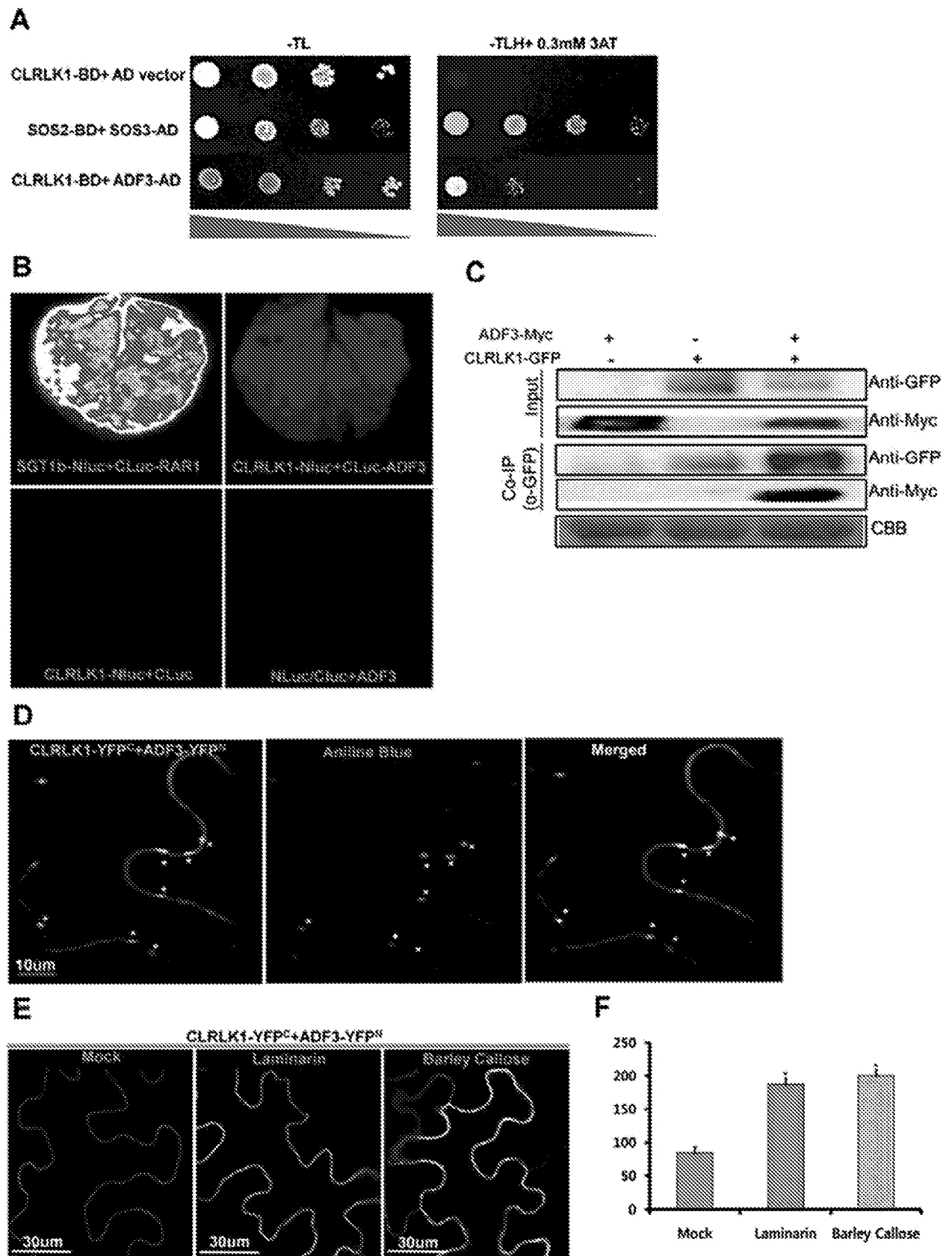
[도2]



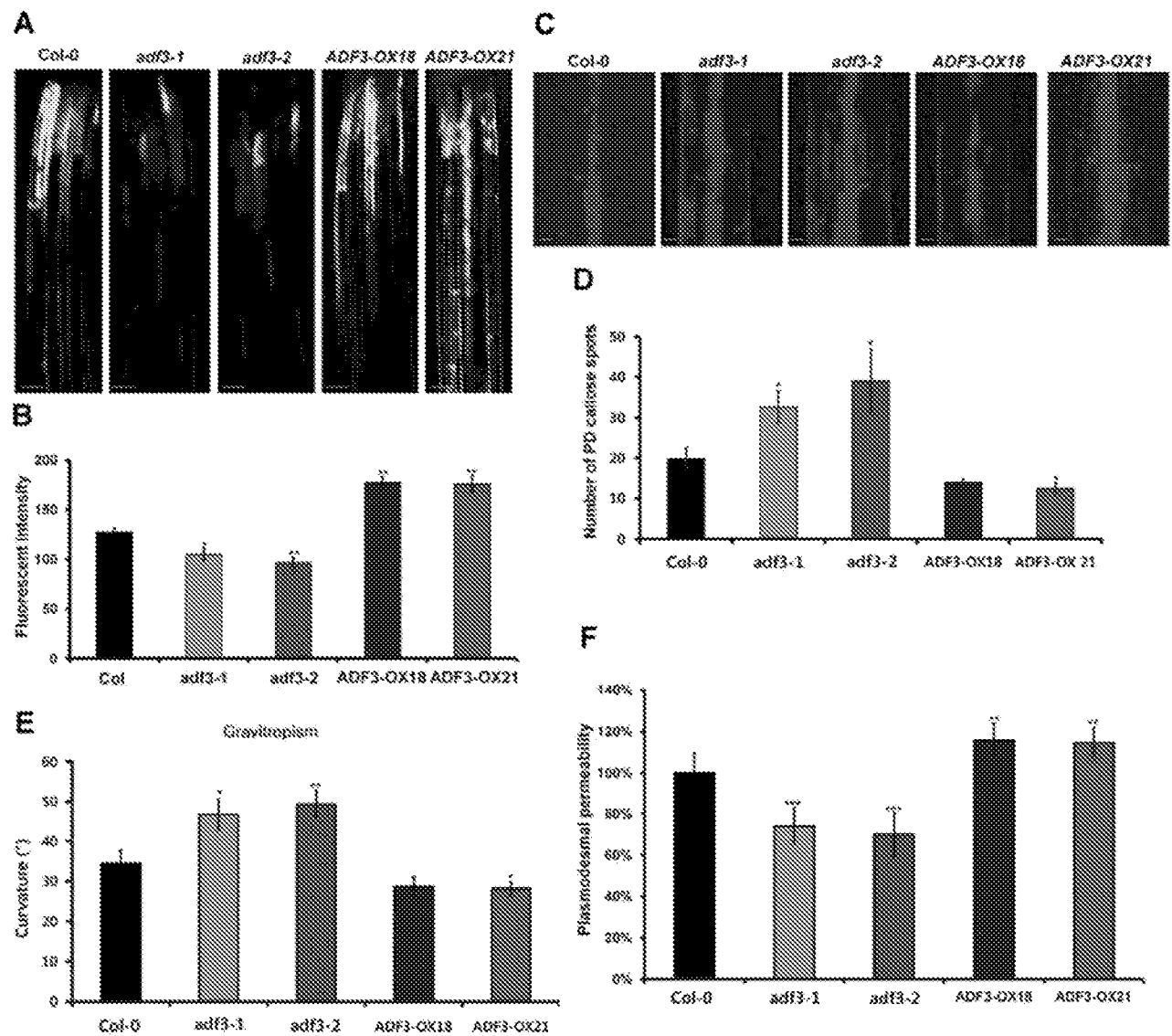
[도 3]



[도 4]



[도 5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/007183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/82; A01H 1/06; A01H 4/00; C07H 21/04; C12N 5/04; 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: ADF3 (actin depolymerizing Factor 3), Arabidopsis, tropism, vector, recombination, transformation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1568911 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 18 November 2015 See abstract; claims 1, 3-13.	1-9
A	LUO, X. et al. A Lectin Receptor-Like Kinase Mediates Pattern-Triggered Salicylic Acid Signaling. <i>Plant Physiol.</i> August 2017, vol. 174, pages 2501-2514 See abstract; page 2502.	1-9
A	CHENG, X. et al. A rice lectin receptor-like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination. <i>The Plant Journal.</i> 2013, vol. 76, pages 687-698 See abstract.	1-9
A	NCBI. GenBank Accession no. NP_851227.1. actin depolymerizing factor 3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]. 20 March 2017 See the entire document.	1-9
A	US 2008-0050825 A1 (FRANK, M. et al.) 28 February 2008 See the entire document.	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

24 SEPTEMBER 2019 (24.09.2019)

Date of mailing of the international search report

24 SEPTEMBER 2019 (24.09.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/007183

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1568911 B1	18/11/2015	KR 10-2015-0066258 A	16/06/2015
US 2008-0050825 A1	28/02/2008	AR 050085 A1	27/09/2006
		CA 2573317 A1	09/02/2006
		CN 101001955 A	18/07/2007
		DE 102004036456 A1	23/03/2006
		EP 1771567 A2	11/04/2007
		RU 2007107179 A	10/09/2008
		US 7928289 B2	19/04/2011
		WO 2006-012985 A2	09/02/2006
		WO 2006-012985 A3	29/06/2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

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

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/82; A01H 1/06; A01H 4/00; C07H 21/04; C12N 5/04; 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: ADF3(actin depolymerizing Factor 3), 애기장대(Arabidopsis), 굴성(tropism), 벡터, 재조합, 형질전환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1568911 B1 (경상대학교산학협력단) 2015.11.18 요약; 청구항 1, 3-13 참조.	1-9
A	LUO, X. 등, 'A Lectin Receptor-Like Kinase Mediates Pattern-Triggered Salicylic Acid Signaling', Plant Physiol., 2017.08, 174권, 페이지 2501-2514 초록; 페이지 2502 참조.	1-9
A	CHENG, X. 등, 'A rice lectin receptor-like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination', The Plant Journal, 2013, 76권, 페이지 687-698 초록 참조.	1-9
A	NCBI, GenBank Accession No. NP_851227.1, 'actin depolymerizing factor 3 [Arabidopsis thaliana]', 2017.03.20 전체 문헌 참조.	1-9
A	US 2008-0050825 A1 (FRANK, M. 등) 2008.02.28 전체 문헌 참조.	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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 09월 24일 (24.09.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 09월 24일 (24.09.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

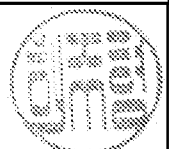
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1568911 B1	2015/11/18	KR 10-2015-0066258 A	2015/06/16
US 2008-0050825 A1	2008/02/28	AR 050085 A1	2006/09/27
		CA 2573317 A1	2006/02/09
		CN 101001955 A	2007/07/18
		DE 102004036456 A1	2006/03/23
		EP 1771567 A2	2007/04/11
		RU 2007107179 A	2008/09/10
		US 7928289 B2	2011/04/19
		WO 2006-012985 A2	2006/02/09
		WO 2006-012985 A3	2006/06/29