

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 5월 6일 (06.05.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/068587 A1

- (51) 국제특허분류:
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/011404
- (22) 국제출원일: 2015년 10월 28일 (28.10.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0148591 2014년 10월 29일 (29.10.2014) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 이상원 (LEE, Sang Won); 16697 경기도 수원시 영통구 영통로 290 번길 25, 504 동 203 호, Gyeonggi-do (KR). 박종찬 (PARK, Jong Chan); 47387 부산시 부산진구 북지로 70, 206 동 304 호, Busan (KR). 안진홍 (AN, Gyn Heung); 17084 경기도 용인시 기흥구 탑설로 152, 210 동 1703 호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 STX R&D 센터 6층 한일국제특허사무소, 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, 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).

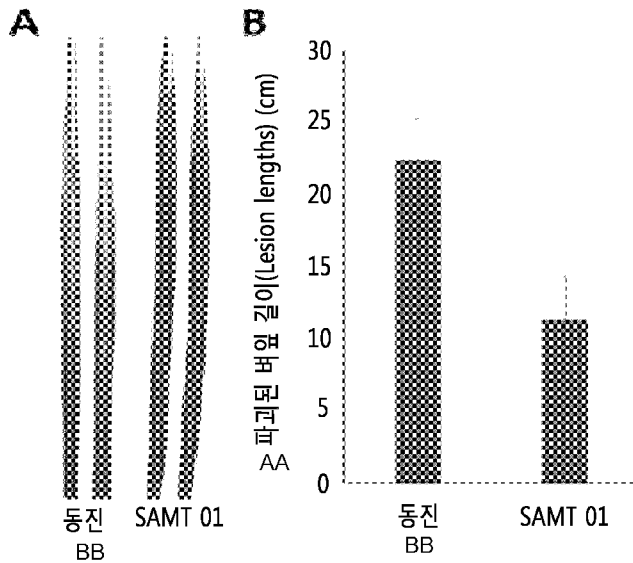
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: BACTERIAL LEAF BLIGHT-RESISTANT METHYLTRANSFERASE AND TRANSGENIC PLANT USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 흰잎마름병 저항성 메틸전이효소 및 이를 이용한 형질 전환 식물체



AA ... Lesion lengths (cm)
BB ... Dongjin

(57) Abstract: The present invention relates to a transgenic plant having enhanced activity of gene LOC_Os01g50610 including SEQ ID NO: 2 encoding methyltransferase, to a recombinant vector, comprising an expression induction sequence of enhancing activity of the gene, for promoting plant disease resistance, and to a method for producing the transgenic plant. In addition, the present invention relates to a method for promoting plant disease resistance, the method comprising a step of enhancing activity of the gene LOC_Os01g50610. The present invention is directed to transgenic rice which has a strong resistance to bacterial leaf blight and improves the quality of seeds by inserting an expression induction sequence into an expression regulatory site of LOC_Os01g50610, which is a gene resistant to bacterial leaf blight and inherently exists in rice. The use of the transgenic rice of the present invention can reduce the use of agricultural chemicals, improve productivity, and supply safe agricultural products, through the resistance to diseases and the promotion in the quantity of seeds, and thus the transgenic rice of the present invention can be widely used.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/068587 A1



— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체, 상기 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터 및 상기 식물 형질 전환체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 상기 LOC_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법에 관한 것이다. 본 발명은 벼에 내재적으로 존재하며 흰잎마름병에 대한 저항성 유전자, LOC_Os01g50610의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열을 삽입함으로써, 흰잎마름병에 대해 강력한 저항성을 가지고 종자의 품질을 향상시킨 형질전환 벼에 대한 것으로, 본 발명의 형질전환 벼를 이용하면 병 저항성 및 종자의 수량 증진을 통해 농약사용 절감, 생산성 향상 및 안전한 농산물 공급이 가능하게 되어 널리 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 흰잎 마름병 저항성 메틸전이효소 및 이를 이용한 형질 전환 식물체

기술분야

- [1] 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체, 상기 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터 및 상기 식물 형질 전환체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 상기 LOC_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 벼 흰잎 마름병은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*에 의해서 발생하는 세균성 도관병으로, 발병시기는 7월 초~수확기이나 주로 7월 상순~8월 중순에 발병한다. 중간 기주식물인 줄풀 및 겨풀 등의 땅속줄기 또는 뿌리주위나 병든 볏짚 및 벼 그루터기에서 세균의 월동이 가능하다. 세균이 편모(鞭毛)에 의해 물을 따라 전염하고 벼잎의 물구멍과 공기구멍 부위 및 절단된 뿌리로 침입한다. 병 발생은 해마다 발생이 많은 상습발생지 위주로 발생하나 침관수지역이 아닌 지역에서도 발생이 많다.
- [3] 보통 출수기 전후에 나타나나 상습발생지나 다발생 발생지에는 본답 초기에 발병하며, 드물게는 묘판에서도 발병된다. 국내에서 최초 발병보고는 1930년 전라남도 해남군에서 처음 발견된 이래 1960년까지 남부 일부 지역에 제한적인 발생을 보이다 이병성 품종인 금남풍의 재배 확대로 전국적인 발생을 나타내었으며, 이후 다수계 품종 재배에 의한 밀양 23호에 의해 피해가 확대되어 재배기간 중 후기에 발생하는 잎에서의 발병 뿐만 아니라 이앙 후 분얼기까지 주 전체가 발생하는 금성형 증상을 보여 벼의 3대 병해의 하나로 간주된다.
- [4] 벼 흰잎 마름병균은 그람음성세균으로 분류되고 벼의 세균성 위조병을 유발하는 식물병원세균으로 세계적으로 널리 분포하여 벼에 큰 피해를 주지만, 병원균이 벼의 도관 내에서 증식하므로 약제방제 효과는 매우 낮으며, 현재까지 이 병에 특이적인 살균제 또한 없는 실정이다.
- [5] 또한, 기존의 작물에 대한 저항성 부여방법은 외래 유전자의 도입을 통해 식물체로 하여금 새로운 형질을 부여하는 기술이 대다수였다.
- [6] 한편, 동진벼는 내병, 양질, 다수성 신품종육성을 목표로 1975년에 농촌진흥청에서 금남풍과 낙동벼 그리고 사도미노리를 교배하여 개발된 품종으로, 병해 저항성의 경우 줄무늬잎마름병에 강하고, 도열병에는 중간 정도의 저항성을 가지며, 흰잎 마름병과 기타 병충해에는 약한 편이다. 이에, 동진벼의 흰잎 마름병과 도열병에 대한 저항성 연구와 개량된 품종에 대한 육성

전략이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 아직 극복되지 못한 벼 흰잎마름병에 대한 저항성 유전자를 동정하기 위해 예의 연구 노력한 결과, 천연형 벼 동진의 보유 유전자 중 흰잎마름병에 저항성을 부여하는 메틸전이효소 유전자 (LOC_Os01g50610)를 동정해내어, 이를 활성화시킨 형질전환체가 흰잎마름병에 저항성을 나타냈으며, 종자의 수량이 증진된다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 하나의 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 상기 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 식물을 감염시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 감염된 식물의 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 식물의 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [12] 본 발명은 벼에 내재적으로 존재하는 흰잎마름병에 대한 저항성 유전자, LOC_Os01g50610의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열을 삽입함으로써, 흰잎마름병에 대해 강력한 저항성을 가지고 종자의 수량을 증진시킨 형질전환 벼에 대한 것으로, 본 발명의 형질전환 벼를 이용하면 병 저항성 및 종자의 수량 증진을 통해 농약사용 절감, 생산성 향상 및 안전한 농산물 공급이 가능하게 되어 널리 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 흰잎마름병에 대한 저항성과 관련된 유전자로 선별된 LOC_Os01g50610의 구조에 대한 개요도로, 도 1의 A는 유전자 상의 구조를 나타내며, 도 1의 B는 유전자가 발현된 단백질의 구조를 나타낸다. 이에 표시된 Methyltransf_7은 메틸전이효소 활성 부분 (methyltransferase domain)을 의미한다.
- [14] 도 2는 LOC_Os01g50610의 발현을 조절하는 부위에 T-DNA를 포함한 유전자 발현 유도 서열이 삽입된 SAMT 01 유전자 변형 벼의 게놈 DNA의 일부분을

나타내는 구조도이다.

[15] 도 3은 SAMT 01 유전자 변형 벼에서 T-DNA 삽입위치를 PCR로 확인한 도면이다.

[16] 도 4는 SAMT 01 유전자 변형 벼에서 LOC_Os01g50610의 발현을 확인하는 RT-PCR 결과를 보여주는 도면이다.

[17] 도 5는 SAMT 01 유전자 변형 벼의 흰잎 마름병에 대한 저항성을 실험한 결과를 보여주는 도면으로, 도 5의 A는 천연형 벼 및 SAMT 01 유전자 변형 벼의 흰잎 마름병균을 가위 접종법으로 접종한 결과를 보여주는 사진이고, 도 5의 B는 이의 감염에 의해 파괴된 벼 잎의 길이를 측정하여 평균 낸 결과를 나타낸 그래프이다.

[18] 도 6은 SAMT 01 유전자 변형 벼와 천연형 벼인 동진벼의 종자의 형태를 비교한 도면이다.

[19] 도 7은 SAMT 01 유전자 변형 벼와 천연형 벼인 동진벼의 종자 길이 및 너비를 비교한 도면이다.

[20] 도 8은 SAMT 01 유전자 변형 벼와 천연형 벼인 동진벼의 1,000개의 종자 무게를 비교한 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[21] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체를 제공한다.

[22] 본 발명에서는 메틸전이효소인 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성이 강화되도록, LOC_Os01g50610의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열을 삽입함으로써, 해당 유전자를 발현하여 흰잎 마름병에 대해 저항성을 갖춘 형질전환 벼를 제조하였다.

[23] 보다 상세하게는 본 발명자들은 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 이용한 형질전환 방법을 통해 만들어진 10만 개통의 벼 돌연변이 집단에서 흰잎 마름병에 저항성이 있는 식물 형질 전환체를 관찰하였다. 상기 식물 형질 전환체는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)에 의해 유전자를 발현시키는 발현 유도 서열을 포함하는 T-DNA가 genome 상에 삽입되어 삽입된 지역의 유전자 기능이 활성화된 식물체로, T-DNA의 삽입 위치는 genome DNA PCR과 염기서열 분석을 통해 확인할 수 있으며, 데이터 베이스에서 유전자 locus id를 찾을 수 있다.

[24] 본 발명에서 용어 "메틸전이효소"는 메틸기전이를 촉매하는 효소의 총칭으로, 메틸기전달효소의 일종으로 기질인 아미노기, 히드록시기, 티올기를 메틸화하여 메틸화효소라고 부르는 경우도 있다

[25] 본 발명에서 용어, "LOC_Os01g50610"는 *Oryza sativa* 1번째 유전체 (chromosome)에 존재하는 유전자로, 이의 발현물은 단백질 메틸전이효소의

- 일종이다. 상기 LOC_Os01g50610 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가지며, 상기 염기서열은 서열번호 3의 아미노산 서열로 코딩된다.
- [26] 본 발명에서 상기 식물 형질 전환체 제조에 사용되는 LOC_Os01g50610 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 유전자 일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 유전자 일 수 있으며, 또는 서열번호 3의 아미노산 서열로 코딩되는 유전자 일 수 있다.
- [27] 상기 LOC_Os01g50610 (TIGR, Os01g0701700 (RAP-DB))의 genome DNA 크기는 2844 bp (서열번호 1)이며 대표 coding sequence (LOC_Os01g50610.1)의 크기는 1140 bp (서열번호 2)로 5개의 엑손(exon)과 4개의 인트론(intron)으로 구성되며, 380 개의 아미노산으로 번역되어 단백질 (서열번호 3)이 만들어진다. 이 단백질은 plant methyltransferase domain (Methyltransf_7)을 암호화 한다 (도 1B).
- [28] 상기 LOC_Os01g50610 유전자는 벼에 내재적으로 존재하는 유전자로, 본 발명에서 용어, "내재적"이란 생물이 천연의 상태로 가지고 있는 것을 의미하는데, 본 발명에서는 식물, 구체적으로는 벼(*Oriza sp.*) 유전체(chromosome)가 천연적으로 가지고 있는 유전자를 표시할 때 사용한다.
- [29] 본 발명에서 용어, "활성 강화"는 특정 유전자의 활성을 강화시키는 것을 의미하고, 용어 "활성화"와 혼용하여 사용될 수 있다. 또한 불활성화된 유전자를 활성화시키거나 활성이 낮은 유전자의 활성을 높이는 것도 포함한다. 1) 해당하는 유전자를 1 카피 이상 도입, 2) 해당하는 유전자의 발현 조절 부위에 발현을 유도하는 서열을 삽입, 3) 활성이 강화된 형태로 변형시키는 방법으로 강화, 또는 4) 이의 조합에 의해 활성이 강화되도록 변형시킬 수 있다. 본 발명에서는 구체적으로는 LOC_Os01g50610의 발현 조절 부위에 발현을 유도하는 서열 또는 프로모터(promoter)를 삽입할 수 있으며, 더욱 구체적으로는 서열번호 4로 기재되는 발현 유도 서열을 포함하는 서열을 삽입할 수 있다.
- [30] 본 발명에서 용어, "활성이 낮은 유전자"는 DNA, 즉 유전자 상으로는 존재하나 RNA로 전사(transcription)되는 비율이 낮거나, 단백질로 번역(translation) 되는 비율이 낮아서 본연의 기능을 발휘하지 못하는 것을 의미하고, 본 발명에서는 벼가 내재적으로 가지고 있는 유전자가 전사 또는 번역이 되는 비율이 낮아서 그 기능을 제대로 발현하지 못하는 것을 의미하고, 특히, LOC_Os01g50610 유전자가 그 기능을 제대로 발현하지 못하는 것을 의미한다.
- [31] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 LOC_Os01g50610 유전자의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열(서열번호 4)을 삽입함으로써, LOC_Os01g50610 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였다(도 4). 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 상기 LOC_Os01g50610 유전자의 활성이 강화되도록 형질전환된 식물 형질 전환체가 흰잎 마름병에 대해 병 저항성을 가지는 것을 확인하였으며(도 5), 상기 LOC_Os01g50610 유전자의 활성이 강화되도록 형질전환된 식물 형질 전환체와 천연형 벼인 동진벼를 비교하였을 때, 상기 형질

- 전환체의 종자의 형태, 길이, 너비 및 종자 1,000개의 무게가 우수하여 수량이 증진된다는 것을 확인하였다(도 6 내지 8).
- [32] 본 발명에서 용어, "발현 유도 서열"은 유전자의 발현 조절 부위에 존재할 때 발현을 촉진하는 기능을 하는 서열을 제한없이 포함하며, 전사인자 결합 부위, 인핸서(enhancer), 조효소 결합 부위(co-factor binding region) 등을 포함한다. 본 발명에서 상기 유전자의 발현 조절 부위에 삽입되는 서열은 서열번호 4로 기재되는 발현 유도 서열을 포함하는 것이 바람직하다.
- [33] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 DNA 염기서열 상의 삽입, 결실 또는 대체 등의 변이를 통해 특정 형질이 발생하거나 사라지거나 조절되는 모든 행위를 의미하며, 특히 본 발명에서는 외부로부터 주어진 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것을 의미한다. 본 발명에서 용어, "형질 전환체"는 형질전환으로 인해 생성된 형질전환 식물을 의미하며, 유전자 재조합 기술을 이용하여 특정 유전자의 변형 또는 활성의 변이가 유발되어 생성된 유전자 재조합체를 포함한다.
- [34] 본 발명에서 용어, "식물 형질 전환체"는 형질전환의 대상이 될 수 있는 모든 식물을 포함하며, 특히, LOC_Os01g50610 유전자 또는 이에 해당하는 유전자가 불활성되거나 활성이 낮은 식물은 모두 제한없이 포함한다. 구체적으로는 상기 식물 형질 전환체는 벼(*Oryza sp.*)일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 동진벼일 수 있다.
- [35] 본 발명에서 상기 식물 형질 전환체는 흰잎 마름병에 대한 저항성을 가질 수 있다.
- [36] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 동진벼에 상기 내재적 유전자인 LOC_Os01g50610의 발현 조절 부위에 서열번호 4의 발현 유도 서열을 삽입하는 형질전환을 통하여 LOC_Os01g50610에 해당하는 유전자의 활성이 강화되는 형질전환체를 제조하였으며, 이를 SAMT 01이라고 명명하였다.
- [37] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터를 제공한다.
- [38] 상기 메틸전이효소, LOC_Os01g50610 및 발현 유도 서열은 상기 설명한 바와 같다.
- [39] 본 발명에서 용어, "병 저항성"은 각종 질병에 대해 발병이 잘 일어나지 않거나, 발병되더라도 병 진행의 속도가 현저히 느리거나, 회복이 되는 능력이 뛰어난 것을 의미한다. 본 발명에서 병 저항성은 흰잎 마름병에 대한 저항성을 의미할 수 있다.
- [40] 본 발명에서 용어, "재조합 벡터"는 특정 서열이 변이, 삽입 또는 제거되는 유전자 재조합 과정을 거친 벡터를 의미하며, 바람직하게는 발현 유도 서열이 삽입된 벡터를 의미하고, 더욱 바람직하게는 해당 발현 유도 서열을 LOC_Os01g50610의 발현 조절 부위에 삽입할 수 있는 기능을 하는 재조합

백터를 의미한다.

- [41] 상기 재조합 백터는 LOC_Os01g50610 유전자가 발현될 수 있도록, 발현조절 서열과 기능적으로 연결되어 있다. 예를 들어, 백터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한, 백터는 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 백터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 백터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [42] 본 발명의 일 실시예에서는, LOC_Os01g50610 유전자의 발현 조절 부위에 서열번호 4의 발현 유도 서열 포함하는 재조합 백터를 제조하였으며, 이를 아그로박테리움을 통해 벼 세포에 도입하여, 내재적 유전자였던 LOC_Os01g50610 유전자의 발현을 증가하였다.
- [43] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 상기 재조합 백터가 도입된 아그로박테리움으로 식물을 감염시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 감염된 식물의 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 식물의 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법을 제공한다.
- [44] 본 발명에서 용어, "아그로박테리움"은 그람양성의 세균으로, 식물의 뿌리나 줄기의 상처를 통해 식물세포에 감염되어, 자신이 가지고 있는 유전자를 식물 세포의 유전체에 삽입하여 식물세포의 형질전환을 일으키는 암종세균의 일종이다. 본 발명에서 상기 아그로박테리움은 바람직하게는 아그로박테리움 투메파키엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)일 수 있다.
- [45] 본 발명에서 용어, "캘러스(callus)"란, 식물에 상처가 났을 때 생기는 분화되지 않은 부정형의 세포덩어리로 즉, 미분화세포를 의미하며, 특히, 본 발명에서는 식물의 잘린 부위에 아그로박테리움 등 형질전환용 암종세균을 감염시켰을 때 감염된 세포가 미분화상태로 상처부위에 덩어리진 것을 의미한다. 즉, 본 발명에서는 암종세균에 감염되어 형질전환된 세포만이 암종 덩어리를 생성하는 특징을 이용하여 형질전환된 미분화세포를 얻을 수 있는데 이것이 캘러스 형태로 생성되게 된다.
- [46] 상기 병 저항성이 증진된 형질전환체의 제조방법은, 바람직하게는 수득된 캘러스를 뿌리 및 성체로 분화시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 캘러스는 상기 설명한대로 미분화된 상태의 세포 덩어리에 불과하기 때문에, 이를 온전한 종자로 수득하기 위해서는 뿌리 및 성체로 분화하는 것을 유도하는 것이 필요할 수 있다.
- [47] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 수득된 캘러스를 루트-인덕션 배지에서 배양하여 뿌리 및 성체로 분화하는 것을 유도하였다(실시예 2).
- [48] 또 하나의 양태로, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의

염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법을 제공한다.

[49] 본 발명의 LOC_Os01g50610 유전자, 활성 강화 및 병 저항성 등은 상기 설명한 바와 같다.

[50] 본 발명에서, 상기 용어 "증진"은 본 발명에서 대조군 벼와 비교하여 적어도 5% 또는 10%, 구체적으로는 적어도 20% 또는 40%, 더욱 구체적으로는 50%, 60%, 70% 또는 80% 이상의 병 저항성을 의미하며, 벼가 원래 가지고 있는 병 저항성에 비해 상기 유전자를 도입하여 병 저항성이 증가되는 것을 의미한다.

발명의 실시를 위한 형태

[51] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[52] 실시예 1. Bioinformatics를 통한 형질전환 타겟 유전자 선별

[53] 동진벼의 유전체가 보유한 식물체의 질환 저항성과 밀접한 관련이 있을 것으로 예측되는 메틸전이효소 230개를 동정하였다. 이 중, microarray data를 바탕으로 MeV v2.0 프로그램을 이용하여 흰잎 마름병에 저항성을 가질 확률이 높은 유전자를 108개 선별하였다. 선별된 유전자에 대하여 형질전환체를 제조하여 병 저항성을 갖는 유전자를 동정해 내는 과정에서, 본 발명의 LOC_Os01g50610이 흰잎 마름병에 저항성을 갖는 유전자로 선별되었다.

[54] 실시예 2. 발현 유도체 삽입된 형질전환 벼 제조

[55] 2-1. 벼 형질전환용 재조합 벡터 제조

[56] 타겟 유전자의 발현 조절 부위의 염기서열에 발현 유도 서열을 삽입하기 위해 벡터를 제작하였다. 먼저, 유전체 삽입을 위한 T-DNA, 삽입위치의 왼쪽 유전자 서열을 확인하기 위한 N-GUS, 서열번호 4의 유전자의 발현 유도 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하기 위한, 담배 잎 모자이크바이러스 35S 프로모터 유래 DNA, 삽입위치의 오른쪽 유전자 서열을 확인하기 위한 L-0.5/1.5를 가지는 벡터를 제작하였다. 삽입된 유전체로부터 타겟 유전자의 확인과 증폭을 위한 프라이머는 아래와 같다.

[57] Enhancer-F (정방향, 서열번호 9)

[58] 5'-gatccccaacatggtggagc-3'

[59] Enhancer-R (역방향, 서열번호 10)

[60] 5'-ggatctagatatcacatcaa-3'

[61] PCR 증폭 조건은 처음 DNA의 열변성을 위하여 94°C에서 3분간 1 cycle, 그리고 94°C 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 2분간으로 총 35 cycle을 실시하였으며, 최종 DNA 합성은 7분으로 하였다.

[62] 해당 증폭된 PCR 산물을 1.0%의 아가로스겔(agarose gel)로 전기영동 한 후 EtBr(ethidium bromide) 용액에 염색하여 UV lamp하에서 염기 크기에 해당하는

band를 절단하여 아가로즈겔(agarose gel) 정제법으로 정제하였다.

- [63] 추출한 PCR 산물을 상기 제한효소 BamHI/KpnI으로 절단하였다. 또한, 재조합 벡터인 pGA2772 벡터를 제한효소 BamHI/KpnI로 절단하여, 절단된 벡터를 상기 아가로즈겔 정제법으로 정제하였다. 상기 PCR 산물에 의한 DNA 단편을 절단된 재조합 벡터에 삽입하여, 조절부위 발현 유도체 서열 (Enhance sequence, 서열번호 4)이 삽입된 재조합 벡터 pGA2772 vector를 제조하였다.

[64] **2-2. 형질전환체 제조**

- [65] 상기 제조된 벡터를 전기충격 방법(electroporation)을 이용하여 아그로박테리움 투메파키엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 도입하였다. 배양실에서 무균상태로 자란 동진벼에 리프 디스크(leaf disc)법으로 형질전환하였다. 구체적으로는 벼잎을 대략 5 x 5 mm 크기로 잘라서 200 μ l의 아그로박테리움이 포함된 MSO 액체 배지(MS 염 4.3g, 수크로스 30g/L, pH 5.6 내지 5.8)에 넣었다가 암조건에서 2 내지 3일 동안 배양하고, 배양된 잎 절편을 캘러스-슈트(callus-shoot) 유도 배지(MSO배지에 100 μ g NAA, 1mg BA, 500 μ g 세포탁심, 1 mg 포스피노트리신(phosphinothricin), 0.7% 피토 한천(phyto agar), pH 5.6)으로 옮기고, 새로운 배지로 옮겨 주었다. 유도된 발아는 1.5 내지 2 cm 정도 자라던 루트-인덕션 배지(MSO배지에 250 μ g 세포탁심, 10mg 포스피노트리신, 0.7% 피토 한천, pH 5.6)로 옮겨 주었다.

- [66] 발현 유도체가 삽입된 상기 유전자 형질전환 벼를 SAMT 01로 명명하였으며, 이의 유전자 구조는 도 2에 개시된 바와 같다. 구체적으로는, 동진 벼의 첫 번째 유도체에 존재하는 LOC_Os01g50610의 발현 조절 부위로 예측되는 상류부분(upstream region)에 T-DNA 서열 (서열번호 5)을 삽입하여, 도 2와 같은 유전체 구조를 가진 형질전환체를 제작하였다.

[67] **2-3. 재조합 벡터의 벼 유전체 삽입위치 확인**

- [68] T-DNA 삽입에 의해 만들어진 SAMT 01에 대한 inverse-PCR 및 염기 서열 분석을 통해 T-DNA가 삽입된 염색체를 분석하였다.
- [69] 상기 선발된 계통의 벼 종자를 MSO 배지에 28°C에서 10일간 배양하였다. 이렇게 배양한 개체들의 잎 100mg을 채취하여 액체질소를 이용하여 급냉각한 후 분쇄하였다. 분쇄된 잎에서 one step buffer (1M Tris (pH9.5) 5ml, 0.5M EDTA 1ml, KCl 3.73g을 넣고 물로 50ml을 맞춰 조제)을 이용하여 DNA를 추출하였다.
- [70] SAMT 01은 LOC_Os01g50610 유전자의 발현조절 상류부분에 T-DNA가 삽입된 계통으로 T-DNA 삽입위치에서 앞뒤에서 만들어진 프라이머 (서열번호 6 및 서열번호 7)와 T-DNA 삽입서열 중 iR2 프라이머 (서열번호 8)를 이용하여 PCR로 유전형 분석을 하였다.
- [71] PCR 반응은 95°C에서 5분 후; 95°C에서 1분, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분 을 38회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 7분을 진행하였다. PCR 산물은 agarose gel을 이용하여 전기영동으로 확인하였다(도 3). 이를 통해 유전형을 선발하였다.
- [72] 이에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[73] SAMT 01_F (서열번호 6)

[74] 5'-TCTGCCACATCTTTTGACCT-3'

[75] SAMT 01_R (서열번호 7)

[76] 5'-GCCCATCTCTCTCATTACACA-3'

[77] iR2 (서열번호 8)

[78] 5'-CAGGACGTAACATAAGGGACTGA-3'

[79] 실시예 3. 형질전환 벼의 유전자 활성화 검증

[80] LOC_Os01g50610 유전자의 발현 조절 부위에 발현 유도체를 삽입한 형질전환 벼 (SAMT 01)에서 LOC_Os01g50610 유전자 활성을 역전사 효소 PCR (RT-PCR, reverse transcriptase-PCR)로 확인 하였다.

[81] 구체적으로는, 형질전환 벼 (SAMT 01)의 잎 0.1g에서 total RNA를 추출하였다. 이를 주형으로 하여 LOC_Os01g50610의 발현을 확인할 수 있는 RNA 역전사용 프라이머와 역전사 효소 (reverse transcriptase DNA polymerase)를 이용하여 역전사 효소 PCR을 수행하였다.

[82] 도3 에서 확인할 수 있듯이, 천연형 동진벼에 비하여 본 발명의 형질전환 벼에서는 유전자 LOC_Os01g50610의 발현이 높아졌다는 것을 확인할 수 있었다.

[83] RT-SAMT 01_F (정방향, 서열번호 11)

[84] 5'-CAACGACTTCAACACCATCTT-3'

[85] RT-SAMT 01_R (역방향, 서열번호 12)

[86] 5'-GAAGGAACCTGACCTGGGAG-3'

[87] 실시예 4. 형질전환 벼(SAMT 01)의 벼 흰잎마름병에 대한 저항성 검정

[88] 상기 실시예 2에서 제조된 형질전환 벼가 흰잎마름병에 대해 저항성을 보이는지 확인하기 위해, LOC_Os01g50610 발현 조절부위에 발현 유도체가 삽입된 형질전환 벼인 SAMT 01과 대조군으로 천연형 동진벼를 6주간 생장시켜 흰잎마름병을 유발하는 균주인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (strain : PXO99Az)를 가위에 묻혀 접종한 2주 후 병증을 측정하였다 (도 5). 병증 측정은 접종한 부위로부터 감염되어 파괴된 상처 길이(Lesion Lengths)를 측정하여 천연형 동진벼와 비교하였다.

[89] 도 5의 B에서 확인할 수 있듯이 SAMT 01 형질전환체는 평균 병증의 길이가 천연형 동진벼의 반 정도에 불과하여 (천연형 vs. SAMT 01 : 22.3cm vs. 11.3cm), 흰잎마름병에 대한 강력한 저항성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[90] 이와 같은 결과를 통하여, 본 발명의 형질전환 벼 SAMT 01은 내재적 유전자 LOC_Os01g50610를 활성화시킴으로써 흰잎마름병에 대한 저항성을 가질 수 있음을 확인하였다.

[91] 실시예 5. 형질전환 벼(SAMT 01)의 수량 증진 확인

[92] 상기 실시예 2에서 제조된 형질전환 벼가 천연형 동진벼에 비해 그 수량이 증진되는지를 확인하기 위해, LOC_Os01g50610 발현 조절부위에 발현 유도체가 삽입된 형질전환 벼인 SAMT 01과 대조군으로 천연형 동진벼의 종자의 형태,

길이, 너비 및 종자 1,000개의 무게를 측정하여 비교하였다.

[93] 도 6 내지 8에서 확인할 수 있듯이, SAMT 01 형질전환체의 종자 크기는 천연형 동진벼보다 그 형태가 크고 두께가 두꺼웠으며, 길이, 너비 및 종자 1,000개의 무게 또한 SAMT 01 형질전환체가 더 향상되었음을 확인할 수 있었다.

[94] 이와 같은 결과를 통하여, 발명의 형질전환 벼 SAMT 01은 내재적 유전자 LOC_Os01g50610를 활성화시킴으로써 천연형 동진벼보다 더 나은 수량의 증진을 확인하였다.

[95] 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 실시예들은 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.

청구범위

- [청구항 1] 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 LOC_Os01g50610 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 식물 형질 전환체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 LOC_Os01g50610 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 메틸전이효소로 코딩되는 것인, 식물 형질 전환체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 식물은 벼 (*Oryza sp.*)인 것인, 식물 형질 전환체.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 벼 (*Oryza sp.*)는 동진벼인 식물 형질 전환체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 활성 강화는 LOC_Os01g50610 유전자의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열 또는 프로모터를 삽입하여 이루어지는 것인, 식물 형질 전환체.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 발현 유도 서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것인, 식물 형질 전환체.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 식물 형질 전환체는 흰잎 마름병에 대한 저항성을 갖는 것인, 식물 형질 전환체.
- [청구항 9] 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 LOC_Os01g50610 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 LOC_Os01g50610 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 메틸전이효소로 코딩되는 것인, 재조합 벡터.
- [청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 발현 유도 서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.
- [청구항 13] 제9항에 있어서, 상기 식물은 벼 (*Oryza sp.*)인 것인, 재조합 벡터.
- [청구항 14] 제9항에 있어서, 상기 병 저항성은 흰잎 마름병에 대한 저항성인 것인, 재조합 벡터.
- [청구항 15] (a) 제9항 내지 제14항 중 어느 한 항의 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 식물을 감염시키는 단계; 및
(b) 상기 (a) 단계에서 감염된 식물의 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 식물의 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, (c) 상기 (b) 단계에서 제조한 캘러스를 뿌리 및

- 성체로 분화 유도하는 단계를 추가로 포함하는, 제조방법.
- [청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 식물은 벼 (*Oryza sp.*)인 것인, 제조방법.
- [청구항 18] 제15항에 있어서, 상기 병 저항성은 흰잎 마름병에 대한 저항성인 것인, 제조방법.
- [청구항 19] 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법.

[Fig. 1]

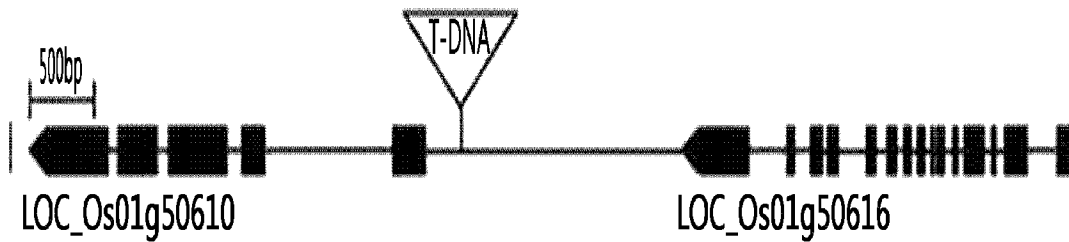
A

SAMT 01
(LOC_Os01g50610)

**B**

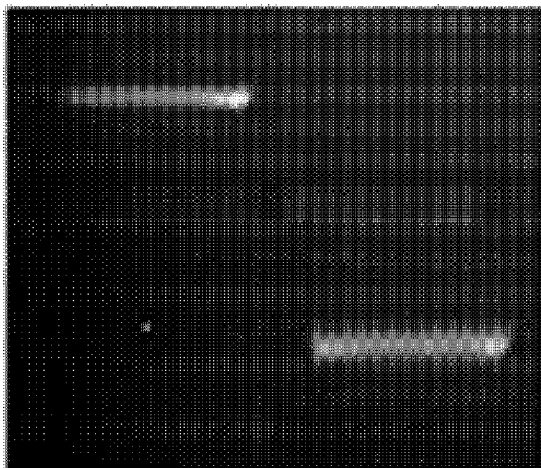
[Fig. 2]

SAMT 01 유전자 변형 벡터도면
(LOC_Os01g50610)



[Fig. 3]

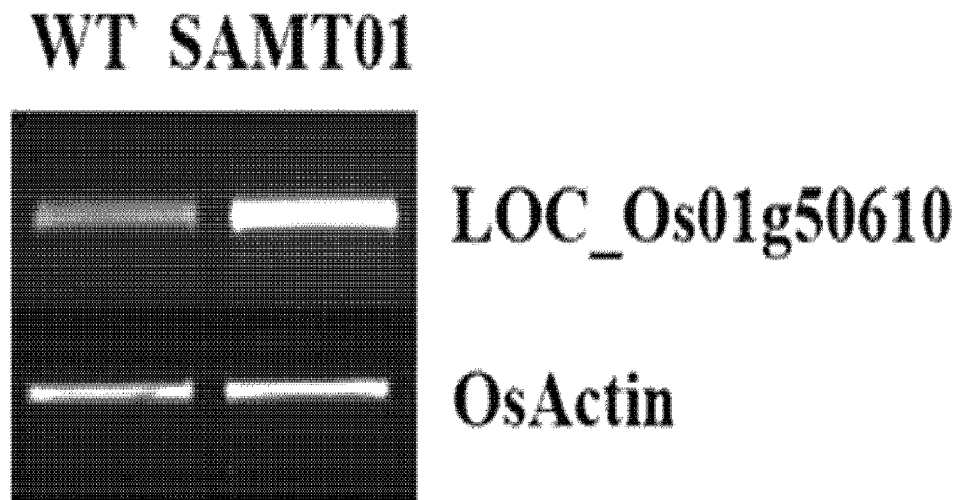
WT SAMT01



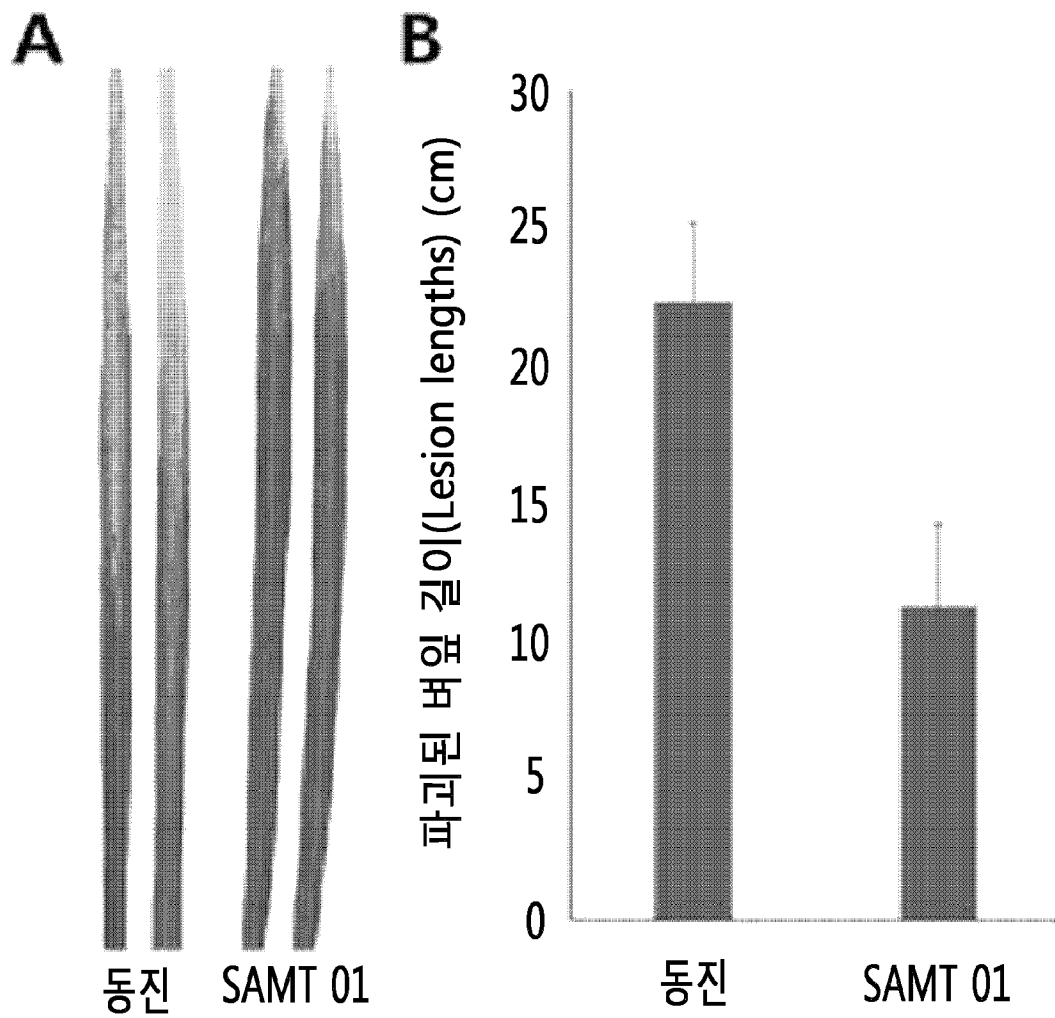
F+R

F+iR2

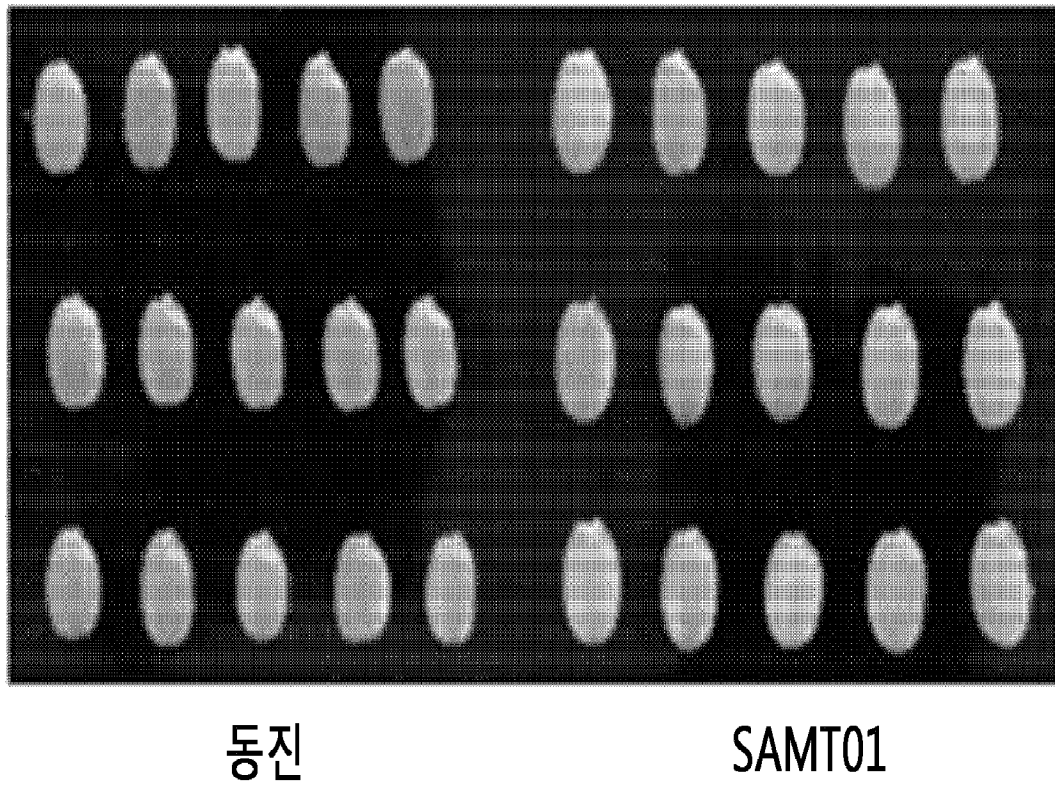
[Fig. 4]



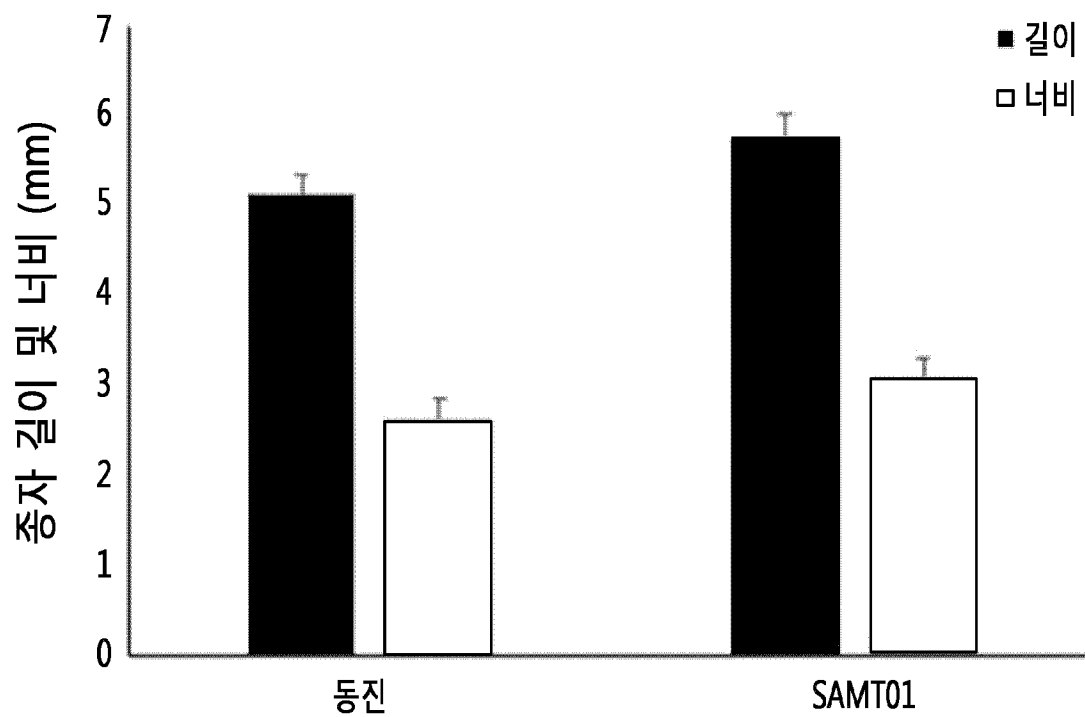
[Fig. 5]



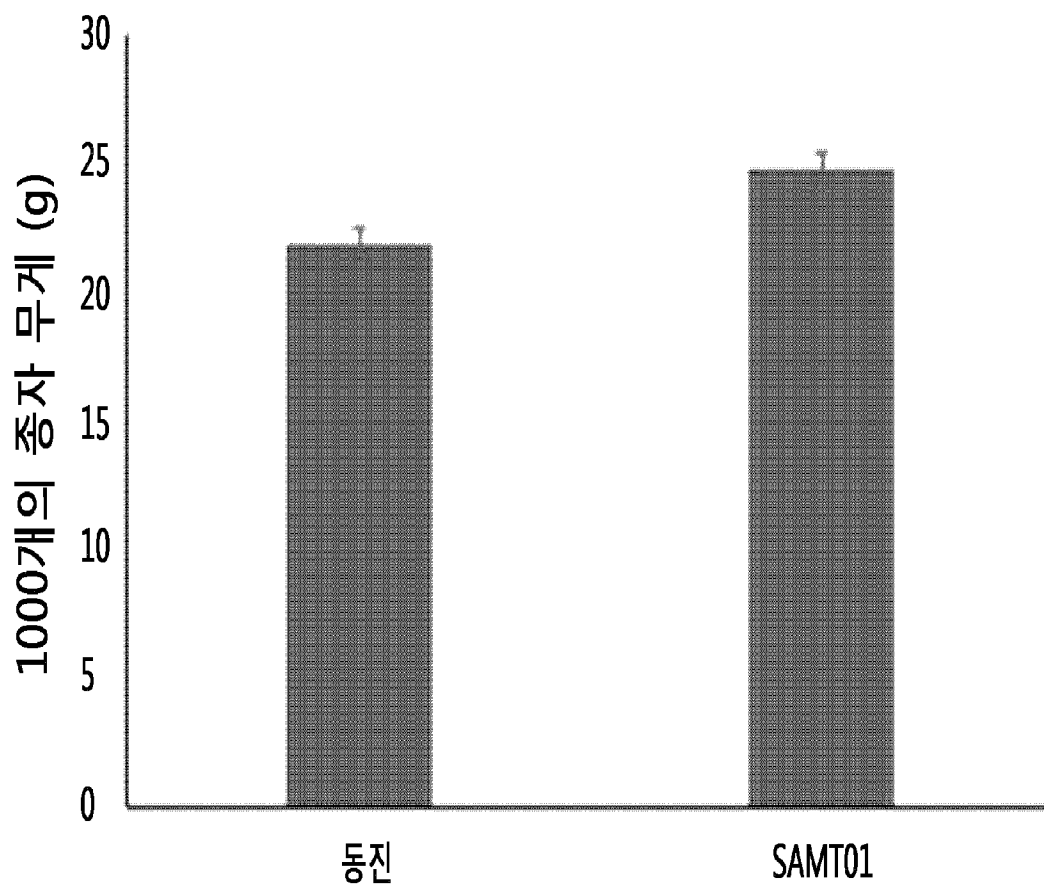
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/011404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 5/00(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C12N 15/82(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)

A01H 5/00; C12N 9/10; C12N 15/54; C12N 15/82

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: methyltransferase, leaf blight, expression control, disease resistance

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JEONG, Dong - Hoon et al., "Generation of a Flanking Sequence-Tag Database For Activation-Tagging Lines in Japonica Rice", The Plant Journal, 2006, vol. 45, no. 1, pages 123-132 See abstract; page 130.	1-8
A		9-19
A	NCBI, NCBI Reference Sequence: NM_001050525.1 (08 June 2010) See the entire document.	1-19
A	KR 10-2007-0105559 A (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP.) 31 October 2007 See abstract; claims 1, 5, 7, 9.	1-19
A	US 2013-0109075 A1 (UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION) 02 May 2013 See the entire document.	1-19
A	KR 10-2007-0105561 A (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP.) 31 October 2007 See abstract.	1-19
A	KIM, Yun - Soo et al., "Transgenic Tobacco Plants Producing Caffeine: A Potential New Strategy For Insect Pest Control", Transgenic Research, 2006, vol. 15, no. 6, pages 667-672 See abstract.	1-19



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

09 MARCH 2016 (09.03.2016)

Date of mailing of the international search report

17 MARCH 2016 (17.03.2016)

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

International application No.

PCT/KR2015/011404

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZUBIETA, Chloe et al., "Structural Basis For Substrate Recognition In The Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase Family", The Plant Cell, 2003, vol. 15, no. 8, pages 1704-1716 See abstract.	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/011404

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2007-0105559 A	31/10/2007	KR 10-0782072 B1	04/12/2007
US 2013-0109075 A1	02/05/2013	CA 2751522 A1	12/08/2010
		CN 102365016 A	29/02/2012
		EP 2393350 A2	14/12/2011
		EP 2393350 A4	04/07/2012
		US 2010-0205696 A1	12/08/2010
		US 8404933 B2	26/03/2013
		WO 2010-091353 A2	12/08/2010
		WO 2010-091353 A3	25/11/2010
KR 10-2007-0105561 A	31/10/2007	KR 10-0782084 B1	04/12/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01H 5/00(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C12N 15/82(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01H 5/00; C12N 9/10; C12N 15/54; C12N 15/82

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: 메틸전이효소, 흰잎 마름병, 발현 조절, 병 저항성

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JEONG, DONG-HOON 등, 'Generation of a flanking sequence-tag database for activation-tagging lines in japonica rice', The Plant Journal, 2006, 45권, 1호, 페이지 123-132 요약; 페이지 130 참조.	1-8
A		9-19
A	NCBI, NCBI Reference Sequence: NM_001050525.1 (2010.06.08.) 전체 문헌 참조.	1-19
A	KR 10-2007-0105559 A (건국대학교 산학협력단) 2007.10.31. 요약; 청구항 제1, 5, 7, 9항 참조.	1-19
A	US 2013-0109075 A1 (UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION) 2013.05.02. 전체 문헌 참조.	1-19
A	KR 10-2007-0105561 A (건국대학교 산학협력단) 2007.10.31. 요약 참조.	1-19
A	KIM, YUN-SOO 등, 'Transgenic tobacco plants producing caffeine: a potential new strategy for insect pest control', Transgenic Research, 2006, 15권, 6호, 페이지 667-672 요약 참조.	1-19

☒ 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 03월 09일 (09.03.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 03월 17일 (17.03.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

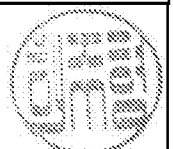
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	ZUBIETA, CHLOE 등, 'Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family', The Plant Cell, 2003, 15권, 8호, 페이지 1704-1716 요약 참조.	1-19

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

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

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2007-0105559 A	2007/10/31	KR 10-0782072 B1	2007/12/04
US 2013-0109075 A1	2013/05/02	CA 2751522 A1	2010/08/12
		CN 102365016 A	2012/02/29
		EP 2393350 A2	2011/12/14
		EP 2393350 A4	2012/07/04
		US 2010-0205696 A1	2010/08/12
		US 8404933 B2	2013/03/26
		WO 2010-091353 A2	2010/08/12
		WO 2010-091353 A3	2010/11/25
KR 10-2007-0105561 A	2007/10/31	KR 10-0782084 B1	2007/12/04