



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0056586
(43) 공개일자 2022년05월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 1/06 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)
A01H 6/46 (2018.01) *C12N 15/82* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01H 1/06 (2021.01)
A01H 5/10 (2022.05)

(21) 출원번호 10-2020-0141297

(22) 출원일자 2020년10월28일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

윤진미

경기도 수원시 영통구 청명남로4번길 21-4 102호 (영통동)

안진홍

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

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 12 항

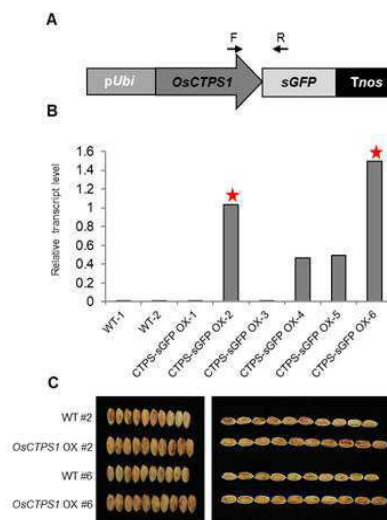
(54) 발명의 명칭 **OsCTPS1 유전자를 이용하여 식물체의 생산성을 증가시키는 방법**

(57) 요약

본 발명은 OsCTPS1 유전자를 이용하여 식물체의 생산성을 증가시키는 방법에 관한 것으로, 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 제제를 포함하는 식물체의 생산성 또는 종자 발달 촉진용 증가용 조성물, 생산성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법, 상기 제조방법에 의해 제조된 생산성이 증가된 형질전환 식물체, 및 식물체의 생산성을 증가시키거나 종자 발달을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

LOC_0s01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 발현 증가를 이용한 본 발명에 따른 식물체의 생산성 증가용 조성물, 종자 발달 촉진용 조성물, 생산성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법 등은 식물체의 종자 발달을 촉진하여 생산성을 증가시킬 수 있으므로, 식물체의 생산성, 수확량 증대 및 재배에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A01H 6/4636 (2022.05)

C12N 15/8205 (2013.01)

C12N 15/8261 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395062815
과제번호	PJ013210012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명	생산성 증진 및 출수 시기 조절 벼 유전자 발굴 및 기능 검정
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020(OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 제제를 포함하는, 식물체의 생산성 증가용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제제는 상기 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 T-DNA 또는 cDNA를 포함하는 재조합 벡터인 것인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 cDNA는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 식물체는 벼(Oryza Sativa)인 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 생산성 증가는 식물체의 초기 종자 발달 촉진에 의한 것인, 조성물.

청구항 7

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 생산성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 단계는 제1항의 조성물을 식물체에 도입하여 수행하는 것인, 제조방법.

청구항 9

제7항의 제조방법에 의해 제조된 생산성이 증가된, 형질전환 식물체.

청구항 10

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물체의 생산성을 증가시키는 방법.

청구항 11

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물체의 종자 발달 촉진용 조성물.

청구항 12

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물체의 종자 발달을 촉진시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 OsCTPS1 유전자를 이용하여 식물체의 생산성을 증가시키는 방법에 관한 것으로, 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는 식물체의 생산성 또는 종자 발달 촉진용 증가용 조성물; 생산성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법; 상기 제조방법에 의해 제조된 생산성이 증가된 형질전환 식물체; 및 식물체의 생산성을 증가시키거나 종자 발달을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 벼는 옥수수, 보리, 밀과 함께 전 세계적으로도 주요한 식량 자원임에 따라, 이의 생산성을 증대시키기 위한 관련 연구가 계속해서 진행되어 왔다. 그러나, 생산 지역에 따라 기후가 전혀 다르고, 지구 온난화 등의 등의 환경 변화가 급격히 이루어지고 있어, 더 높은 생산성을 갖도록 하기 위하여 품종 개량에 대한 지속적인 연구와 개발 등은 여전히 필요하다. 이에, 기존에 사용하던 육종 방법과 더불어, 유용한 유전자의 기능을 분석하고 이를 도입 또는 결실시킴으로써 재배 환경에 더 적합한 벼 품종을 개발하는 연구가 꾸준히 수행되고 있다.

[0004] 벼에서 endosperm 발달은 굉장히 중요하지만, 이에 대한 연구는 아직 많이 진행되어 있지 않다. 증복수정 직후 60시간 이내에 endosperm 핵분열이 일어나는데, 이 시기에 4,000-8,000 endosperm 핵이 발달하게 된다. 이 시기 급격한 핵분열을 조절하는 기작에 OsCTPS1이 기능을 할 것으로 연구 중이며, 상기 유전자의 과발현시 초기 endosperm 핵 분열을 촉진하여 종자의 크기를 증가시키고, 수확량을 증대하는 것으로 관찰되었다.

[0005] 본 발명자들은 벼의 초기 종자 발달 시 핵분열을 촉진하고 생산성을 증가시킬 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력 연구한 결과, LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자가 벼의 종자 발달을 조절하는 기능을 나타내며, 상기 유전자의 발현이 증가된 형질전환 벼의 경우 종자 발달이 촉진되어 종자의 크기가 증가하고 결국 생산성이 증가될 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물체의 생산성 증가용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 생산성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는 것이다.

- [0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 제조방법에 의해 제조된 생산성이 증가된, 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물체의 생산성을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 체제를 포함하는, 식물체의 종자 발달 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물체의 종자 발달을 촉진시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0016] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 체제를 포함하는, 식물체의 생산성 증가용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 다른 하나의 양태는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 생산성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 제조방법에 의해 제조된 생산성이 증가된, 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물체의 생산성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 체제를 포함하는, 식물체의 종자 발달 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물체의 종자 발달을 촉진시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0023] LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 발현 증가를 이용한 본 발명에 따른 식물체의 생산성 증가용 조성물, 종자 발달 촉진용 조성물, 생산성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법 등은 식물체의 종자 발달을 촉진하여 생산성을 증가시킬 수 있으므로, 식물체의 생산성, 수확량 증대 및 재배에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자가 변이된 벼의 종자 발달 저해 표현형을 나타낸 것이다(A: 수확 후 *enl2-1* 돌연변이 표현형, B: 야생형과 *enl2-1* 돌연변이의 건조한 종자 형태, C: 야생형과 *enl2-1* 돌연변이의 건조한 종자형태, D: 수확 후 10일이 지난 야생형 및 *enl2-1* 돌연변이 종자의 Longitudinal sectioning 을 통한 종자 내부 형태 관찰, E 및 F: LOC_Os01g43020 유전자의 염색체상 위치에 관한 모식도, G: LOC_Os01g43020 유전

자 변이에 관한 모식도).

도 2는 CRISPR/Cas9 system을 이용하여 제작한 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 돌연변이에서 나타나는 변이체의 염기서열(A) 및 종자 발달 저해 표현형(B)을 나타낸 것이다.

도 3는 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자 과발현체의 제작을 위한 유전자 모식도(A), 발현 정도(B) 및 종자의 크기가 증가한 표현형(C)을 나타낸 것이다.

도 4은 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자 과발현체의 종자의 길이, 폭, 두께 및 100립 중을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

실시예 1. 종자발달 초기 영향을 주는 유전자 선발

벼의 초기 종자 발달에 관여하는 유전자들을 이용하여 벼의 종자의 생산성을 증가시키는 것을 목적으로 초기 종자발달에 크게 영향을 주는 유전자를 선발하였다. 이 과정에서 초기 종자 발달 과정에서부터 문제가 있는 돌연변이를 선발하고, map-based cloning 과정을 통해 최종으로 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 돌연변이가 나타날 경우 벼의 초기 종자발달이 크게 문제가 있음을 알 수 있었다. Map-based cloning 시 사용한 primer들은 아래 표 1에 나타내었다.

표 1

Marker	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Marker type
R1M30	AAGGGGCCCTAATTATCTAG	TGTTTACTTTGTTCTTGGACTG	InDel
R1M37	ATAGTTCCGCATCGTCAT	ACACGCCATAGCAAGGAA	InDel
RM9	GGTGCCATGTGCGTCCTC	ACGGCCCTCATCACCTTC	InDel
RM306	CAAGGTCAAGAATGCAATGG	GCCACTTTAATCATTGCATC	InDel
CBI 3	GAATGCAACGGCGAGTGGA	GGGCTTTCGAGCGATTTCGT	InDel
CBI 4	ACATGCACTACTGGTGAACA	TGGAAGTGGATCGATCCAT	InDel
CBI 11	CTGGGTTGAGCTATCTCAC	GCGAGAAGGCGGATAATGG	InDel
CBI 12	TCTTCCAACGAGAGTATACTA	GTGAACCCAGTAATAAGAGGT	InDel
CBI 17	CAGAAGAGTCAAACATATGTC	AGGGTGACTTCTGAAAGACA	InDel
CBI 19	GCAATTTGCAAACATTACACTTG	CCAGTCTACATAGAATATATAGG	InDel
CBI 20	TTCCCATACCAATGTACCTAAT	TGTCCGAGCTATAGGTGATAA	InDel
CBI 27	CTGGATTGCCATAACAATGTG	CAGCAGTTCAGAGATCAGGT	InDel
CBI 28	CTTCTTCTCGGTGAGAACCA	GTATGTATATAGAGGTCCGATC	InDel
S4296	TTCAGCCATCTCCACTCTCT	TGGAGTGGCAATCTTCCAGT	SNP, sequencing of PCR product
S9697	CTGATTCTGGGGCTATGTAG	AACGGAGTCAATGCCTCACA	SNP, sequencing of PCR product
S4297A	TACTCTTGCTGGCCTACCAA	TCTCTTCTCAGTCCCTGAA	SNP, sequencing of PCR product
S4297B	GCTAAGCCAAGTTGGTACTC	CAAAGAACCTGCGACAACGT	SNP, sequencing of PCR product
01g43020-F2R2	TCGCACGAGCAAGCTCCTG	CTGAACAGTCTTTCCCAAGT	FNP, sequencing of PCR product

이 유전자에서 일어난 돌연변이로 인해서 종자발달 저해 표현형이 나타난 것인지 알기 위해 CRISPR/Cas9 system을 이용한 형질전환체를 제작하여 종자발달 저해 표현형을 관찰하였다. 벡터제작을 위해 pGREB32 CRISPR/Cas9 vector를 사용했으며, gRNA target 부위 제작을 위한 primer는 아래 표 2와 같다.

표 2

Name	Sequence (5'-3')	서열번호
OsCTPS1 CRISPR_F	GGCACCTTACCTTAACACAGATGC	서열번호 4
OsCTPS1 CRISPR_R	AAACGCATCTGTGTTAAGGTAAGG	서열번호 5

형질전환체 제작 후 나타난 종자 발달 저해 표현형은 도 2에 나타내었다.

실시예 2. LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 종자발달 촉진 효과 확인

상기 실시예 1을 통해 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자는 초기 종자 발달에 중요한 역할을 할 것으로 예상하고, 이 유전자의 과발현체에서 반대로 종자발달을 촉진할 수 있는지에 대해 확인하고자 하였다.

LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자가 과발현된 형질전환 벼를 제조하기 위하여, 먼저 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자를 클로닝하였다. LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자의 cDNA를 주형으로 하여 프라이머 (OsCTPS1_FL_BsiWI_F: 5'-CGCGTACGATGAAGTACGTGCTGGTGAC-3'; OsCTPS1_FL_SpeI_R: 5'-CGACTAGTGGCATGCACGCCATTTCAT-3') 를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 T-easy 벡터(서브 클로닝용 벡터)에 클로닝하여 염기서열을 해독하였으며, 클로닝한 DNA를 pGA3427 벡터(과발현용 벡터)와 연결하였고, 상기 pGA3427 벡터를 대장균 컴피턴트 셀(competent cell)에 도입하였다. 이어서, 상기 대장균을 테트라사이클린(tetracycline) 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 배양하여, 콜로니를 생성하였다. 상기 콜로니에 대하여 미넵프랩을 수행하여 클로닝 DNA를 수득하였고, 이의 염기서열을 분석하여 오류가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다.

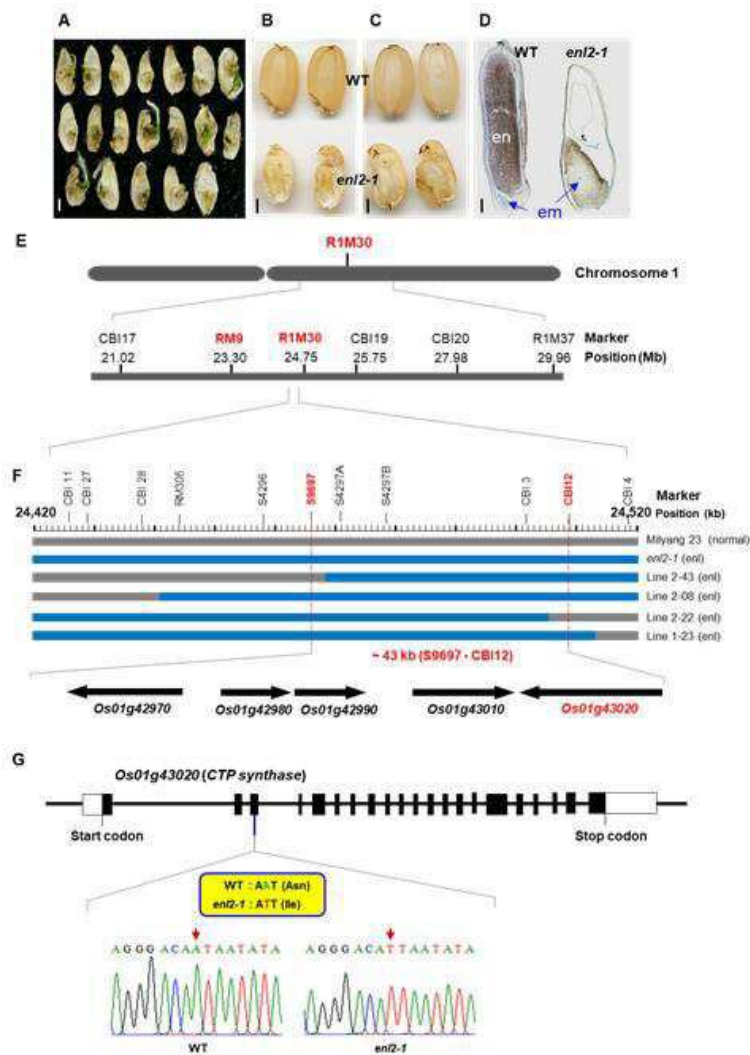
최종적으로 선별한 DNA는 아그로박테리움 투마파시엔스(Agrobacterium tumefaciens LB4404)에 형질전환하였다. 구체적으로, 아그로박테리움 컴피턴트 세포(competent cell)와 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 방치하였다. 이어서, 액체질소에 1분 동안 넣은 후, 37℃ 오븐에 5분 동안 방치하는 과정을 3회 반복하였으며, 1 ml의 YEP 액체 배지를 넣은 다음 5시간 동안 28℃ 세이킹 인큐베이터에 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 YEP 고체 배지에 도말하고 생성되는 콜로니를 테트라사이클린 항생제가 포함된 YEP 액체 배지에서 배양하였고, DNA를 추출하여 제한효소로 절단한 후, 사이즈를 확인함으로써 아그로박테리움에 상기 DNA가 도입되었음을 확인하였다. 전술한 방법으로 제작한 형질전환 아그로박테리움을 이용하여 당업계에 알려진 방법으로 LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자가 과발현된 형질전환 벼(#OX2 및 #OX6)를 제조하였고, 이들의 표현형을 관찰하였다.

그 결과, 도 3과 도4에서 볼 수 있듯이, LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자가 과발현된 형질전환 벼는 야생형 벼에 비하여 종자의 크기가 증가하고 낱알(이삭)의 크기 및 100립중(100 grain weight)이 현저히 증가된 것을 확인하였다. 상기 결과를 통해, LOC_Os01g43020 (OsCTPS1) 유전자는 벼의 초기 종자 발달을 조절하는 기능을 수행하며, 상기 유전자의 발현이 증가된 벼의 경우 종자 발달이 촉진되어 생산성이 증가됨을 알 수 있었다.

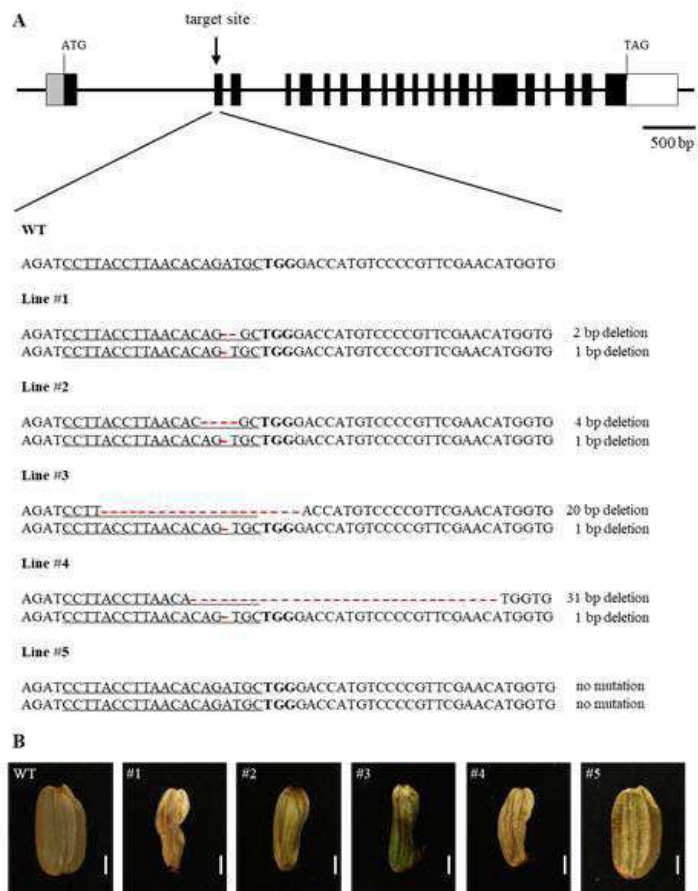
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

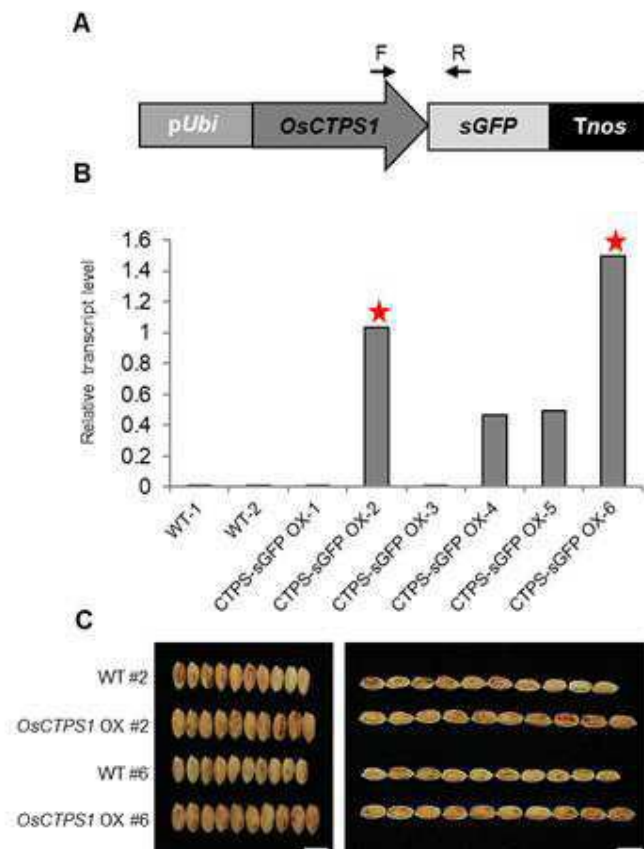
도면1



도면2



도면3



도면4

Traits		100-grain weight (g)	length (mm)	width (mm)	thickness (mm)
Line #2	WT	2.31 ± 0.04 (100.00%)	6.84 ± 0.23 (100.00%)	3.11 ± 0.08 (100.00%)	2.13 ± 0.15 (100.00%)
	OX	2.80 ± 0.02 (121.21%)	7.34 ± 0.23 (107.31%)	3.33 ± 0.07 (107.07%)	2.30 ± 0.10 (107.98%)
Line #6	WT	2.34 ± 0.02 (100.00%)	6.81 ± 0.27 (100.00%)	3.15 ± 0.05 (100.00%)	2.11 ± 0.10 (100.00%)
	OX	2.87 ± 0.03 (122.65%)	7.30 ± 0.25 (107.20%)	3.50 ± 0.13 (111.11%)	2.30 ± 0.08 (109.00%)

서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A method for increasing plant productivity using OsCTPS1 gene
- <130> KPA201327-KR
- <160> 5
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 6066

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> LOC_Os01g43020 (OsCTPS1)gene genomic DNA sequence

<400> 1

ctctccctt cctctctccc ctgtcgaga ggcggtgcg cggcgcgccc tctctctct	60
cccccaaaa cctctctct cctctctct cgggctgcgc ggcgcgctc gactccggag	120
ggattcagg ggaagaaggt tcgccgcgcg tggctctctc tctctctctc tctcccggg	180
gcgcgagatg aagtacgtgc tggtagccgg cggggtggtg agcgggctcg ggaaggcgt	240
cacggcgagc agcatcggcg tcgtcctcaa gtcgtgcggg ctccgatta cctccatcaa	300
gacggtagc tgccccgcg ggaatccgc ccccccccc cccccccga gattcgggtg	360
atcttcggg ggaggggagg agggggtctg agaggtcgat ccggcgggc ggcaggggc	420
ggaagattt ggctttcgag cgattcgtgc gggcgtgagg ggtgtgggtg gggagtaggt	480
gcaggggaga ctgagattca ttggttgggt ttggtgaaaa ctgaaaagta cctctttga	540
accttccact cgccttgca ttctgtttcg gccccgttg taggggtttt agggctcggc	600
cgtaggtctg aagggagaag gaatggatgt gatgtcgatt agcttgttga aatctgtct	660
cgttcgggt gtgagaggca gattcgtgat tgcctttttg attgagttct cttactgcc	720
aacagagaga gctttgtcac ctattctaaa gattacacta cggattaatg gcatacatgt	780
acatgtacat gtccccgtgt ttgcacttag aagacgataa gttgatatgc cctccgtgt	840
ttactttag aaggataatc ttttcagggg ggttttctgc tgattttttt gtctgtgtgt	900
gatttgggt tcatctgctt gtaataaggt agaggtctga agtctgaaga aatggtgtgc	960
cccatgcagg attgggtcta atgttatact agcttctgac ttttatactt tactggttta	1020
cacgtttacc tgtggcatct attggcctaa aggggttaac ctcatggtac ctgttaatat	1080
ttgtgaaagt cgcacgagca agctcctgat acttggcaac atatgcttta attggatgtg	1140
ttatactttg ctataaglat catgtttaga ttagactgac tgctactcct tctgtgtgtg	1200
ccatgaaaac aaggtagctg gaaaagacta ggttttcct cccatccttg tctatcagat	1260
gcctttaga gggatagcaa atgctaattt agatatccgc tgctgtgaat gatgatttag	1320
atatcatttc tcaaaccata ggatgccacc ttagcacatt ggaatctttg acttaattca	1380
acgttatgtt acgtgggttg ttttctctgt gtttttctta tccaatatca cctaaacct	1440
gctttgtttt tgctgttga gccttctgac ttttgtactg ttgctgact tggctttacc	1500
ttgtgccttg tagaaattgt ggcggaagc cagctaatac ttgctcaaat gctctagtgt	1560

ctttcttttg tcttcttgag gttgacatgt tctctttgca ttttctgaat gtgcagatcc	1620
ttaccttaac acagatgctg ggaccatgtc cccgttcgaa catggtgagg tttttgtgct	1680
tgatgatggt ggcgaggtat tgagatgtgg ccaaatcaga ttttactagg attagcacat	1740
ttttacttat ctcaaggagt gttgtcgttt tcatcttgca ggtggacttg gatcttggga	1800
attacgagag gtttcttgac attaaactaa ccagggacaa taatataacc acaggaaaga	1860
tctaccaggt aaacaaatta gtttctctc ttaaaagctt aatttacatg gtcttttgtt	1920
ttatatattgg cacttctaata atatccaatt taaagtctca tacttaattc tctttataaa	1980
ttctaagagc ttggaaatat tgctatttta cggcattctt tggatataca acattcagaa	2040
taattttaaa ttggttcaat tgatgtcgac gttactatat ttacatagg aaggaaaatg	2100
atgccattgt tgccttatgt gacttgatga ttgtattaag ggctcaggcg aactttttta	2160
accaccagga tatacaagat taatatcgtg tcaaatatgt gacatcgtaa atacagttgc	2220
tgctccctgc ataacaaact gctttgactt ttttctgaca cttatttttg cttttctata	2280
tgttcaatga cagtcctgtc ttgaaaagga aaggaagggg gaatacttgg gaaagactgt	2340
tcagggtgtg ttcatattgat gtgaacttat ctctgtctgt cctagtaacc tctgcatgta	2400
tgtttctttt cgttctgac attcaatgat tctttctcaa ggttgtccg catatcacia	2460
atgccataca agagtggatt gagcgtgtcg caatggtacc tgtagatggc aaggaggagc	2520
cagctgatgt ttgtgtgata gaacttgggg gtactatagg tgagcatgag ataattagtt	2580
ttattttatt ttattttggg tgtagttgt cctaatagaa aatttagaac tggtttcttg	2640
tagcttgatt gtgtgtttac tctgcaggg gatattgaat ctatgccatt tatcgaagct	2700
ttgggccaat tcicatatcg tgttggtgag gaccttgac agttacatgc atactaaata	2760
tactgtgctc accttttgc atgtagctgg tattataatc tcttgttgga cattactttg	2820
gctgtcaggt cctggttaact tttgtttggt gcatgttagt cttgttccag ttctgaatgt	2880
tgttggtgaa caggtaccac actgttgatt catttattat gttgtactgt ttattaatcc	2940
atcttatggc ttttatggc ttattttggg aagttggtgc agtcgaata catttgacaa	3000
tttctctac atctatgcta ttactcttg tagaaaacta agccgactca acatagtgtc	3060
cgtggattaa ggggtcttgg gctcacacca aatattttag cctgtcgcag tactaagggt	3120
agctgaaaat ttcatattac ctttattctg tatcttggta gtccctgaat cttttcttaa	3180
gactaaattt ctigaactgc aatattattt atcaggaact ggaagaaaat gtgaaggaga	3240
aactctctca gttctgcat gtaccggtaa tgtactgtaa acttatgttg tcaggattga	3300
tcaataagct ttggcagcta aaactgctcc tgttagctca ttatttatgg gcattctgca	3360
ggcagctaac attgtcactc tgtatgatgt ttccaacatt tggcgtattc ctttgttgct	3420

acgggtacgt cacatctctc ttttccccct tacaaaaaaa ttcttttttg gcgtatccca	3480
catcctgttt taacagtga tatctcattt ctgccattta ggacaaaaag gcacatgaag	3540
ccattcttaa agtgcgaac cttgataggt ttgtcgatat atctagtcac ttaaattttc	3600
cccaacctat attatttgtt attgaggcag ttgatgcgat tggatattta ttataaaact	3660
tgcagctttg ctcgggggcc aaagtggat gaatgggtcg caagagctac gttatttgat	3720
gcacttcagg atactgttag tttttctta cttcaatttt cccatttggt ctttttattc	3780
ttagttccca ttgactaatg ctctcatttc aggtgaggat tgctatggtt gggaagtata	3840
ctggtctatc tgattcatac ctctctgtgt tgaaggtag ctagattacc atggtgataa	3900
tatgcttgta ttttataaat ttgacagttg ttttctaata tctgagtgtg ctgcgtaata	3960
tgtgtaggca ctcttgcag cttctgttga ttgccgcagg aagcttcttg ttgattgggt	4020
tgcttctact gatctcgaag actccactgc cattgagggt aggcagtagc agcataattc	4080
aaaccaatth gagctgtttt cttttcttaa tcattccttg ctaaatttct aggcgcctga	4140
tgcttataaa gcagcatggg atttactgaa ggtaaggttt tttttaaatt attttggcgt	4200
tttgaaaaac ttgtaatgct gttgcataata tgagttataa tggataaatt attgcctgtc	4260
atggttttat gaacggttgt catctcaggg tgccaatggt gtttttagtac ctggtggctt	4320
tggagataga ggtattcaag ggaagattht ggctgccaag tatgcccgtg aaaacaatgt	4380
accatatctt ggcatatgcc ttggaatgca acttgctgtg gttgaatttg ctgaagtgt	4440
catgaatctc cctgaagcaa acagcacaga atttgatccc aatgccaaga ccccatgtgt	4500
tatttttatg cctgaggtaa ttattttggg aacctctttg aatttaaagt caacttccca	4560
ctgccttccc ttgaattaaa tctttatgia tgttaactca gggttctaaa acacatatgg	4620
gtggcacgat gcgcctagga tcaaggagga cttttttcga ggttgctgat tgcaagtctg	4680
ctaaattgtg agtgcacata taggcctttc tgcataacca ttatggcccc agtgcttaag	4740
agtccttgcg atttgttga tcccctgaaa taattgtgtt ctgctgtagg tatggcaatg	4800
tcagtatatgt agatgagagg catcggcaca gatatgaggt ctgttgatca catttgtgtc	4860
gttcatagat gtacatctaa atgctatgaa atgttccatg tattgtatgg tctttaagct	4920
cttataagtt tcgatttatt tgcttcttgt aacatggact gaaacatcta caacttcaca	4980
ggtgaatcca gatatgggtc cagagtttga aaatgctgga cttcagtttg ttgggaaaga	5040
tgagactgga aggagaatgg aggttcgact aaaactgaga cttgcttaaa ttttttcct	5100
tttttgccac tgttacctct tgacagattt gctatttcta gataattgaa atccccaatc	5160

accgatattt tgttgggtgca caattccatc ctgaattcaa gtcaagacct tcaaaaccgt 5220

ctccactctt tgtcggtaag atgccaaata atattctgct tgtagtttgg ttcagtatgc 5280

ttgttcacga acctttttaa ttgtactttg tgttgtaaag tgtaaacaca agctttcgaa 5340

actacatgtt aatcatcact acacttttgc aggactaatt gctgcctcat ctgggcaact 5400

ggatagattg ctgcaaggca gctgcaatgg ccacgtgggt tctactaaac attctctgag 5460

caatgggtgt tacacatcta cagtacacca aaatgggcac gcaaagaagc ttgccaatgg 5520

tctttccaat ggaacatatt atccaatgg aaatggcgtg catgcctagt tcttcagtag 5580

gtggcctaag gatttacaca ttcccttttt gctgtttcta ttgaattgca tcagttttgt 5640

cgtaggctggc ctcgtaatac tttggctcgt cgaggaagaa aaaatgttct tgtgctcgat 5700

gcggactgtg cgaaggatgg tgctcgttcg gtgggttttt gaaggaaccg ggctgaatct 5760

cattgaaggt gtgagattgt gggttgcgtg ttgcctccta cctttttctg taagccaagg 5820

ggggcagaag tgggtaagaa gagttctcat gctgtatata tggaagaaa agaaatgctg 5880

gatgtttttg ttctttttgc ttgataaatg ctgcgctgga acagaggata ttgatgttag 5940

gcagtttgta ctttggcagt tttgtgcttt tgcaaacaag ttaaactgtt ttgcattac 6000

tgtaccagat tgctgcca ttttgcgtga ttattctcat aatactggat attctgaaac 6060

ttgctc 6066

<210> 2

<211> 605

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> LOC_Os01g43020 (OsCTPS1)gene amino acid sequence

<400> 2

Met Lys Tyr Val Leu Val Thr Gly Gly Val Val Ser Gly Leu Gly Lys

1 5 10 15

Gly Val Thr Ala Ser Ser Ile Gly Val Val Leu Lys Ser Cys Gly Leu

20 25 30

Arg Ile Thr Ser Ile Lys Ile Asp Pro Tyr Leu Asn Thr Asp Ala Gly

35 40 45

Thr Met Ser Pro Phe Glu His Gly Glu Val Phe Val Leu Asp Asp Gly

50 55 60

Gly Glu Val Asp Leu Asp Leu Gly Asn Tyr Glu Arg Phe Leu Asp Ile

65	70	75	80
Lys Leu Thr Arg Asp Asn Asn Ile Thr Thr Gly Lys Ile Tyr Gln Ser			
	85	90	95
Val Leu Glu Lys Glu Arg Lys Gly Glu Tyr Leu Gly Lys Thr Val Gln			
	100	105	110
Val Val Pro His Ile Thr Asn Ala Ile Gln Glu Trp Ile Glu Arg Val			
	115	120	125
Ala Met Val Pro Val Asp Gly Lys Glu Gly Pro Ala Asp Val Cys Val			
	130	135	140
Ile Glu Leu Gly Gly Thr Ile Gly Asp Ile Glu Ser Met Pro Phe Ile			
145	150	155	160
Glu Ala Leu Gly Gln Phe Ser Tyr Arg Val Gly Pro Gly Asn Phe Cys			
	165	170	175
Leu Val His Val Ser Leu Val Pro Val Leu Asn Val Val Gly Glu Gln			
	180	185	190
Lys Thr Lys Pro Thr Gln His Ser Val Arg Gly Leu Arg Gly Leu Gly			
	195	200	205
Leu Thr Pro Asn Ile Leu Ala Cys Arg Ser Thr Lys Glu Leu Glu Glu			
	210	215	220
Asn Val Lys Glu Lys Leu Ser Gln Phe Cys His Val Pro Ala Ala Asn			
225	230	235	240
Ile Val Thr Leu Tyr Asp Val Ser Asn Ile Trp Arg Ile Pro Leu Leu			
	245	250	255
Leu Arg Asp Gln Lys Ala His Glu Ala Ile Leu Lys Val Leu Asn Leu			
	260	265	270
Asp Ser Phe Ala Arg Gly Pro Lys Leu Asp Glu Trp Val Ala Arg Ala			
	275	280	285
Thr Leu Phe Asp Ala Leu Gln Asp Thr Val Arg Ile Ala Met Val Gly			
	290	295	300
Lys Tyr Thr Gly Leu Ser Asp Ser Tyr Leu Ser Val Leu Lys Ala Leu			
305	310	315	320

Leu His Ala Ser Val Asp Cys Arg Arg Lys Leu Leu Val Asp Trp Val

325 330 335

Ala Ser Thr Asp Leu Glu Asp Ser Thr Ala Ile Glu Ala Pro Asp Ala

340 345 350

Tyr Lys Ala Ala Trp Asp Leu Leu Lys Gly Ala Asn Gly Val Leu Val

355 360 365

Pro Gly Gly Phe Gly Asp Arg Gly Ile Gln Gly Lys Ile Leu Ala Ala

370 375 380

Lys Tyr Ala Arg Glu Asn Asn Val Pro Tyr Leu Gly Ile Cys Leu Gly

385 390 395 400

Met Gln Leu Ala Val Val Glu Phe Ala Arg Ser Val Met Asn Leu Pro

405 410 415

Glu Ala Asn Ser Thr Glu Phe Asp Pro Asn Ala Lys Thr Pro Cys Val

420 425 430

Ile Phe Met Pro Glu Gly Ser Lys Thr His Met Gly Gly Thr Met Arg

435 440 445

Leu Gly Ser Arg Arg Thr Phe Phe Glu Val Ala Asp Cys Lys Ser Ala

450 455 460

Lys Leu Tyr Gly Asn Val Ser Tyr Val Asp Glu Arg His Arg His Arg

465 470 475 480

Tyr Glu Val Asn Pro Asp Met Val Pro Glu Phe Glu Asn Ala Gly Leu

485 490 495

Gln Phe Val Gly Lys Asp Glu Thr Gly Arg Arg Met Glu Ile Ile Glu

500 505 510

Ile Pro Asn His Arg Tyr Phe Val Gly Ala Gln Phe His Pro Glu Phe

515 520 525

Lys Ser Arg Pro Ser Lys Pro Ser Pro Leu Phe Val Gly Leu Ile Ala

530 535 540

Ala Ser Ser Gly Gln Leu Asp Arg Leu Leu Gln Gly Ser Cys Asn Gly

545 550 555 560

His Val Val Ser Thr Lys His Ser Leu Ser Asn Gly Ala Tyr Thr Ser

565	570	575	
Thr Val His Gln Asn Gly His Ala Lys Lys Leu Ala Asn Gly Leu Ser			
580	585	590	
Asn Gly Thr Tyr Tyr Pro Asn Gly Asn Gly Val His Ala			
595	600	605	
<210>	3		
<211>	1818		
<212>	DNA		
<213>	Unknown		
<220><223>	LOC_Os01g43020 (OsCTPS1)gene CDS		
<400>	3		
atgaagtacg tgctggtgac cggcggggtg gtgagcgggc tcgggaaggg cgtcacggcg		60	
agcagcatcg gcgtcgtcct caagtcgtgc gggctccgca ttacctccat caagatcgat		120	
ccttacctta acacagatgc tgggaccatg tccccgttcg aacatggtga ggttttgtg		180	
cttgatgatg gtggcgaggt ggacttggat cttgggaatt acgagaggtt tcttgacatt		240	
aaactaacca gggacaataa tataaccaca ggaaagatct accagtccgt tcttgaaaag		300	
gaaaggaagg gggaatactt gggaaagact gttcaggttg tccgcatat cacaaatgcc		360	
atacaagagt ggattgagcg tgtcgcaatg gtacctgtag atggcaagga gggaccagct		420	
gatgtttgtg tgatagaact tgggggtact ataggggata ttgaatctat gccatttatac		480	
gaagctttgg gccaatcttc atatcgtgtt ggtcctggta acttttgttt ggtgcatgtt		540	
agtcttgttc cagttctgaa tgttgttggg gaacagaaaa ctaagccgac tcaacatagt		600	
gtccgtggat taaggggtct tgggctcaca ccaaatatct tagcctgtcg cagtactaag		660	
gaactggaag aaaatgtgaa ggagaaactc tctcagttct gccatgtacc ggcagctaac		720	
attgtcactc tgtatgatgt ttccaacatt tggcgtattc ctttgttgct acgggaccaa		780	
aaggcacatg aagccattct taaagtgtg aaccttgata gctttgctcg ggggccaaag		840	
ttggatgaat gggtcgcaag agctacgtta ttgatgcac ttcaggatac tgtgaggatt		900	
gctatggttg ggaagtatac tgggtctatct gattcatacc tctctgtgtt gaaggcactc		960	
ttgcatgctt ctgttgattg ccgcaggaag cttcttgttg attgggttgc ttctactgat		1020	
ctcgaagact ccaactgcat tgaggcgctt gatgcttata aagcagcatg ggatttactg		1080	
aagggtgcca atggtgtttt agtacctggg ggctttggag atagaggtat tcaagggaag		1140	
atgttggtg ccaagtatgc ccgtgaaaac aatgtacat atcttggcat atgccttgga		1200	

atgcaacttg ctgtggttga atttgctcga agtgtcatga atctccctga agcaaacagc 1260
acagaatttg atcccaatgc caagacccca tgtgttattt ttatgcctga gggttctaaa 1320
acacatatgg gtggcacgat ggccttagga tcaaggagga catttttcga ggttgctgat 1380
tgcaagtctg ctaaattgta tggcaatgic agttatgtag atgagaggca tcggcacaga 1440
tatgaggatga atccagatat ggtgccagag ttgaaaatg ctggacttca gtttgttggg 1500
aaagatgaga ctggaaggag aatggagata attgaaatcc ccaatcacg atattttgtt 1560
ggtgcacaat tccatcctga attcaagtca agaccttcaa aaccgtctcc actctttgtc 1620

ggactaattg ctgcctcatc tgggcaactg gatagattgc tgcaaggcag ctgcaatggc 1680
cacgtggttt ctactaaaca ttctctgagc aatgggtgctt acacatctac agtacaccaa 1740
aatgggcacg caaagaagct tgccaatggt ctttccaatg gaacatatta tccaatgga 1800
aatggcgtgc atgcctag 1818

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsCTPS1 CRISPR forward primer

<400> 4

ggcaccttac cttaacacag atgc 24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsCTPS1 CRISPR reverse primer

<400> 5

aaacgcatct gtgttaaggt aagg 24