



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0153244
(43) 공개일자 2023년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8247 (2013.01)
A01H 5/10 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2023-0021633
(22) 출원일자 2023년02월17일
심사청구일자 2023년02월17일
(30) 우선권주장
1020220052052 2022년04월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
김현욱
경기도 남양주시 별내5로 81, 3107동 802호(별내동, 남양주 별내 스위트 아파트)
도형주
서울특별시 서초구 태봉로2길 60, 310동 1303호(우면동, 서초네이처힐3단지)
김인영
서울특별시 성동구 동일로55길 10-5 (송정동)
(74) 대리인
특허법인리체

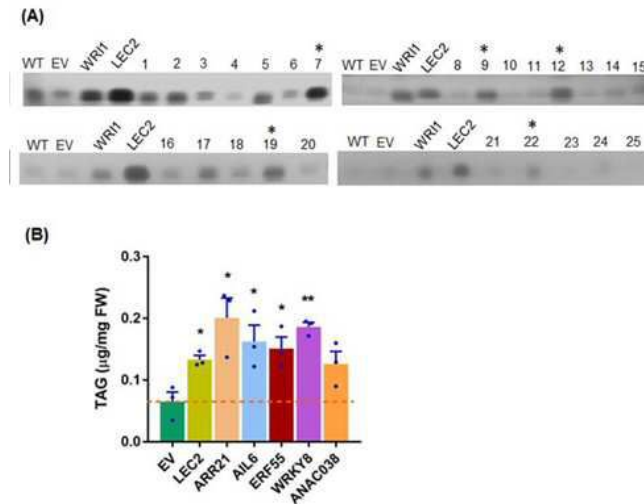
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 식물 종자의 지방 함량을 증가시키기 위한 조성물 및 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물 및 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법에 관한 것으로, 종자의 전반적인 발달 과정에 관여하는 마스터 전사인자인 LEC2의 하위전사인자 중 종자 지방 합성 과정에 관여하는 ARR21, A6-ERF/AP2, WRKY8 및 ANAC038의 발현을 증가시켜 보다 정확하게 식물 종자의 총 지방 함량을 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711146559
과제번호	2020R1A2C2008175
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	종자 지방산 대사를 조절하는 전사인자 발굴을 통한 오일 작물에서 기능성 지방산
생산 증진 연구	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395072190
과제번호	PJ016533012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대농작물신육종기술개발사업
연구과제명	유용소재 및 농업형질 개선 유전자교정 콩 개발 및 시장경쟁력 확보(1주관)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

ARR21(RESPONSE REGULATOR 21), A6-ERF/AP2(A6-ETHYLENE RESPONSIVE FACTORS/APETALA2), WRKY8(WRKY DNA-BINDING PROTEIN 8) 및 ANAC038(NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 38)로 이루어진 군에서 선택된 전사인자의 발현을 증가시키는 물질을 포함하는 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 식물은 애기장대, 유채, 카멜리나, 콩, 자트로파, 벼, 피마자, 옥수수를 포함하는 군에서 선택되는, 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 발현을 증가시키는 물질은 상기 전사인자를 코딩하는 유전자인, 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 유전자는 35S 프로모터 또는 베타-콩글리닌(β -conglycinin) 프로모터를 포함하는 운반체에 포함된 것인, 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 지방은 팔미트산, 팔미톨렌산, 스테아르산, 엘라이드산, 박센산, 올레산, 리놀레산, 리노엘라이드산, α -리놀레산, 아라키드산, 가돌레산, 에이코사디에노산 및 에루크산을 포함하는 군에서 선택되는 하나 이상의 지방산을 포함하는, 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 조성물을 식물체에 처리하는 단계를 포함하는, 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 식물은 애기장대, 유채, 카멜리나, 콩, 자트로파, 벼, 피마자, 옥수수를 포함하는 군에서 선택되는, 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 조성물이 처리된 식물체로부터 종자를 얻는 단계를 더 포함하는, 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 조성물은 상기 전사인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 것이고, 상기 유전자는 35S 프로모터 또는 베타-콩글라이신(β -conglycinin) 프로모터를 포함하는 운반체에 포함된 것인, 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 조성물은 상기 전사인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 것이고, 상기 식물체를 교배하여 상기 유전자가 과발현되고, 그 대립유전자가 동형접합자인 후세대 식물체를 선별하는 단계를 더 포함하는, 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전사인자 발현 조절을 통해 식물 종자의 지방 함량을 증가시키기 위한 조성물 및 이를 이용하여 지방 함량이 증가된 종자를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 식물은 유묘의 발달 및 성장에 필요한 탄소와 에너지의 주요한 원천으로서 TAG(triacylglycerol)를 종자 내에 축적한다. TAG는 글리세롤 백본(glycerol backbone)에 세 개의 지방산이 에스테르 결합한 형태로 존재하며 탄수화물이나 단백질과 같은 저장 물질보다 저장된 에너지가 약 두 배 가량 높은 것으로 알려져 있다. 이러한 TAG는 인간과 가축에 제공하기도 하고 화장품, 윤활유 그리고 바이오 디젤과 같은 다양한 산업적 응용이 가능한 공급원료로서 사용되기도 한다.

[0004] 식물성 오일은 다양한 산업 원료로 사용될 수 있지만 그 수요에 비해 전 세계적으로 생산되는 함량은 매우 부족한 실정이다. 이에 식물 종자 오일 함량을 증진시키기 위해 지방산 생합성 증진, TAG 생합성 증진 및 TAG 분해 억제와 같은 여러 방법들이 시도되고 있다. 그 중, 지방산 생합성을 증진시키기 위한 대표적인 사례로 지방산 생합성 초기에 관여하는 애기장대 SSU/ACC1 유전자를 과발현시킨 유채(*Brassica napus*) 종자에서 총 종자 오일 함량이 야생형 종자에 비해 5% 증가됨을 관찰하였다. 그리고 TAG 생합성 증진에 관여하는 카멜리나(*Camelina sativa*) DGAT1을 카멜리나에 과발현시켰을 때, 총 종자 오일 함량이 5~24% 증가한 보고가 있었다. TAG 분해 억제 사례로 퍼옥시좀 ABC 운반체(peroxisomal ABC transporter) 돌연변이체인 COMATOSE(cts2)에 애기장대 LEC2 유전자를 발현시킨 형질전환체의 TAG 함량은 비형질전환체에 비해 약 4배 증가됨을 관찰하였다. 이와 같이 다양한 방법으로 종자 오일 함량을 증가시키려는 시도들이 진행되고 있으며, 그 중 새로운 유전자를 발굴하는 것이 가장 중요한 과정으로 여겨지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제 2008-7017247호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 식물성 오일은 다양한 산업 원료로 사용될 수 있지만 그 수요에 비해 전 세계적으로 생산되는 함량은 매우 부족한 실정이다.
- [0008] 이에 식물 종자의 지방 함량을 증가시킬 수 있는 새로운 유전자를 발굴하는 것에 대한 연구가 진행되고 있다. 종자에서의 지방 합성 과정에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하면 야생형 종자에 비해 증가된 지방 함량을 관찰할 수 있다.
- [0009] 식물 종자의 발달 과정에 관여하는 LEC2(Leafy Cotyledon2)가 종자 지방 함량에도 관여하는 것이 밝혀진 바 있지만, LEC2가 조절하는 복잡한 하위 전사인자 네트워크에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 발명에서는 LEC2의 하위 전사인자들을 탐색하여 종자 지방 함량을 증가시키는 데에 관여하는 신규한 전사인자를 발굴하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 1. ARR21(RESPONSE REGULATOR 21), A6-ERF/AP2(A6-ETHYLENE RESPONSIVE FACTORS/APETALA2), WRKY8(WRKY DNA-BINDING PROTEIN 8) 및 ANAC038(NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 38)로 이루어진 군에서 선택된 전사인자의 발현을 증가시키는 물질을 포함하는 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물.
- [0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 식물은 애기장대, 유채, 카멜리나, 콩, 자트로파, 벼, 피마자, 옥수수를 포함하는 군에서 선택되는, 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물.
- [0013] 3. 위 1에 있어서, 상기 발현을 증가시키는 물질은 상기 전사인자를 코딩하는 유전자인, 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물.
- [0014] 4. 위 3에 있어서, 상기 유전자는 35S 프로모터 또는 베타-콩글라이신(β -conglycinin) 프로모터를 포함하는 운반체에 포함된 것인, 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물.
- [0015] 5. 위 1에 있어서, 상기 지방은 팔미트산, 스테아르산, 엘라이드산, 박센산, 올레산, 리놀레산, 리노엘라이드산, α -리놀레산, 아라키드산, 가돌레산, 에이코사디에노산 및 에루크산을 포함하는 군에서 선택되는 하나 이상의 지방산을 포함하는, 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물.
- [0016] 6. 위 1 내지 5 중 어느 한 항의 조성물을 식물체에 처리하는 단계를 포함하는, 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법.
- [0017] 7. 위 6에 있어서, 상기 식물은 애기장대, 유채, 카멜리나, 콩, 자트로파, 벼, 피마자, 옥수수를 포함하는 군에서 선택되는, 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법.
- [0018] 8. 위 6에 있어서, 상기 조성물이 처리된 식물체로부터 종자를 얻는 단계를 더 포함하는, 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법.
- [0019] 9. 위 6에 있어서, 상기 조성물은 상기 전사인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 것이고, 상기 유전자는 35S 프로모터 또는 베타-콩글라이신(β -conglycinin) 프로모터를 포함하는 운반체에 포함된 것인, 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법.
- [0020] 10. 위 9에 있어서, 상기 조성물은 상기 전사인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 것이고, 상기 식물체를 교배하여 상기 유전자가 과발현되고, 그 대립유전자가 동형접합자인 후세대 식물체를 선별하는 단계를 더 포함하는, 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법.

발명의 효과

- [0022] 본 발명의 조성물은 종자 발달 과정 중 지방 합성 과정을 위주로 조절하여 보다 높은 비율로 식물 종자의 지방 함량을 증가시킬 수 있다.
- [0023] 본 발명의 방법은 상기 조성물을 이용하여 보다 높은 비율로 지방 함량이 증가된 식물체, 또는 그로부터 얻은 종자를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025]

도 1은 35S 프로모터 조절 하에 본 발명 전사인자의 유전자를 발현시킬 수 있는 벡터 도식을 나타낸 것이다.

도 2A는 담배잎에서 음성대조군, 양성대조군 및 25종의 전사인자 유전자 발현 시 담배잎에서의 지방함량을 비교한 것이고, 도 2B는 음성대조군과 비교해 지방함량이 증가한 5종의 전사인자를 선별하여 담배잎에서의 지방함량을 비교한 것이다.

도 3은 음성대조군, LEC2, 위 5종의 전사인자가 발현된 담배잎에서의 지방산 조성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 음성대조군, LEC2, 위 5종의 전사인자 발현된 담배잎의 TLC 분석 결과이다.

도 5는 위 5종 전사인자가 발현된 담배잎의 지방 염색 결과이다.

도 6A 및 6B는 LEC2에 의한 5종 전사인자의 발현 정도를 측정하기 위해 사용된 재조합 유전자 구성이고, 도 6C는 상기 5종의 전사인자의 LEC2에 의한 발현 정도를 분석한 결과이다.

도 7은 위 5종 전사인자의 식물 조직별, 종자 발달단계별 유전자 발현 분석 결과이다.

도 8A는 AIL6의 knock-out을 위해 사용된 CRISPR-Cas9 벡터를 나타낸 것이고, 도 8B는 서로 다른 두 개의 knock-out 대립유전자를 얻기 위한 AIL6 유전자의 두 종류의 표적 exon 부위를 나타낸 것이고, 도 8C는 AIL6에 대해 서로 다른 결실(deletion) 형태를 가지는 두 종류의 돌연변이체를 나타낸 것이고, 도 8D 및 8E는 상기 돌연변이체에서 early stop이 일어났는지 여부를 확인한 것이다.

도 9는 AIL6 돌연변이체 종자와 야생형 종자의 지방함량 및 종자 무게를 비교한 것이다.

도 10은 AIL6가 CaMV35S 프로모터로 조절되는 벡터로 형질전환 시킨 식물체의 잎에서 RNA를 추출하여 형질전환된 AIL6 cDNA 일부 서열로 제작한 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 한 결과이다.

도 11은 AIL6가 과발현 종자와 야생형 종자의 지방함량 및 종자 무게를 비교한 것이다.

도 12는 AIL6 과발현체에서의 지방산 조성 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 AIL6 과발현체에서의 지방산과 지방 합성에 관여하는 유전자의 발현을 분석한 결과이다.

도 14A는 종자 발달과정에서의 WRKY8의 발현을 나타내는 것이고, 도 14B는 세포 핵에 WRKY8가 존재함을 확인한 것이고, 도 14C는 WRKY8의 발현이 LEC2 전사인자에 의해 증가함을 확인한 것이고, 도 14D는 WRKY8 돌연변이 및 과발현체와 야생형 종자 간의 종자 지방함량을 비교한 것이고, 도 14E는 WRKY8 돌연변이, 과발현체, 야생형 간의 종자 지방산 조성을 비교한 것이다.

도 15는 WRKY8 knock-out 돌연변이체의 염기서열 분석 결과를 나타낸 것으로, 돌연변이체의 유전자 편집 위치(a), 야생형과 돌연변이의 염기서열 비교 및 결실(deletion) 결과(b), 돌연변이체에서의 아미노산 변화(c)를 나타낸 것이다.

도 16A는 종자 발달과정에서의 ANAC038의 발현을 나타내는 것이고, 도 16B는 세포 핵에 ANAC038가 존재함을 확인한 것이고, 도 16C는 ANAC038의 발현이 LEC2 전사인자에 의해 증가함을 확인한 것이고, 도 16D는 ANAC038 돌연변이 및 과발현체와 야생형 종자 간의 종자 지방함량을 비교한 것이고, 도 16E는 ANAC038 돌연변이, 과발현체, 야생형 간의 종자 지방산 조성을 비교한 것이다.

도 17은 ANAC038 knock-out 돌연변이체의 염기서열 분석 결과를 나타낸 것으로, 돌연변이체의 유전자 편집 위치(a), 야생형과 돌연변이의 염기서열 비교 및 결실(deletion) 결과(b), 돌연변이체에서의 아미노산 변화(c)를 나타낸 것이다.

도 18A는 A6-ERF/AP2 돌연변이와 야생형 종자 간의 종자 지방함량을 비교한 것이고, 도 18B는 A6-ERF/AP2 돌연변이와 야생형 간의 종자 지방산 조성을 비교한 것이다.

도 19A는 A6-ERF/AP2 과발현체와 야생형 종자 간의 종자 지방함량을 비교한 것이고, 도 19B는 A6-ERF/AP2 과발현체와 야생형 간의 종자 지방산 조성을 비교한 것이다.

도 20은 A6-ERF/AP2 조직별 발현을 확인하기 위해 사용한 벡터맵을 도식화한 것이다.

도 21은 WT와 A6-ERF/AP2 과발현체에서의 조직별 A6-ERF/AP2 발현을 확인한 것이다(A, G: 잎; B, H: 실리큐; C, I: 발달 종자; D, J: 종자; E, K: 꽃; F, L: 배).

도 22는 WT와 ARR21 과발현체의 지방함량을 비교한 것이다.

도 23은 ARR21의 애기장대와 유지식물에서의 단백질서열 상동성을 확인한 것이다.

도 24는 AIL6의 애기장대와 유지식물에서의 단백질서열 상동성을 확인한 것이다.

도 25는 A6-ERF/AP2의 애기장대와 유지식물에서의 단백질서열 상동성을 확인한 것이다.

도 26은 WRKY8의 애기장대와 유지식물에서의 단백질서열 상동성을 확인한 것이다.

도 27은 ANAC038의 애기장대와 유지식물에서의 단백질서열 상동성을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 자세히 설명한다.

본 발명은 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 식물 종자 지방 함량 증가용 조성물은 ARR21(RESPONSE REGULATOR 21), A6-ERF/AP2(A6-ETHYLENE RESPONSIVE FACTORS/APETALA2), WRKY8(WRKY DNA-BINDING PROTEIN 8) 및 ANAC038(NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 38)로 이루어진 군에서 선택된 전사인자의 발현을 증가시키는 물질을 포함한다.

본 발명에 따른 상기 식물은 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 툴페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료작물류일 수 있다.

상기 식물은 또한 유지식물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 유지식물은 씨나 열매에서 기름을 얻는 식물일 수 있으며, 예를 들면 유채, 카멜리나, 콩, 자트로파, 벼, 피마자, 옥수수, 카놀라, 코코넛, 포도씨, 올리브, 참깨, 들깨, 아몬드, 기름야자 및 해바라기씨를 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

본 발명에서 전사인자의 발현 증가는 상기 전사인자를 코딩하는 유전자에 직접 또는 간접적으로 작용하여 유전자의 발현을 개선, 유도, 자극, 증가시키는 것을 의미한다.

상기 물질은 상기 전사인자의 발현을 증가시킬 수 있는 모든 물질로서, 예를 들면 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 고분자 화합물, 천연물 또는 화학적으로 합성된 화합물 등이며, 이에 제한되는 것은 아니다.

또한 상기 물질은 예를 들어, 상기 전사인자를 코딩하는 유전자 또는 이를 포함하는 운반체일 수 있고, 필요에 따라 상기 운반체는 상기 유전자를 과발현하는 프로모터를 포함하는 것일 수 있다.

상기 운반체는 식물 형질전환용인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 적정 핵산 서열은 프로모터가 될 수 있으며, 그 외에도 추가적으로 인핸서, 전사종결자 및 폴리아데닐레이션 신호 등을 더 포함할 수 있다. 프로모터, 인핸서, 전사종결자 및 폴리아데닐레이션 신호는 당업계에서 통상적으로 사용되는 것을 제한 없이 이용할 수 있다.

상기 프로모터는 식물 전신 발현 유도 프로모터, 예를 들면 35S 프로모터, 또는 종자 특이적 프로모터, 예를 들면 베타-콩글리닌(β -conglycinin) 프로모터일 수 있으나, 당업계에서 통상적으로 사용되는 것을 제한 없이 이용할 수 있다.

상기 운반체는 상기 유전자의 염기서열이 삽입되어 식물 세포로 직접 도입될 수 있거나, 식물에 감염을 유발하는 미생물 내부로 도입될 수 있는 식물 발현 벡터일 수 있다. 본 발명의 운반체는 당업계의 공지된 다양한 방법

을 통해 구축될 수 있다. 본 발명의 운반체는 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 운반체는 원핵세포 또는 진핵세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 운반체는 박테리오파지, 코스미드, 효모인공염색체, 세균인공염색체, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스 또는 비바이러스성 벡터(예: 플라스미드, 리포솜)와 CRISPR/Cas9 시스템 또는 당업계에서 통상적으로 사용되는 유전자 재조합 기술을 사용하여 제작될 수 있다.

[0038] 예를 들어, 운반체는 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그의 유전체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 이러한 조작에 사용될 수 있는 아그로박테리움의 스트레인(strain)은 다수가 있으며 당업계에 공지되어있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 바이너리 벡터(binary vector)이다. 본 발명에 따른 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 운반체로는 꽃양배추모자이크바이러스(CaMV), 담배모자이크바이러스(TMV), 게미니 바이러스 등으로부터 유래되는 바이러스 벡터 또는 상기 유전자를 담고 있는 리포솜 등의 비바이러스성 벡터가 사용될 수 있다.

[0039] 상기 운반체는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 내성 유전자 예를 들어, 바스타 제초제, 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자를 포함할 수 있다. 선택표지를 이용해 대상 식물에서 목적인 유전자가 제대로 발현했는지를 확인할 수 있다.

[0040] ARR21, A6-ERF/AP2, WRKY8 및 ANAC038로 이루어진 군에서 선택된 전사인자를 코딩하는 유전자의 발현을 촉진하는 물질이 상기 전사인자를 코딩하는 유전자가 포함된 운반체인 경우의 구체적인 예를 들자면, 상기 유전자는 대상 식물 종의 유전자를 사용할 수 있다. 예를 들면, 대상 식물이 애기장대인 경우, 애기장대 WRKY8 전사인자를 코딩하는 유전자를 사용할 수 있다. 각 식물 종의 전사인자 ARR21, A6-ERF/AP2, WRKY8 및 ANAC038의 단백질 서열 및 이를 코딩하는 유전자 서열은 NCBI genbank 등에 공지된 서열을 활용할 수 있다.

[0041] 식물에 존재하는 전사인자 ARR21, A6-ERF/AP2, WRKY8 및 ANAC038를 코딩하는 유전자의 염기서열은 식물마다 차이가 있으나, 각 식물의 상기 유전자를 과발현시키면 식물 종자의 지방 함량을 증가시킬 수 있다.

[0042] 예를 들면, 애기장대의 ARR21를 코딩하는 유전자의 염기 서열은 서열번호 1의 서열로 이루어진 것일 수 있고, A6-ERF/AP2를 코딩하는 유전자의 염기 서열은 서열번호 3의 서열로 이루어진 것일 수 있고, WRKY8를 코딩하는 유전자의 염기 서열은 서열번호 4의 서열로 이루어진 것일 수 있고, ANAC038를 코딩하는 유전자의 염기서열은 서열번호 5의 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 지방은 지방산을 포함하는 것이다. 상기 지방산은 팔미트산, 팔미톨렌산, 스테아르산, 엘라이드산, 박센산, 올레산, 리놀레산, 리노엘라이드산, α -리놀레산, 아라키드산, 가돌레산, 에이코사디에노산 및 에루크산을 포함하는 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 또한, 본 발명은 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법에 관한 것이다.

[0046] 본 발명의 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법은 전술한 조성물을 식물체에 처리하는 단계를 포함한다.

[0047] 상기 '식물체(plant body)'는 식물로서의 유기체 즉, 식물이 지닌 유형의 몸을 의미하는 것으로, 상기 식물체의 일부, 예를 들면, 절단된 조직 일부, 흠에 심어져 있는 경우에 지상 부분 등에 조성물이 처리될 수 있다.

[0048] 본 발명에 따른 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료작물류일 수 있다.

[0049] 상기 식물체는 또한 유지식물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 유지식물은 씨나 열매에서 기름을 얻는 식물일 수 있으며, 예를 들면 유채, 카멜리나, 콩, 자트로파, 벼, 피마자, 옥수수, 카놀라, 코코넛, 포도씨, 올리브, 참깨, 들깨, 아몬드, 기름야자 및 해바라기씨를 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수

있다.

- [0050] 상기 조성물은 지방 함량이 증가된 종자의 제조에 이용할 수 있는 임의의 물질, 예를 들어 상기 운반체가 도입된 미생물을 더 포함할 수 있다. 상기 미생물은 예를 들면, 아그로박테리움 또는 파이토플라스마(phytoplasma) 일 수 있으나, 식물에 감염을 유발하는 것이라면 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0051] 예를 들어, 상기 미생물은 아그로박테리움 투머파시엔스일 수 있고, 전술한 범위 내의 본 발명의 운반체를 아그로박테리움에 도입하는 방법으로는 입자충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation), 형질감염법(transfection), 리튬아세테이트법(lithium acetate method), 열충격법(heat shock) 및 냉동-해빙법(freezethaw method) 등이 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 도입 방법을 이용할 수 있다.
- [0052] 상기 조성물을 상기 식물체에 처리하는 방법으로는 아그로박테리움법(Agrobacterium method), 입자충격법(particle-gun method), 직접주입법(injection), PEG(Polyethylene glycol)-매개 형질감염법, 리포솜-매개 형질감염법, 식물내 변형법(In-planta transformation), 칼슘포스페이트 침전법, 플로럴 디핑(floral dipping) 또는 이들의 조합을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업계에 통상적으로 사용되는 처리방법을 이용할 수 있다.
- [0053] 예를 들어, 전달할 유전자를 포함하는 운반체를 제작 후 아그로박테리움에 도입하여 플로럴 디핑 방법을 사용해 상기 식물체를 형질전환시킬 수 있다. 0.01-0.05%(vol/vol) Silwet L-77(계면활성제) 및 전달할 유전자를 운반하는 재현탁된 아그로박테리움 세포를 포함하는 5% 자당 용액에 상기 식물체를 몇 초 간 담그는 간단한 방법으로 형질전환된 식물체 및 그로부터 형질전환된 종자를 얻을 수 있다. 이 경우, 식물체는 미성숙한 꽃송이가 많으며, 수정된 실리크(silique)는 많지 않은 상태인 것이 형질전환을 위한 가장 최적의 상태이다.
- [0054] 본 발명의 지방 함량이 증가된 종자의 제조 방법은 상기 조성물이 처리된 식물체로부터 종자를 얻는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 지방은 지방산을 포함하는 것이다. 상기 지방산은 팔미트산, 팔미톨렌산, 스테아르산, 엘라이드산, 박센산, 올레산, 리놀레산, 리노엘라이드산, α -리놀레산, 아라키드산, 가돌레산, 에이코사디에노산 및 에루크산을 포함하는 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명은 종자 1개 당 총 지방의 함량 및 종자 무게에 유의적인 변화를 일으킬 수 있고, 종자의 지방산 조성에도 변화를 일으킬 수 있다.
- [0057] 예를 들어, 애기장대 야생형 종자 대비 WRKY가 과발현된 애기장대의 종자는 종자의 총 지방 함량은 약 33% 증가하였고, 지방산 조성은 18:1, 18:2, 20:1 지방산은 증가하였지만 그 외 지방산은 야생형과 비슷하거나 약간 감소하는 정도를 보였다.
- [0058] 본 발명의 방법에 사용되는 조성물은 상기 전사인자를 코딩하는 유전자를 포함하고, 상기 유전자는 35S 프로모터 또는 베타-콩글리닌(β -conglycinin) 프로모터를 포함하는 운반체에 포함된 것일 수 있다.
- [0059] 상기 운반체는 전술한 범위 내의 것일 수 있으며, 전술한 범위 내의 방법으로 제작될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 방법은 상기 전사인자를 코딩하는 유전자가 포함된 조성물이 처리된 상기 식물체를 교배하여 상기 유전자가 과발현되고, 그 대립유전자가 동형접합자인 후세대 식물체를 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0061] 상기 조성물은 전술한 범위 내의 것, 예를 들면 상기 전사인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 운반체가 도입된 아그로박테리움일 수 있으며, 전술한 범위 내의 방법으로 식물체에 처리될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그로 인해 상기 식물체는 형질전환된 것을 의미한다.
- [0062] 상기 '교배(mating)'는 유성생식을 위하여 암수 또는 서로 다른 교배형(mating type)의 두 개체 사이에 여러가지 방법으로 수정이 이루어지고, 암수 양배우자가 접합하여 접합체를 형성하는 것을 말하며, 이 때 양친의 유전자형이 같고 다른은 문제로 하지 않는다. 유전자형이 다른 두 개체의 교배는 교잡(crossing)이라고 하는데, 본 발명의 '교배'는 교잡을 포함한다.
- [0063] 상기 교배는 당업계에서 통상적으로 사용되는 교배 또는 교잡 방법에 의해 수행될 수 있으며 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 타가수분에 의한 것일 수 있다.
- [0064] 상기 전사인자를 코딩하는 유전자가 과발현되는 경우는 전술한 내용 중 유전자의 발현이 증가된 것을 의미하는

바, 이로 인해 본 발명의 전사인자의 발현이 증가될 수 있다.

[0065] 본 발명의 '동형접합자(homozygote)'란 상동염색체(homologous chromosome)의 상대립하는 유전자 좌위(locus)에 존재하는 대립유전자(allele)가 서로 동일한 이배체를 뜻하는 것으로, 상동염색체의 대립유전자에 상기 과발현된 전사인자를 코딩하는 유전자를 동일하게 가지고 있는 이배체를 의미한다. 과발현된 유전자가 동형접합자인 형질전환 후세대 식물체를 선별해낸다면 그로부터 얻어지는 다음 후세대 식물체들에게서는 지방 함량이 증가된 종자만을 얻을 수 있다.

[0066] 상기 식물체의 선별은 항생제 저항성 검정, β -glucuronidase(GUS) 활성 검정, southern blot 검정, 식물체의 neomycin phosphotransferase, chloramphenicol acetyltransferase 등의 효소활성검정, 또는 단백질발현검정 등이 있으나 이에 제한되지 않으며, 당업계에 통상적으로 사용되는 형질전환식물체 선별 방법이 사용될 수 있다. 식물체 선별 시 상기 운반체에 포함된 선택표지를 이용할 수 있으며, 상기 선택표지는 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0068] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0070] 실시예 1. LEC2의 하위 전사인자들 중 식물 지방 합성에 관여하는 전사인자 탐색

[0071] 본 발명에서는 종자 발달의 마스터 전사인자인 Leafy Cotyledon2 (LEC2)에 의해 발현이 증진되는 25개의 전사인자(표 1) 중 지방 (Triacylglycerol: TAG) 합성을 조절하는 전사인자를 발굴하고자 하였다. 지방합성을 조절하는 전사인자는 식물의 지방 증진에 활용할 수 있다.

표 1

전사인자	서열번호	전사인자	서열번호
ARR21	서열번호 1	A4-ERF/AP2	서열번호 14
AIL6	서열번호 2	XND1	서열번호 15
A6-ERF/AP2	서열번호 3	HDG3	서열번호 16
WRKY8	서열번호 4	SHP1	서열번호 17
ANAC038	서열번호 5	AP2/B3	서열번호 18
AGL15	서열번호 6	SOM	서열번호 19
PET1	서열번호 7	EEL	서열번호 20
MYB115	서열번호 8	AT4G18650	서열번호 21
At1g64900	서열번호 9	AT2G36080	서열번호 22
PAP2	서열번호 10	ASG4	서열번호 23
MYB26	서열번호 11	A2-ERF/AP2	서열번호 24
DPBF2	서열번호 12	AT5G65590	서열번호 25
HAP5B	서열번호 13		

[0074] 지방 합성 조절 능력을 분석하기 위해, 각각의 25종의 전사인자 유전자들을 35S 프로모터(서열번호 26) 조절 하에 클로닝한 재조합 벡터 Agrobacterium 접종 방법을 사용하여 담배잎에 도입하였다 (도 1). 실험의 음성대조군으로써 EV(Empty vector), 양성대조군으로써 LEC2(서열번호 27), WRI1(WRINKELD1, 서열번호 28)을 사용하였다. 25종의 전사인자 유전자, 음성 대조군, 양성대조군을 담배잎에 일시적으로 발현시켜 지방함량을 TLC(Thin-layer chromatography)로 분석하였다 (도 2A).

[0075] 지방함량이 음성대조군과 비교해 증가한 5종의 전사인자들을 TLC로 선별한 뒤 GC(Gas chromatography)로 5종 유전자들이 발현된 담배잎의 지방 (TAG)만 따로 분리하여 분석하였다 (도 2B).

[0076] 그 결과, 양성대조군인 LEC2를 발현시킨 담배잎은 음성대조군 대비 2.1배 증가한 결과를 보였다. 이와 비교해서 ARR21, AIL6, A6-ERF/AP2 (ERF55), WRKY8, ANAC038를 발현시킨 담배잎은 음성대조군 대비 각 3.1, 2.5, 2.3, 2.9 그리고 1.9배가 증가한 결과를 보였다. 위 5종의 전사인자가 각각 발현된 담배잎에서의 지방산 조성은 음성 대조군에 비해 대체적으로 16:0, 18:0, 18:1은 유사한 함량을, 16:3은 감소하고, 18:2와 18:3은 증가한 결과를

보였다(도 3).

[0077] 위와 같이 음성대조군 대비 지방 함량을 증가시킨 5종의 전사인자들만을 다시 한번 TLC로 분석하고(도 4), 위 5종의 전사인자가 발현된 담배잎에서 Nile-red로 지방을 염색하여 지방이 축적됨을 확인(도 5)하여 이들의 지방 합성 능력을 확인하였다.

[0079] (1) 5개 전사인자의 LEC2에 의한 발현 분석

[0080] 다섯 개의 전사인자가 LEC2에 의해 조절되는지 확인하기 위해 LEC2 유전자와 다섯 개의 전사인자의 프로모터 부분에 luciferase 유전자를 붙인 construct를 제작하여 (도 6A, B) 담배 원형질체에 각각의 조합으로써 형질주입한 뒤 luciferase의 형광을 측정하여 GUS 활성으로 정규화하였다. 그 결과, ARR21은 활성이 거의 증가하지 않았으나, AIL6는 약 7.3배, A6-ERF/AP2는 약 3배, WRKY8은 약 3.5배, ANAC038은 약 4.6배 가량 증가했다 (도 6C). 이는 AIL6, A6-ERF/AP2, WRKY8, ANAC038의 유전자 발현이 LEC2에 의해 직접적으로 조절된다는 것을 보여준다. ARR21은 LEC2에 의해 활성이 증가하지 않은 것으로 보아 LEC2에 의해 간접적으로 조절된다는 것을 보여준다.

[0082] (2) 5종 전사인자의 식물 조직별 및 종자 발달단계별 유전자 발현 분석

[0083] RT-qPCR로 위의 실시예에서 지방 합성에 관여하는 것으로 확인된 5종 전사인자의 식물 조직별 그리고 종자 발달 단계별 유전자 발현을 분석하였다. 식물 조직은 잎(L), 유묘(S), 꽃(F), 뿌리(R), 발달 종자(DS)로 나누어 분석하였고, 종자 발달단계는 어린 시기부터 성숙단계까지 S1에서 S8, 총 8단계로 구분하여 분석하였다.

[0084] 실험 결과, 지방 합성에 관여한다고 이미 공지되어 있는 전사인자인 LEC2와 마찬가지로 본 발명 5종의 전사인자(ARR21, AIL6, A6-ERF/AP2, WRKY8, ANAC038)도 발달 종자에서 높은 유전자 발현을 보이는 것을 확인하였다(도 7a). 또한, 위 5종의 전사인자 모두 종자 발달단계에 있어 LEC2와 유사하게 후기 발달단계(S6~S7)에서 높은 유전자 발현을 보이는 것을 확인하였다(도 7b).

[0086] 실시예 2. 애기장대에서의 각 전사인자 돌연변이와 과발현체의 종자 오일(TAG) 증가 여부 확인

[0087] 하기 실험에서의 지방 함량 및 지방산 조성은 GC(Gas chromatography)로 분석하였다.

[0088] 1. AIL6의 식물 종자 지방 합성 증진 검정

[0089] (1) CRISPR-Cas9을 이용한 AIL6 돌연변이체 제작

[0090] AIL6의 knock-out을 위해 CRISPR-Cas9 벡터를 사용하였다 (도 8A). 서로 다른 두 개의 대립유전자(allele)를 얻기 위해 AIL6의 Exon 2와 Exon 4를 각각 표적하는 두 쌍의 sgRNA 서열(Exon 2 표적: 서열번호 29, 30, Exon 4 표적: 서열번호 31, 32)을 design하였다 (도 8B). 한 Exon을 표적하는 두 개의 sgRNA 서열을 가지는 CRISPR-Cas9 벡터를 제작하였다. 각각의 벡터를 Agrobacterium에 형질전환 후 애기장대에 플로럴 디핑 (floral dipping) 방법을 사용하여 형질전환시켰다. 그 결과, AIL6에 대해 서로 다른 deletion 형태를 가지는 ail6-6-2, ail6-9 두 종류의 돌연변이체를 얻었다 (도 8C). DNA서열을 아미노산으로 번역한 결과 ail6-6-2는 early stop이 일어나지 않았고, ail6-9는 early stop이 일어난 것을 확인할 수 있었다 (도 8D, E).

[0091] (2) AIL6 돌연변이체 종자 분석 결과

[0092] 서로 다른 deletion 형태를 보이는 두 line의 종자를 GC로 분석한 결과이다. 애기장대 야생형인 Col-0 종자의 지방함량과 비교하였을 때 AIL6가 완전히 Knock-out되지 않은 ail6-6-2 line은 지방함량이 거의 변화하지 않았으나, ail6-9 line은 15.7% 감소하였다 (도 9A). 또, ail6-6-2 line의 종자 무게는 거의 변화하지 않았으나, ail6-9 line은 4.8%가 감소하였다 (도 9B).

[0093] (3) AIL6 과발현체 제작

[0094] 상기 실시예 1에 사용되었던 35S 프로모터 (도 1)에 의해 AIL6가 조절되는 벡터를 가지는 Agrobacterium을 애기장대에 플로럴 디핑 방법을 사용하여 형질전환시켰다. 형질전환 시킨 식물체의 잎에서 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 뒤 AIL6 cDNA 일부 서열로 제작한 primer를 사용하여 RT-PCR을 한 결과이다. 총 14개의 식물체 중 AIL6가 과발현된 13개의 과발현체를 얻을 수 있었으며 동형접합자(homozygous) 개체를 얻기 위해 2, 4, 13번 line을

T3세대까지 진전시켰다 (도 10).

[0095] (4) AIL6 과발현체 종자 분석 결과

[0096] AIL6를 과발현시킨 독립된 3개 line 종자의 지방함량을 분석하였다. 그 결과, 애기장대 야생형인 Col-0와 비교하였을 때 35S:AIL6-2-2, 35S:AIL6-4-6 종자의 지방함량은 각각 28% 그리고 22.2% 증가하였다 (도 11A). 35S:AIL6-2-2, 35S:AIL6-4-6 종자 무게는 Col-0와 비교하였을 때 18.4%, 22.2%가 증가한 결과를 보였다 (도 11B).

[0097] AIL6 과발현체의 종자 지방산 조성 분석 결과, AIL6 과발현 시 16:0, 18:0, 18:1 지방산이 WT대비 증가하고, 18:3, 20:1 지방산이 WT 대비 감소한 결과를 보였다(도 12).

[0098] 이와 함께 AIL6 과발현체(35S-AIL6-2-2)의 종자에서 지방산과 지방 합성에 관여하는 유전자의 발현을 RT-qPCR로 분석하였다. 그 결과, AIL6 과발현체에서 종자 발달 전사인자인 LEC2, 지방산 합성효소 유전자인 *B-CT*, *KAR*, *FATB*, *LACS8*, 그리고 지방 합성 효소 유전자인 *GPDH1*, *CDS2*, *CK1*, *CCT2*, *AAPT2*, *FAD3*, *LPAT2*, *PDAT1*, *PDAT2*, *LPCAT1*의 발현이 WT보다 증가한 것을 확인하였다(도 13).

[0100] 2. WRKY8의 식물 종자 지방 합성 증진 검정

[0101] 종자 발달 과정에서의 WRKY8의 발현을 확인하였고 (도 14A), WRKY8이 세포의 핵에 존재함을 확인하였으며 (도 14B), WRKY8의 발현이 LEC2 전사인자에 의해 증가함을 확인하였다 (도 14C).

[0102] WRKY8의 CRISPR-Cas9 애기장대 돌연변이는 대조군 야생형(WT)보다 종자 지방함량이 감소하였고, 종자 특이적 프로모터 (β -conglycinin, 서열번호 33) 하에서 과발현 시에는 야생형보다 지방함량이 증가했다 (도 14D). 여기서, CR-WRKY8-13, CR-WRKY8-9-2는 WRKY8 돌연변이체, b-WRKY8-13-4, b-WRKY8-15-1은 WRKY8 과발현체를 나타낸다. 종자 지방산 조성에서도 돌연변이체는 야생형 대비 16:0, 18:0이 증가했고, 18:1, 18:2, 18:3, 20:1이 감소했다. 이에 반해 과발현체는 18:1, 18:2, 20:1 지방산이 증가했다 (도 14E). 이 결과는 WRKY8을 활용하여 종자 지방함량 증진에 이용 가능함을 보여준다.

[0103] 위의 WRKY8 knock-out 돌연변이체인 CR-WRKY8-13, CR-WRKY8-9-2는 AIL6 돌연변이체와 동일한 과정으로 sgRNA (서열번호 34, 35)만 달리하여 형질전환시켜 얻어, 염기서열을 분석하였다. 이 2개의 돌연변이는 유전자 분석 결과 WT와 대비하여 56bp의 뉴클레오타이드가 결실(deletion)되었다. 이 결실로 인해 염기서열의 코딩 서열이 이동(shift)하여 아미노산 서열에 변화가 일어나 WRKY8의 도메인(도 15c 하늘색 하이라이트 부분)을 포함하는 326개의 아미노산(서열번호 36)을 합성하는 WT와 달리, 돌연변이체는 일부 새로운 아미노산 서열(도 15c 빨간색 하이라이트 부분)을 합성하고 아미노산 합성을 멈춰 130개의 아미노산(서열번호 37)만 합성되는 것을 확인하였다(도 15).

[0105] 3. ANAC038의 식물 종자 지방 합성 증진 검정

[0106] 종자 발달 과정에서의 ANAC038의 발현을 확인하였고 (도 16A), ANAC038이 세포질에 존재함을 확인하였으며 (도 16B), ANAC038의 발현이 LEC2 전사인자에 의해 증가함을 확인하였다 (도 16C).

[0107] ANAC038의 CRISPR/Cas9 애기장대 돌연변이 종자의 지방함량은 야생형 (WT) 대비 감소하였고 종자 특이적 프로모터 (β -conglycinin) 하에 과발현시에는 약간 증가된 함량을 나타내었다 (도 16D). 여기서, CR-ANAC038-2-1, CR-ANAC038-7-2는 ANAC038 돌연변이체, b-ANAC038-28-4는 ANAC038 과발현체를 나타낸다. 종자 지방산 조성 변화에서는 ANAC038 돌연변이체에서 야생형 대비 전체적으로 감소되어짐을 보였으며 그 중 특히 18:1, 18:2, 18:3, 20:1의 함량이 감소하였다. 반면 ANAC038 과발현체는 오히려 16:0, 18:0, 18:1이 약간 증가되었고 18:2, 18:3, 20:1이 조금 감소하였다 (도 16E). 이러한 결과는 ANAC038이 종자 지방산 조성을 변화 시키고 지방산 함량을 증진시킴을 시사한다.

[0108] 위의 ANAC038 knock-out 돌연변이체인 CR-ANAC038-2-1, CR-ANAC038-7-2는 AIL6 돌연변이체와 동일한 과정으로 sgRNA(서열번호 38, 39)만 달리하여 형질전환시켜 얻어, 염기서열을 분석하였다. 이 2개의 돌연변이는 유전자 분석 결과 WT 대비 148bp의 뉴클레오타이드가 결실되었다. 이 결실로 인해 염기서열의 코딩 서열이 이동(shift)하여 아미노산 서열에 변화가 일어나 ANAC038의 도메인(도 17c 하늘색 글씨)을 포함하는 316개의 아미노산(서열번호 40)을 합성하는 WT와 달리, 돌연변이체는 일부 새로운 아미노산 서열(도 17c 하늘색 하이라이트 부분)을

합성하고 아미노산 합성을 멈춰 108개의 아미노산(서열번호 41)만 합성되는 것을 확인하였다(도 17).

[0110] **4. A6-ERF/AP2의 식물 종자 지방 합성 증진 검정 (도 18에는 A6AP2로 표기)**

[0111] A6-ERF/AP2의 CRISPR/Cas9 애기장대 돌연변이 종자의 지방함량은 야생형(WT) 대비 감소했다 (도 18A). 특히, CR-A6AP2-1-11-1 라인은 야생형 대비 약 27.7%, CR-A6AP2-1-12-3 라인은 17.3%, CR-A6AP2-13-8-8라인은 32.7% 감소했다. A6-ERF/AP2의 CRISPR/Cas9 애기장대 돌연변이 종자의 지방산 조성은 16:0과 18:0이 증가하고 18:1, 18:2, 20:1은 감소하는 형태를 보였다 (도 18B).

[0112] 또한, β -conglycinin 프로모터를 사용하여 종자에서 A6-ERF/AP2를 과발현시킨 과발현체의 T2 세대의 종자의 지방함량은 야생형(WT) 대비 증가했다 (도 19A). b-A6-ERF/AP2-1 라인에서는 약 8.5%, b-A6-ERF/AP2-4 라인에서는 약 32.9%, b-A6-ERF/AP2-7 라인에서는 약 45%, b-A6-ERF/AP2-9 라인에서는 19.5%, b-A6-ERF/AP2-10 라인에서는 19.8%, b-A6-ERF/AP2-11 라인에서는 8.2%가 증가했다. A6-ERF/AP2를 과발현시킨 과발현체의 T2 세대의 종자의 지방산 조성에는 거의 변화가 없다 (도 19B).

[0113] 이는 A6-ERF/AP2가 종자의 지방함량을 증진시킴을 시사한다.

[0114] 이와 함께 A6-ERF/AP2의 조직별 발현을 확인하기 위해서 A6-ERF/AP2의 프로모터를 GUS가 삽입되어 있는 pMDC163 벡터에 클로닝하였다(도 20). 이 벡터를 이용해 애기장대를 A6-ERF/AP2가 과발현되도록 형질전환한 후, 형질전환체를 선별하여 애기장대에서의 A6-ERF/AP2 발현을 GUS 염색을 통해 분석하였다.

[0115] GUS 염색 결과, 발달 종자, 종자, 꽃 및 배에 진한 녹색으로 염색되었고(도 21), 이를 통해 A6-ERF/AP2는 발달 종자인 배(embryo)와 수술(anther)에서 발현되는 것을 알 수 있었다. 따라서, A6-ERF/AP2가 발달 종자에서 지방 합성에 기능을 한다는 가능성을 확인하였다.

[0117] **5. ARR21의 식물 종자 지방 합성 증진 검정**

[0118] ARR21를 35S 프로모터와 β -conglycinin 종자 특이적 프로모터 하에 과발현시킨 애기장대를 제작하여 종자 지방 함량을 측정하였다. 그 결과 35S:ARR21-3-6와 beta-con:ARR21-1-3의 종자에서 WT 대비 약 10% 지방함량(FAME)이 증진한 것을 확인하였다(도 22).

[0120] **실시예 3. 5개 전사인자의 다른 유지식물(oil plant)에서의 단백질서열 상동성(protein alignment identity %) 확인**

[0121] 애기장대 외의 다른 유지식물에서도 본 발명의 전사인자 ARR21, AIL6, A6-ERF/AP2, WRKY8 및 ANAC038의 발현을 증가시킬 경우 종자의 지방 함량이 증가될 수 있는지를 확인하기 위해, 애기장대에서의 상기 5종 전사인자 단백질서열을 기준으로 유채, 카멜리나, 콩, 자트로파, 벼, 피마자, 옥수수에서의 상기 5종 전사인자의 단백질서열 상동성을 확인했다. NCBI genbank 등에서 공지된 각 식물 종에서의 상기 5종의 전사인자의 단백질 서열을 확인할 수 있다.

[0122] **(1) ARR21**

[0123] 유채, 카멜리나에서의 단백질서열 상동성 확인 결과, 유채에서 70.31%, 카멜리나에서 70.69%의 서열 상동성을 확인했다 (도 23).

[0124] **(2) AIL6**

[0125] 유채, 카멜리나, 콩, 자트로파, 피마자에서의 단백질서열 상동성 확인 결과, 유채에서 79.87%, 카멜리나에서 84.95%, 콩에서 53.06%, 자트로파에서 57.47%, 피마자에서 54.74%의 서열 상동성을 확인했다 (도 24).

[0126] **(3) A6-ERF/AP2**

[0127] 유채, 카멜리나, 콩, 자트로파, 벼, 피마자, 옥수수에서의 단백질서열 상동성 확인 결과, 유채에서 73.15%, 카멜리나에서 86.88%, 콩에서 40.19%, 자트로파에서 75%, 벼에서 50.28%, 피마자에서 57.93%, 옥수수에서 42.44%의 서열 상동성을 확인했다 (도 25).

[0128] (4) WRKY8

[0129] 유채, 카멜리나, 벼에서의 단백질서열 상동성 확인 결과, 유채에서 76.76%, 카멜리나에서 93.25%, 벼에서 59.74%의 서열 상동성을 확인했다 (도 26).

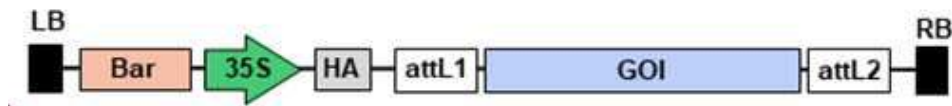
[0130] (5) ANAC038

[0131] 유채, 카멜리나, 콩, 자트로파, 피마자에서의 단백질서열 상동성 확인 결과, 유채에서 92.74%, 카멜리나에서 94.03%, 콩에서 53.58%, 자트로파에서 53.91%, 피마자에서 55.37%의 서열 상동성을 확인했다 (도 27).

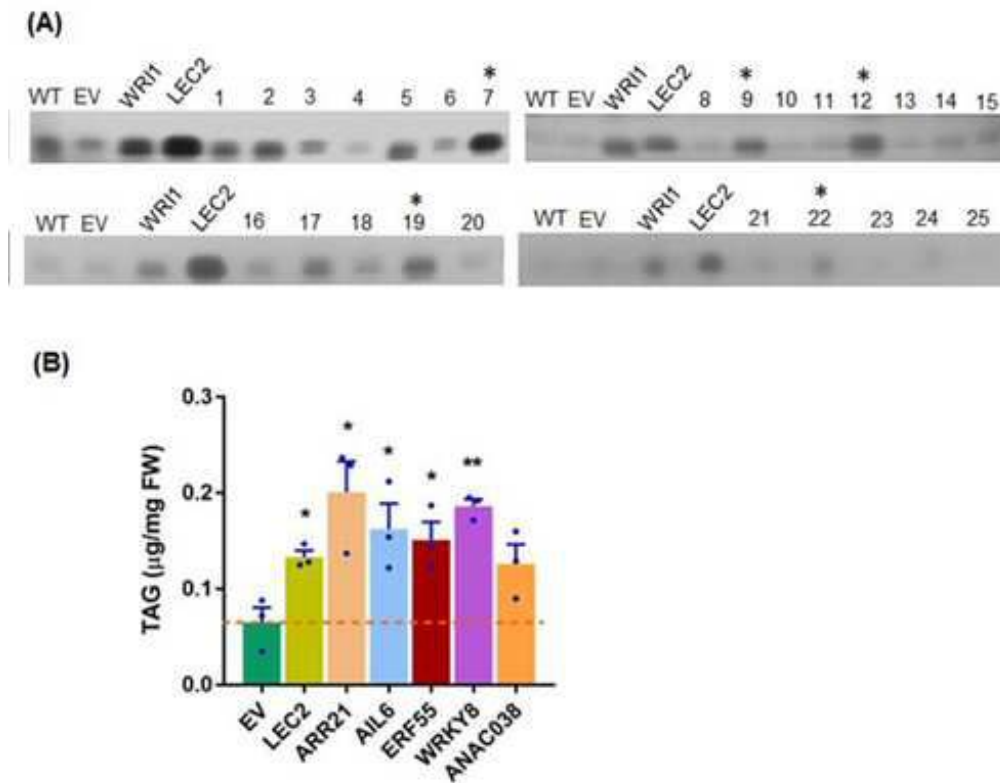
[0132] 상기 결과는 상기 5종의 전사인자가 다양한 식물 종에 보존되어 있으며, 애기장대 5종의 전사인자 또는 애기장대와 상동성을 보이는 다양한 식물 종의 전사인자를 과발현시킬 경우 종자의 지방 함량을 증진시킬 수 있음을 제시한다.

도면

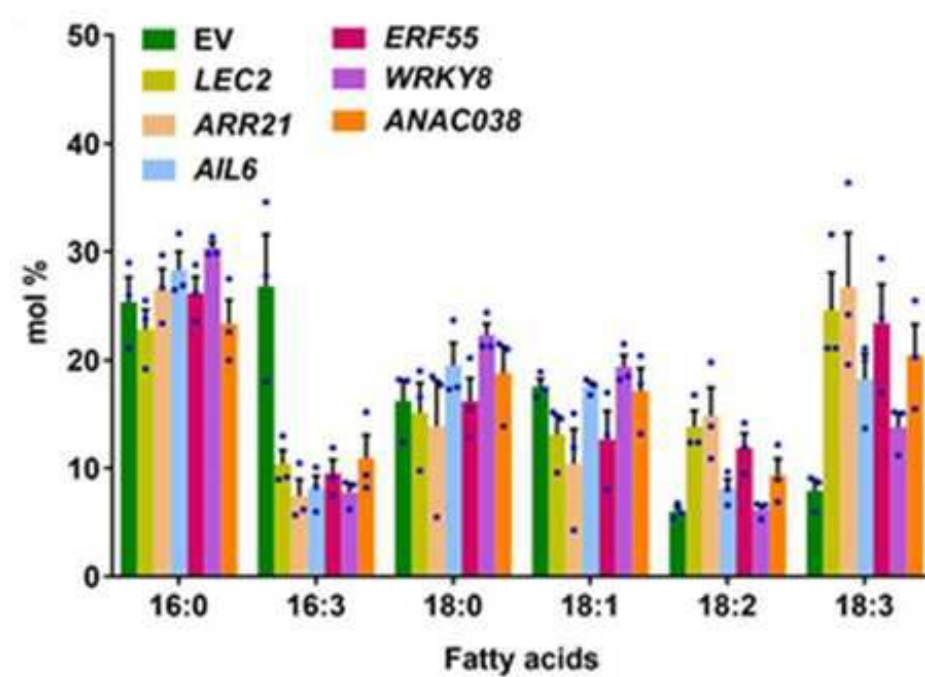
도면1



도면2



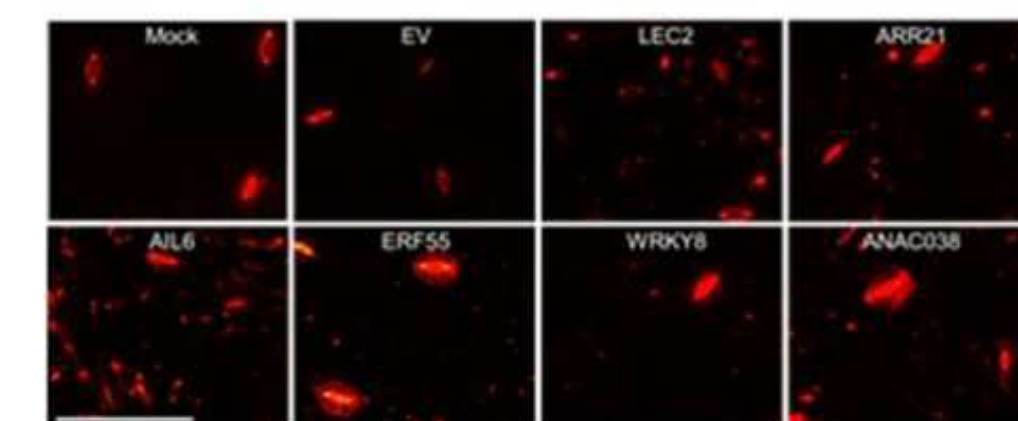
도면3



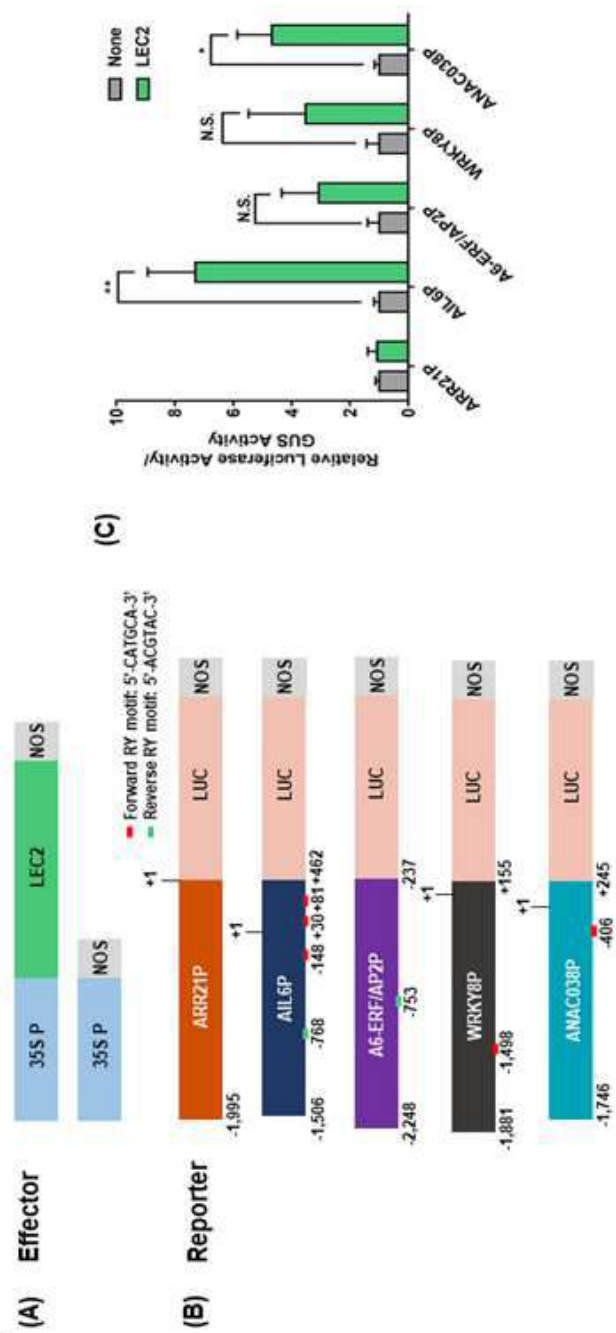
도면4



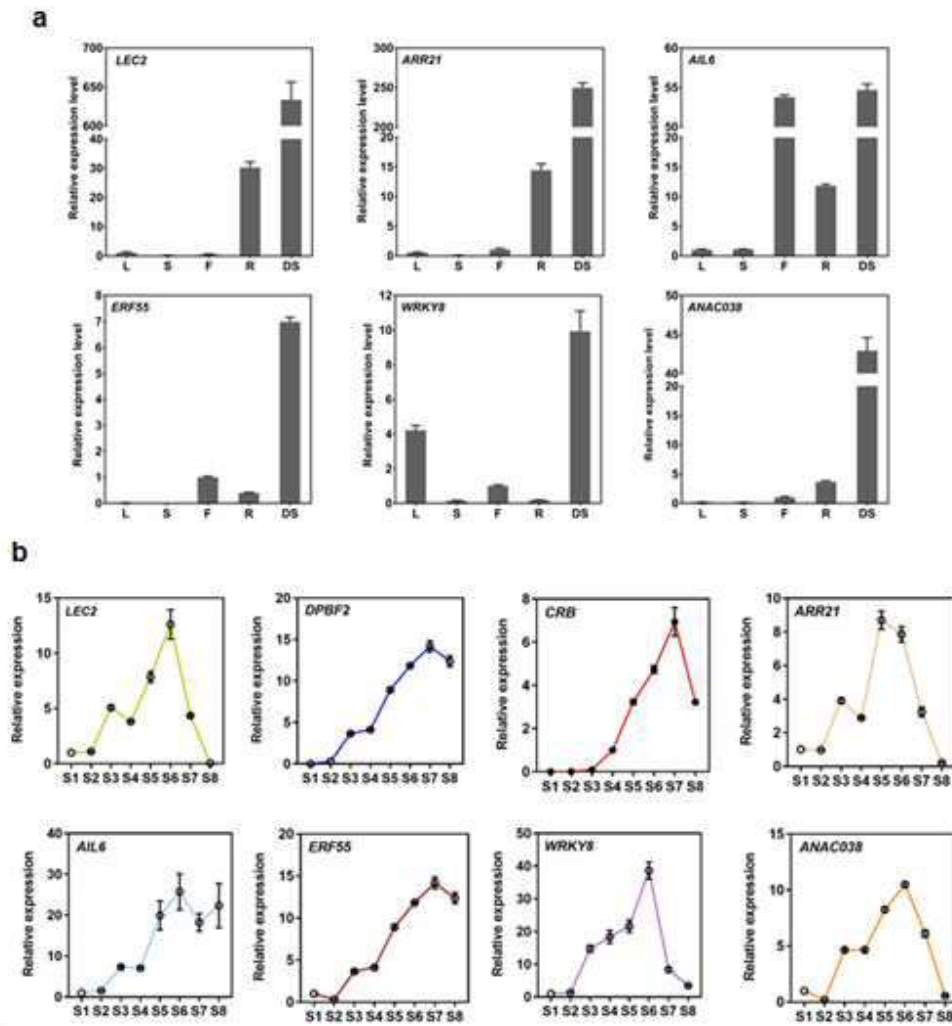
도면5



도면6



도면7



도면8a



도면8b



도면8c

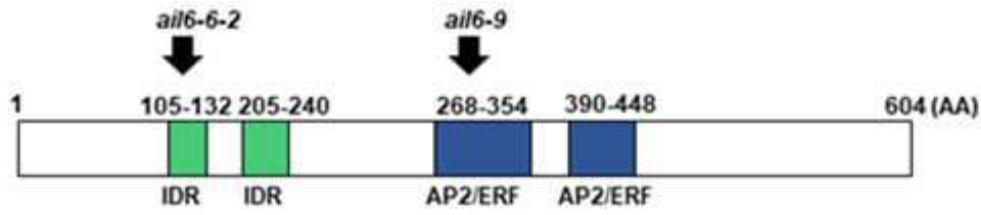
Target 1 (-15bp, A→T)

Col-0	CCACAATCTCATCTTCTCAGAATC	CGACACACAAGACTCTTC	CCTCACTCAAATCTACGATCCAC
ail6-6-2	CCACAATCTCATCTTCTCAGAATC	CGTCACA	TCCC-AAATCTACGATCCAC

Target 2 (-40bp)

Col-0	TTGGCATGTGCTACTTGATA	TGGGATGCATTTTGGCTCTGCTTAAATCAAC	Agatacttgg
ail6-9	TTGGCATGTGCTACTTG		tacttgg

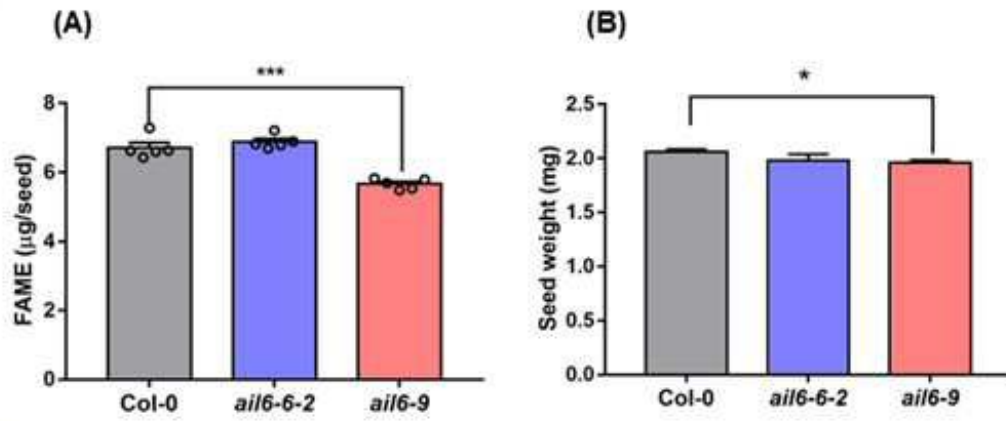
도면8d



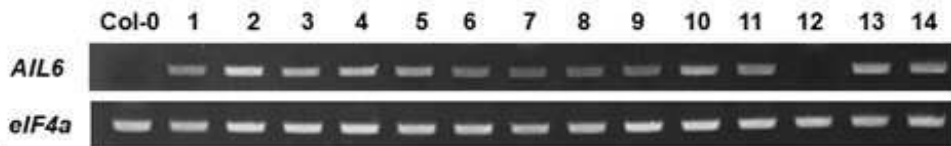
도면8e

1	MALPMTWLTLSRLMELASSDQSQFVYSASAASSSPVLLNIFYGMS	1	MALPMTWLTLSRLMELASSDQSQFVYSASAASSSPVLLNIFYGMS
61	NQGTQEFREEAQIAAASADSTLITLITFVDPQSHSQHHPKLEDFLGD	61	NQGTQEFREEAQIAAASADSTLITLITFVDPQSHSQHHPKLEDFLGD
101	SSSIVRYSDNSQTUTQSSILQYDPRHHNQIIFYSEHDFKIDAGFS	101	SSSIVRYSDNSQTUTQSSILQYDPRHHNQIIFYSEHDFKIDAGFS
151	AFSTNSQSEVDSASIGRTHLACTVLCRVVSSGFELEFHHQSTGALSIG	151	AFSTNSQSEVDSASIGRTHLACTVLCRVVSSGFELEFHHQSTGALSIG
201	VN/NNNTNHRNNHYRQNNZERRNNNNNNNEKTTSEKAVVAVEI	201	VN/NNNTNHRNNHYRQNNZERRNNNNNNNEKTTSEKAVVAVEI
251	SDCSKKLAUTFGQRTSIYRCVTRRWTRVYEAHLWNSCRREDQARKR	251	SDCSKKLAUTFGQRTSIYRCVTRRWTRVYEAHLWNSCRREDQARKR
301	QVYYSFQMCYLIMCCTLALLKNSGYDEKGAAYDLAALKWNAAT	301	QVYYSFQMCYLIMCCTLALLKNSGYDEKGAAYDLAALKWNAAT
351	TNPTINSHVEEMKNTQETIASLQKSSGFSRQASIVRGVTRHHQ	351	TNPTINSHVEEMKNTQETIASLQKSSGFSRQASIVRGVTRHHQ
401	GRQARIGRVAGNDLYLGTATTEEAZAYDLIAALKRCINAVTNEN	401	GRQARIGRVAGNDLYLGTATTEEAZAYDLIAALKRCINAVTNEN
451	RUDVEADKSALEPIGGAQQLKLSLEAASSEQVTLGRHQLRHFQQQQQ	451	RUDVEADKSALEPIGGAQQLKLSLEAASSEQVTLGRHQLRHFQQQQQ
501	QQQLQLQSSPRHSSINFALCPNSAVSQIIPCGLPFEAALYHHQQQQ	501	QQQLQLQSSPRHSSINFALCPNSAVSQIIPCGLPFEAALYHHQQQQ
551	CHQOQQQQQQNFFCHEFANAASDSTGSNNNSNYGNGMGLMANTPAEFTLWP	551	CHQOQQQQQQNFFCHEFANAASDSTGSNNNSNYGNGMGLMANTPAEFTLWP
601	NQSY	601	NQSY

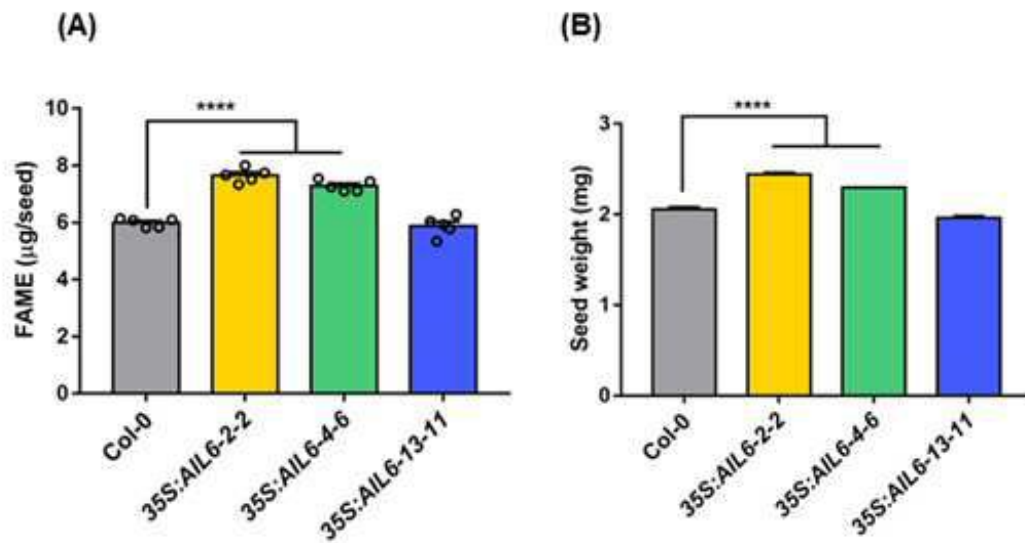
도면9



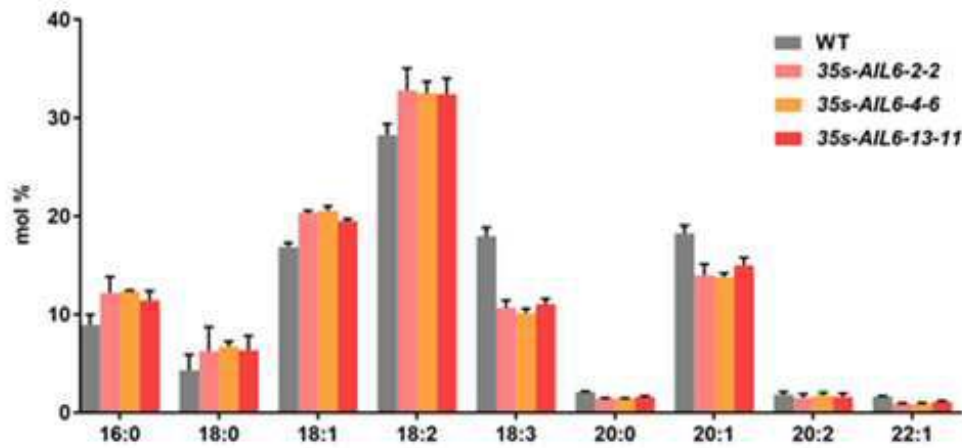
도면10



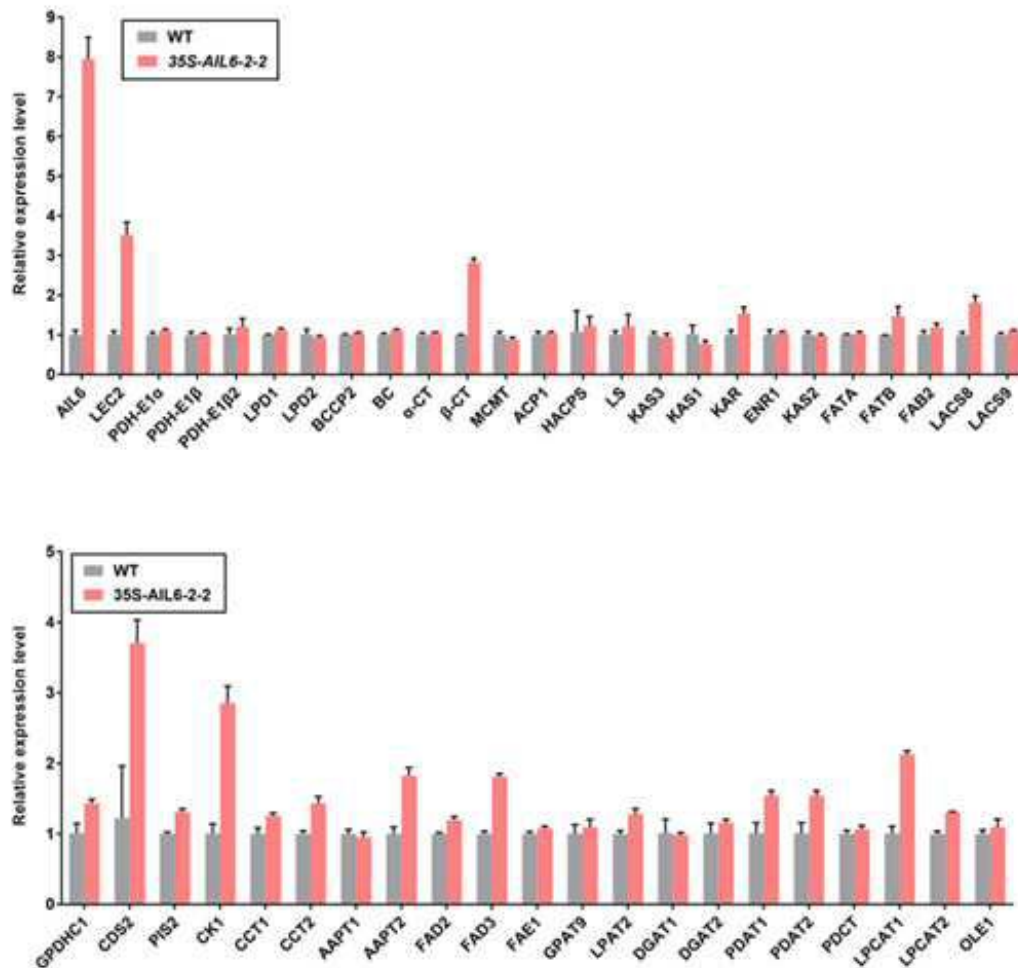
도면11



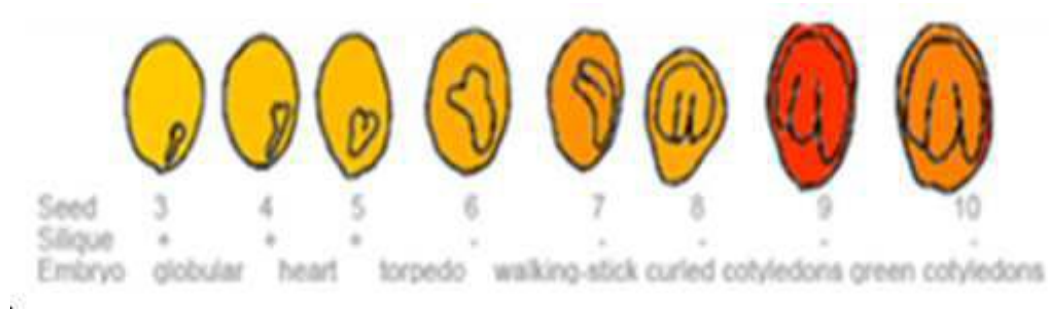
도면12



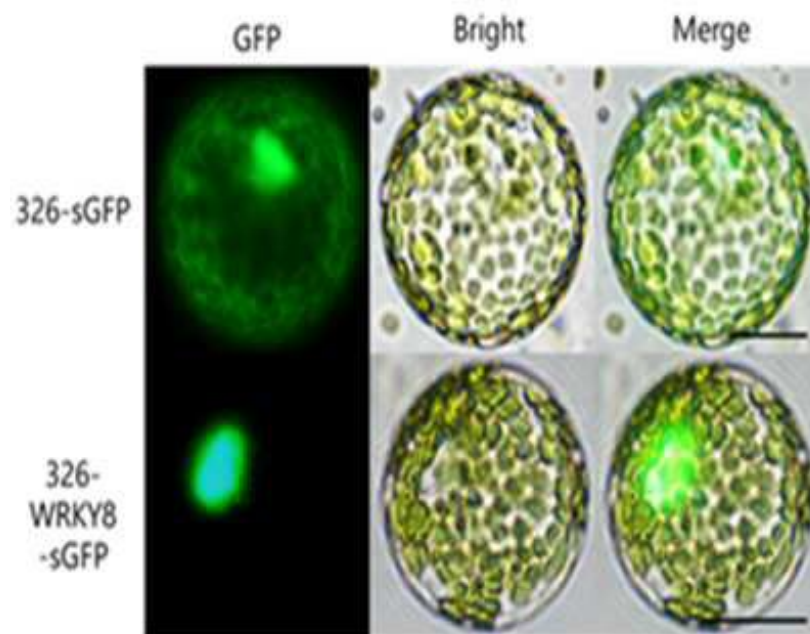
도면13



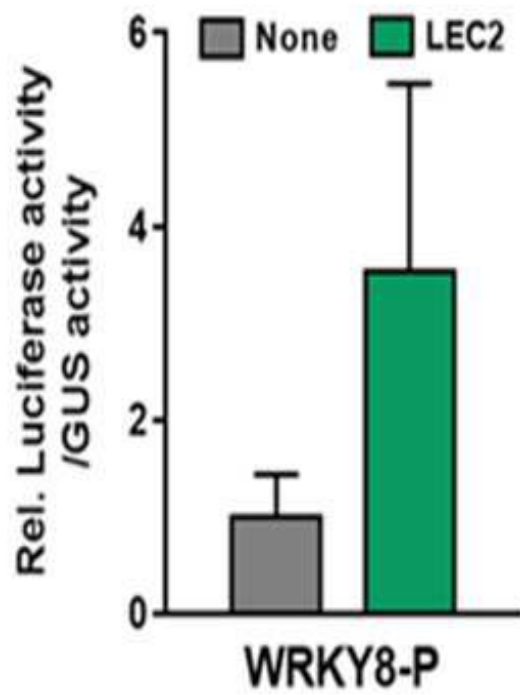
도면14a



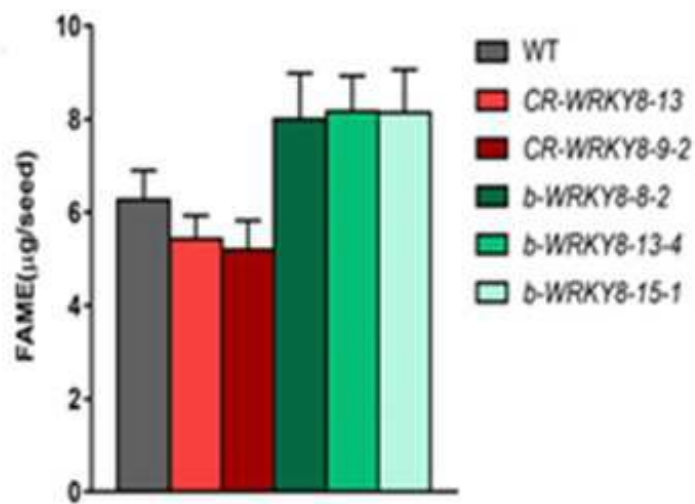
도면14b



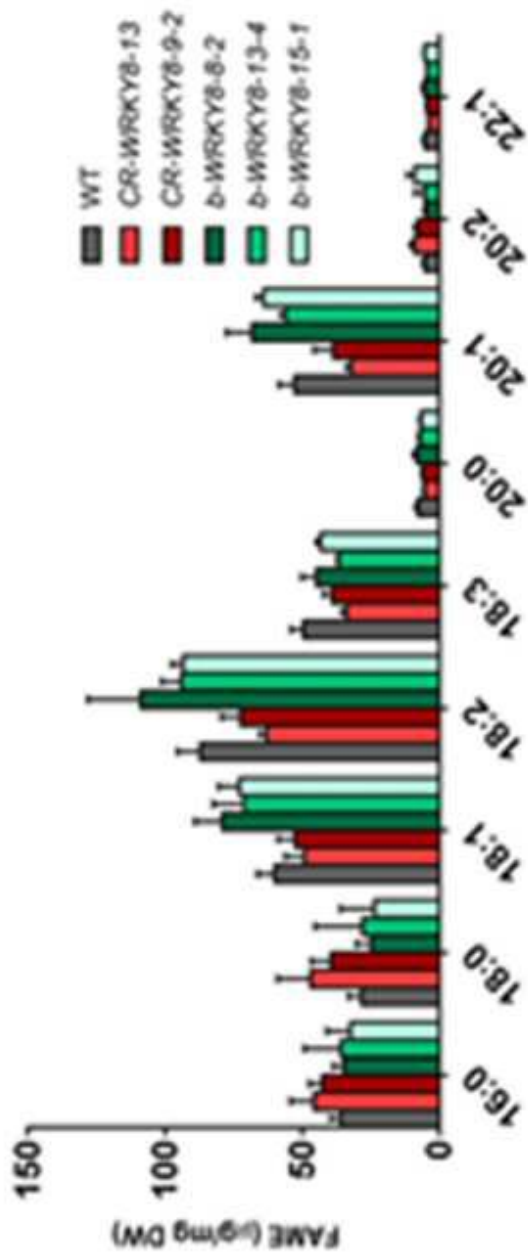
도면14c



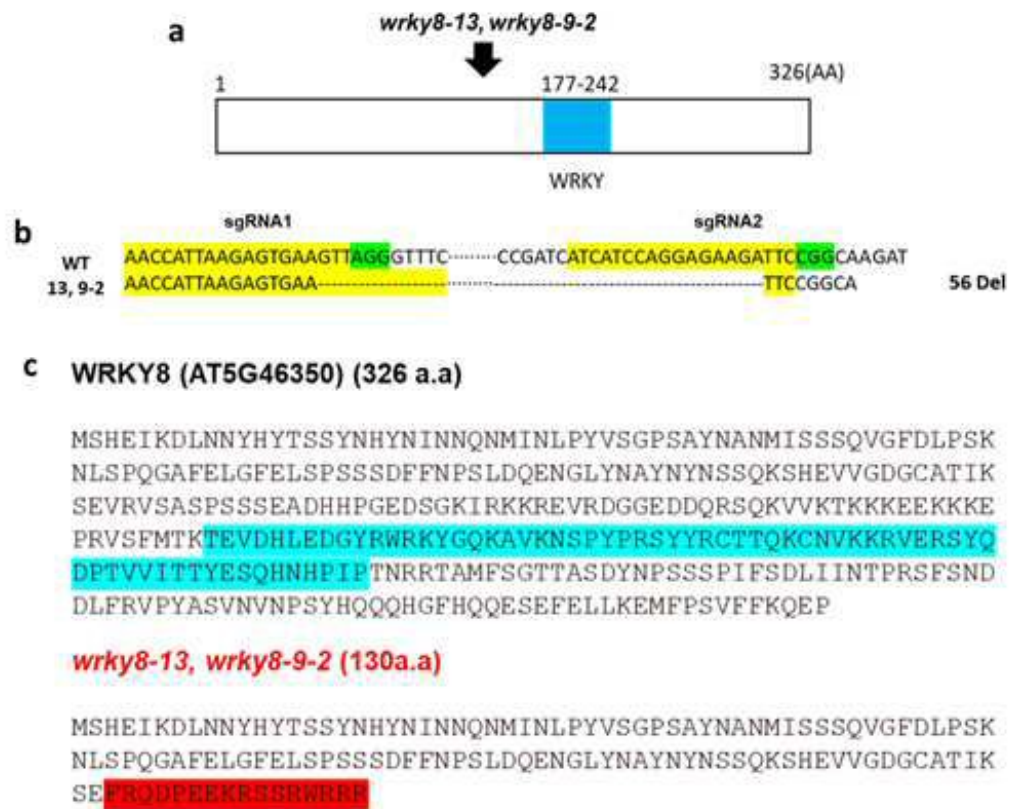
도면14d



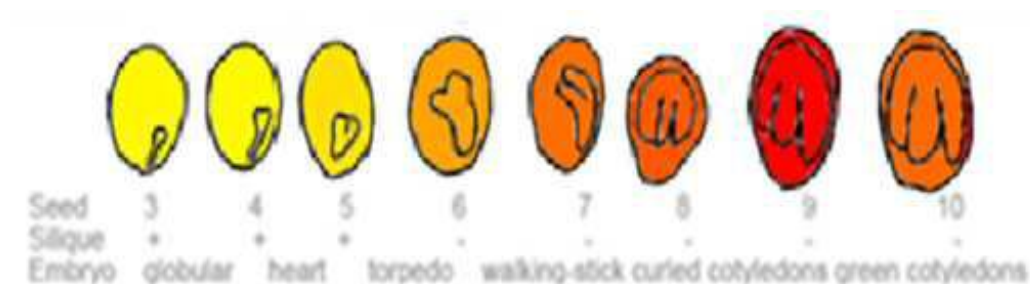
도면14e



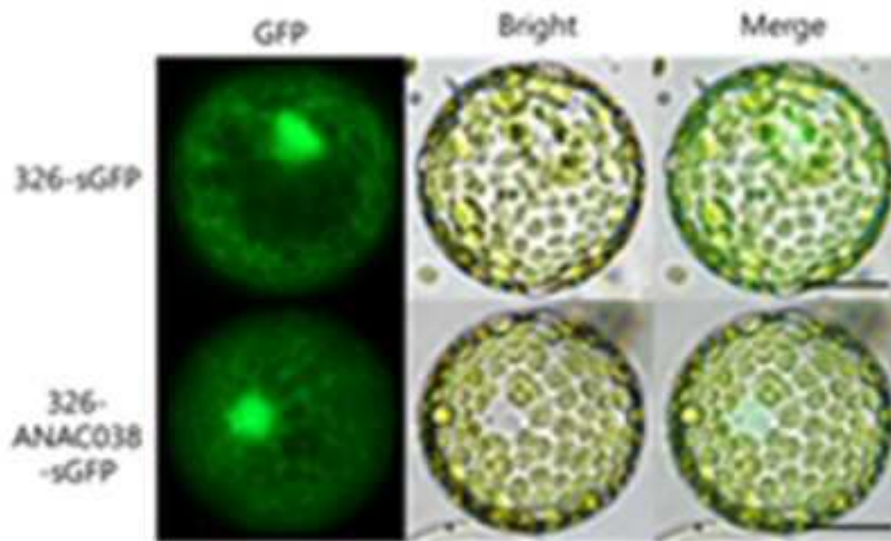
도면15



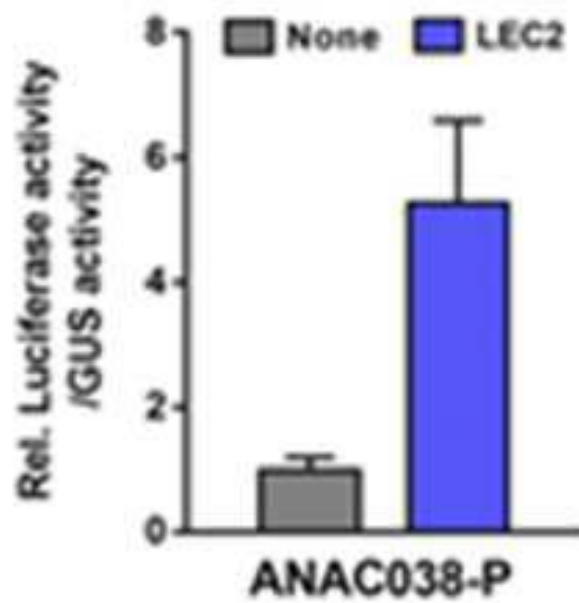
도면16a



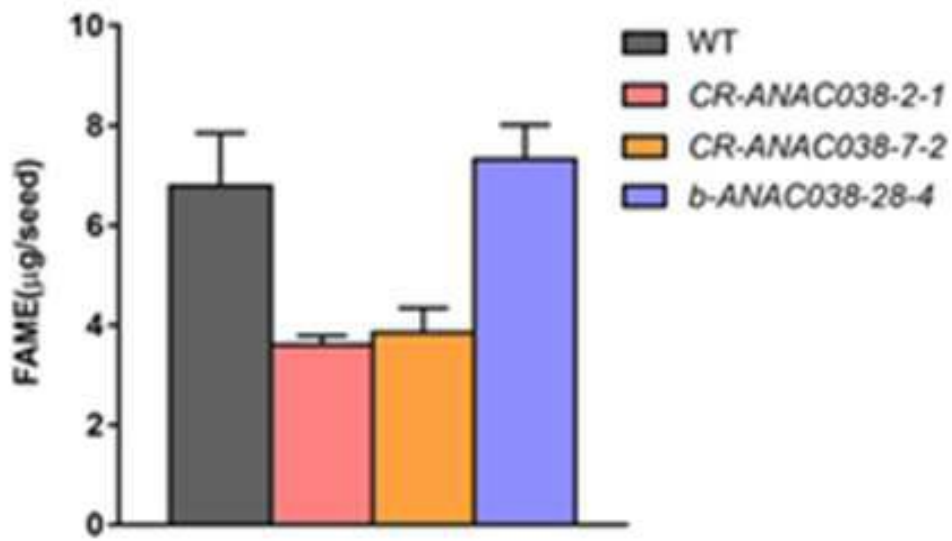
도면16b



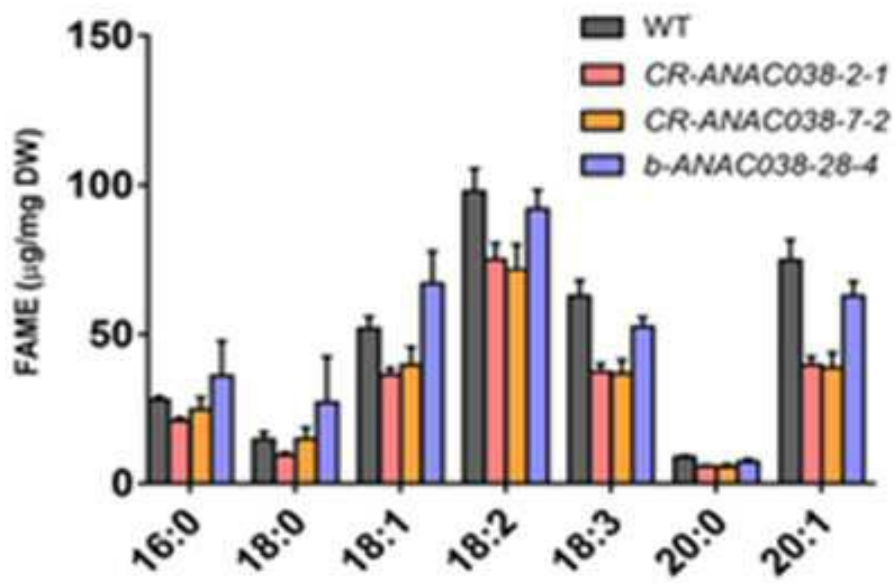
도면16c



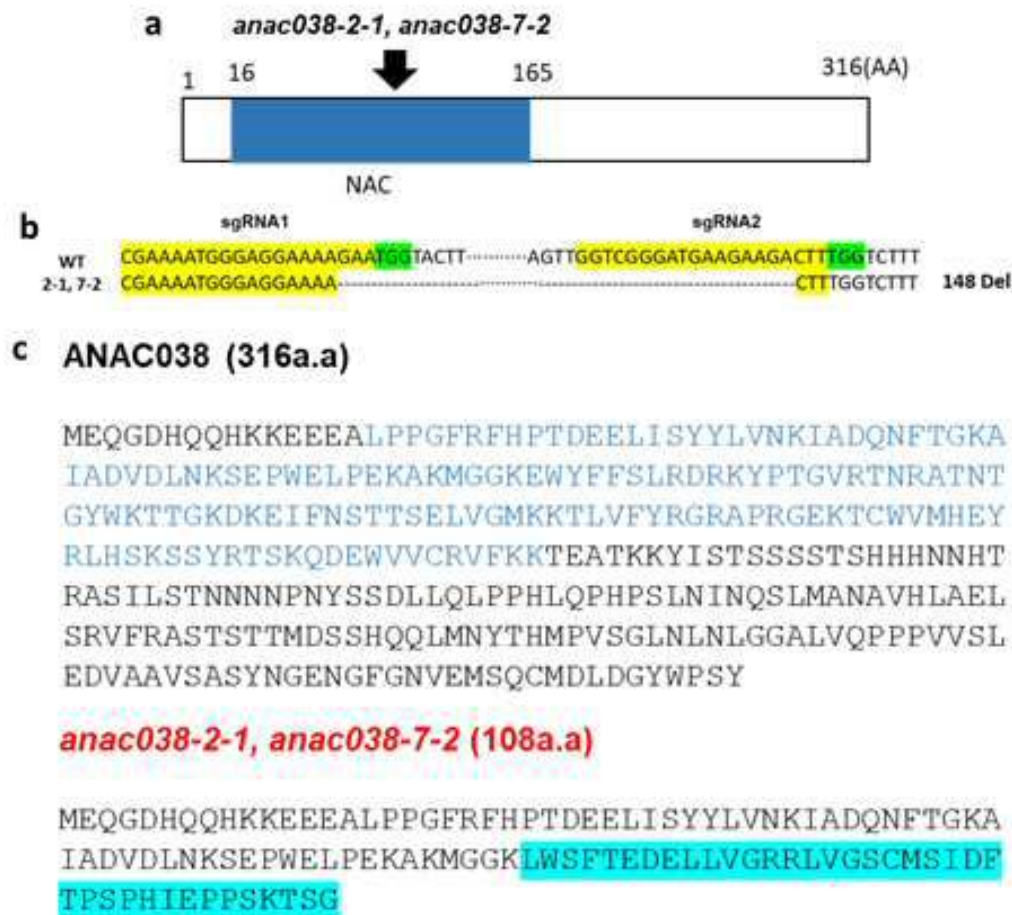
도면16d



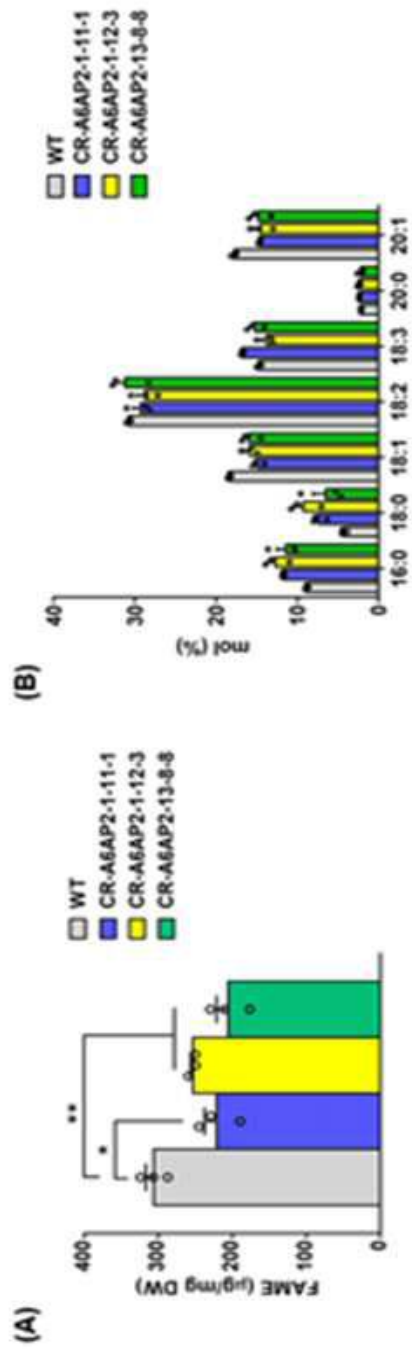
도면16e



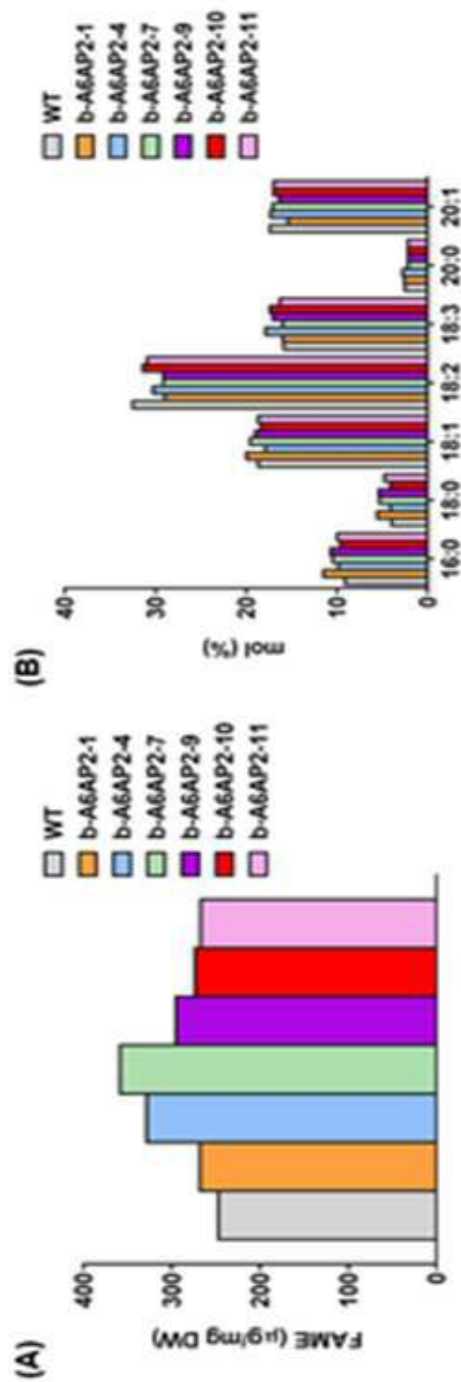
도면17



도면18



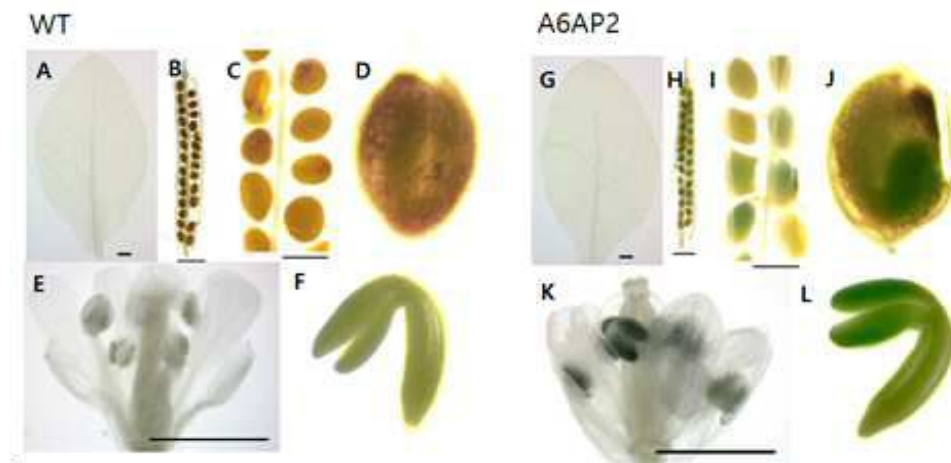
도면19



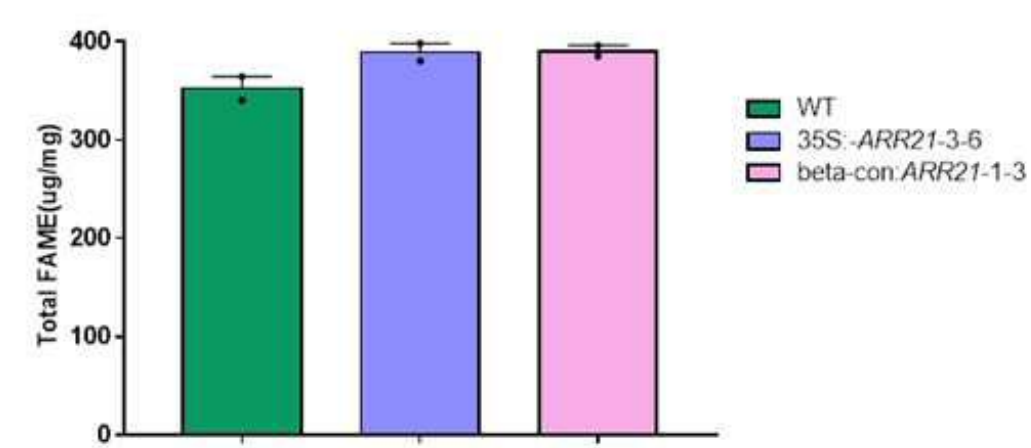
도면20



도면21



도면22



도면23

[illegible]

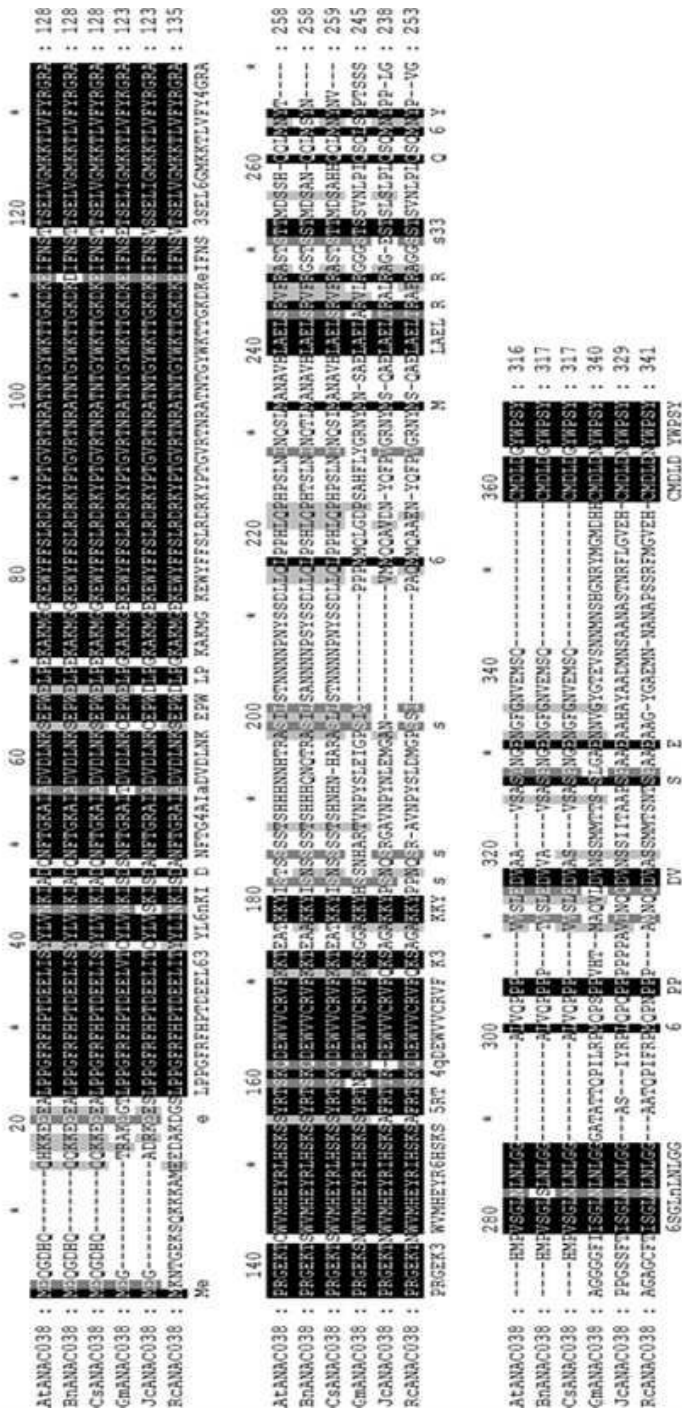
도면24

140
MAP T NWL3FSLSPNMLA3S 250765y ss R3 s Y 6DNRY W N K a a
160
180
200
220
240
260
280
300
320
340
360
380
400
420
440
460
480
500
520
540
560
580
600
620
640
660
680
700
720
740
760
780
800
820
840
860
880
900
920
940
960
980
1000
1020
1040
1060
1080
1100
1120
1140
1160
1180
1200
1220
1240
1260
1280
1300
1320
1340
1360
1380
1400
1420
1440
1460
1480
1500
1520
1540
1560
1580
1600
1620
1640
1660
1680
1700
1720
1740
1760
1780
1800
1820
1840
1860
1880
1900
1920
1940
1960
1980
2000
2020
2040
2060
2080
2100
2120
2140
2160
2180
2200
2220
2240
2260
2280
2300
2320
2340
2360
2380
2400
2420
2440
2460
2480
2500
2520
2540
2560
2580
2600
2620
2640
2660
2680
2700
2720
2740
2760
2780
2800
2820
2840
2860
2880
2900
2920
2940
2960
2980
3000
3020
3040
3060
3080
3100
3120
3140
3160
3180
3200
3220
3240
3260
3280
3300
3320
3340
3360
3380
3400
3420
3440
3460
3480
3500
3520
3540
3560
3580
3600
3620
3640
3660
3680
3700
3720
3740
3760
3780
3800
3820
3840
3860
3880
3900
3920
3940
3960
3980
4000
4020
4040
4060
4080
4100
4120
4140
4160
4180
4200
4220
4240
4260
4280
4300
4320
4340
4360
4380
4400
4420
4440
4460
4480
4500
4520
4540
4560
4580
4600
4620
4640
4660
4680
4700
4720
4740
4760
4780
4800
4820
4840
4860
4880
4900
4920
4940
4960
4980
5000
5020
5040
5060
5080
5100
5120
5140
5160
5180
5200
5220
5240
5260
5280
5300
5320
5340
5360
5380
5400
5420
5440
5460
5480
5500
5520
5540
5560
5580
5600
5620
5640
5660
5680
5700
5720
5740
5760
5780
5800
5820
5840
5860
5880
5900
5920
5940
5960
5980
6000
6020
6040
6060
6080
6100
6120
6140
6160
6180
6200
6220
6240
6260
6280
6300
6320
6340
6360
6380
6400
6420
6440
6460
6480
6500
6520
6540
6560
6580
6600
6620
6640
6660
6680
6700
6720
6740
6760
6780
6800
6820
6840
6860
6880
6900
6920
6940
6960
6980
7000
7020
7040
7060
7080
7100
7120
7140
7160
7180
7200
7220
7240
7260
7280
7300
7320
7340
7360
7380
7400
7420
7440
7460
7480
7500
7520
7540
7560
7580
7600
7620
7640
7660
7680
7700
7720
7740
7760
7780
7800
7820
7840
7860
7880
7900
7920
7940
7960
7980
8000
8020
8040
8060
8080
8100
8120
8140
8160
8180
8200
8220
8240
8260
8280
8300
8320
8340
8360
8380
8400
8420
8440
8460
8480
8500
8520
8540
8560
8580
8600
8620
8640
8660
8680
8700
8720
8740
8760
8780
8800
8820
8840
8860
8880
8900
8920
8940
8960
8980
9000
9020
9040
9060
9080
9100
9120
9140
9160
9180
9200
9220
9240
9260
9280
9300
9320
9340
9360
9380
9400
9420
9440
9460
9480
9500
9520
9540
9560
9580
9600
9620
9640
9660
9680
9700
9720
9740
9760
9780
9800
9820
9840
9860
9880
9900
9920
9940
9960
9980
10000

도면 26

[illegible]

도면27



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.