(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 8 월 22 일 (22.08.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/172594 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/113 (2010.01) *A01H 6/46* (2018.01)
C12N 9/22 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) *C12Q 1/6844* (2018.01)
A01H 1/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/095296

(22) 국제출원일: 2024 년 2 월 16 일 (16.02.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0020944 2023 년 2 월 16 일 (16.02.2023) KR

(71) 출원인: 부산대학교 산학협력단 (**PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 46241 부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2, Busan (KR). 경희대학교 산학협력단 (**UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY**) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

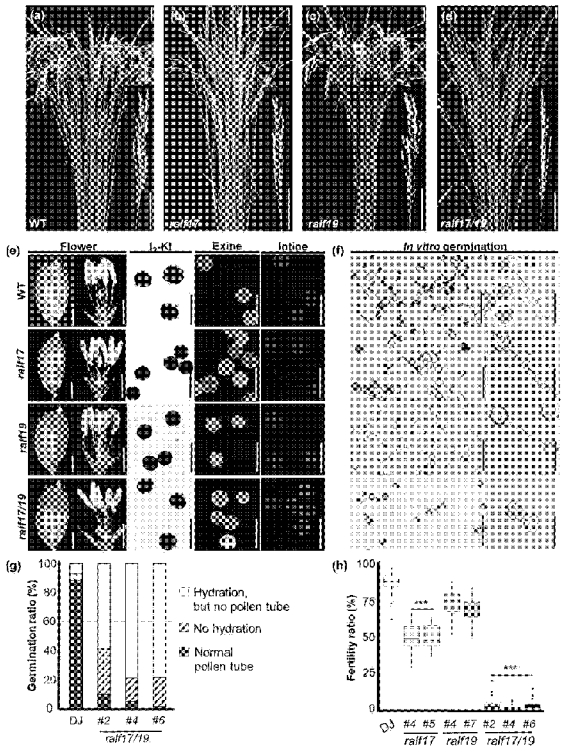
(72) 발명자: 김유진 (**KIM, Yu Jin**); 50463 경상남도 밀양시 삼랑진읍 삼랑진로 1268-50, Gyeongsangnam-do (KR). 정기홍 (**JUNG, Ki Hong**); 16691 경기도 수원시 영통구 영통로154번길 56, Gyeonggi-do (KR). 김의정 (**KIM, Eui Jung**); 16840 경기도 용인시 수지구 풍덕천로 76, 909-804, Gyeonggi-do (KR). 김지현 (**KIM, Ji Hyun**); 50463 경상남도 밀양시 삼랑진읍 삼랑진로 1268-50, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 정진 (**JUNGJIN IP LAW FIRM**); 08381 서울특별시 구로구 디지털로 29길 38, 505, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING MALE STERILE RICE USING OS01G10470 AND OS05G11330 GENES, COMPOSITION FOR INDUCING MALE STERILITY IN RICE, AND MALE STERILE RICE

(54) **발명의 명칭:** OS01G10470 및 OS05G11330 유전자를 이용한 웅성불임 벼의 제조방법, 벼의 웅성불임 유도용 조성물 및 웅성불임 벼



(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for producing male sterile rice and the male sterile rice produced thereby. According to the present invention, when the genes *Os01g10470* and *Os05g11330* are mutated to suppress their expression and function, pollen germination and pollen tube growth are reduced, leading to male sterility. Thus, the method for producing male sterile lines through the regulation of *Os01g10470* and *Os05g11330* gene activity, and the male sterile lines produced therefrom, which are to effectively improve traditional breeding methods, can be used stably with little environmental impact, significantly contributing to the advancement of the rice breeding industry.

(57) **요약서:** 본 발명은 웅성불임 제조방법 및 이로부터 제조된 웅성불임 벼에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 *Os01g10470* 유전자 및 *Os05g11330* 유전자가 돌연변이되어 발현 억제 및 기능이 억제되는 경우, 화분 발아 및 화분관 신장이 감소되어 웅성불임이 야기된다. 따라서 본 발명에 따른 *Os01g10470* 유전자 및 *Os05g11330* 유전자의 활성 조절을 통한 웅성불임 계통 제조방법 및 이로부터 제조된 웅성불임 계통은 기존의 육종 방식을 효과적으로 개선하기 위한 것으로, 환경의 영향을 거의 받지 않고 안정적으로 이용할 수 있어 벼 육종산업의 발전에 크게 기여할 수 있다.

WO 2024/172594 A1

[다음 쪽 계속]

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: OS01G10470 및 OS05G11330 유전자를 이용한 웅성불임 벼의 제조방법, 벼의 웅성불임 유도용 조성물 및 웅성불임 벼

기술분야

[1] 본 발명은 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자를 이용한 웅성불임 벼의 제조방법, 벼의 웅성불임 유도용 조성물 및 웅성불임 벼에 관한 것이다.

배경기술

[2] 벼(*Oryza sativa* L.)는 국내는 물론 전 세계 나라 중 3분의 1 이상에서 주식으로 삼고 있는 작물이다. 경제적으로 중요한 농작물 중 하나이며 생산량 증대를 위하여 많은 연구가 수행되고 있다. 벼의 생산량 증대를 위해 웅성불임 도입을 통한 F1 하이브리드 생산은 모든 세계 연구자가 주목하고 있는 기술개발이다. 웅성불임을 유도하는 기술에는 유전자적 웅성불임(genetic male sterility, GMS)과 세포질적 웅성불임(cytoplasmic male sterility, CMS)이 존재한다. 벼에서도 세포질적 웅성불임의 적용이 가능하나, 생산비용이나 그 활용도 측면에서 현실적이지 못하다는 단점이 있다. 유전자 조작에 의한 웅성불임 돌연변이체 개발 방식에는 타페튬(tapetum) 특이적 프로모터를 이용하면서 외부 독성유전자(박테리아 또는 식물체 유전자)를 이용하여 선택적인 수술 조직의 사멸을 유도함으로써 웅성불임을 만드는 방법이 이용되고 있다.

[3] 한편, 꽃 피는 식물에서 화분(pollen)의 형성과 이후의 수분 및 수정은 성적 생식을 위한 결정적인 단계이다. 소포자(microspore)의 화분 발달은 일련의 조정된 세포 사건을 포함하며, 성숙한 화분은 빠르게 발아하고 영양 세포에서 유래된 극성장 화분관(pollen tube, PT)을 생산하며 두 개의 정자 세포를 배낭에 전달하는 특수 기능을 가지고 있다. 정상적인 수정 및 수정 능력에 있어서 효율적이고 신속한 화분 발아 및 화분관 신장이 중요한 것으로 알려졌다.

[4] 벼의 화분 발아 및 관 성장에 영향을 미치는 돌연변이에 있어서, 현재 극히 일부의 유전자가 기능적으로 규명되었다. 예를 들어, 벼 OsSUT1(Sucrose Transporter1)의 돌연변이가 웅성불임을 일으킨다. OsSUT1 돌연변이 화분립은 일반적으로 발달 중에 전분을 축적하지만, 발아 및 난자와 수정을 하지 않는다. 다른 예로, 벼의 OsSPS1(Sucrose Phosphate Synthase1) 유전자가 파괴되면 불임 화분이 형성된다고 알려져 있다. OsSPS1 유전자가 파괴된 돌연변이체는 화분에 충분한 전분을 축적하였지만, 발아 효율은 야생형의 절반으로 감소된 것을 확인되었다.

[5] 현재까지 벼의 화분 발아 및 화분관 신장 등에 영향을 미치는 유전자에 대한 연구는 극히 제한적으로 이루어진 바, 이외 웅성불임을 야기할 수 있는 유전자에 대한 더 많은 연구가 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명자들은 벼의 특정 유전자의 발현이 억제되어 이의 기능이 결실되는 경우, 화분 발아 및 화분관 신장이 감소되어 웅성불임이 야기되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[7] 따라서 본 발명의 목적은 웅성불임 벼의 제조방법을 제공하는 것이다.

[8] 본 발명의 또 다른 목적은 웅성불임 벼를 제공하는 것이다.

[9] 본 발명의 또 다른 목적은 벼의 웅성불임 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 벼의 웅성불임성 확인용 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 벼의 웅성불임 유도제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 벼의 임성 회복 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 벼의 임성 회복용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[15] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼에서 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 웅성불임 벼의 제조방법을 제공한다.

[16] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현이 억제된, 웅성불임 벼를 제공한다.

[17] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물을 제공한다.

[18] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법을 제공한다.

[19] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물을 제공한다.

[20] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 후보물질을 처리한 벼에서 *Os01g10470* 유전자 및 *Os05g11330* 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[21] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Os01g10470* 유전자 및 *Os05g11330* 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 계통 벼에서, *Os01g10470* 유전자 또는 이의 단백질을 과발현시키는 단계를 포함하는, 벼의 임성 회복 방법을 제공한다.

[22] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는, 벼의 임성 회복용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[23] 본 발명은 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현 억제 및 기능이 억제된 웅성불임 벼의 제조방법 및 이로부터 제조된 웅성불임 벼에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현 억제 및 기능이 억제된 벼에서 화분 발아 및 화분관 신장이 감소되어 웅성불임이 야기되는 것을 확인하였다. 본 발명에 따른 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 활성 조절을 통한 웅성불임 계통 제조방법 및 이로부터 제조된 웅성불임 계통은 기존의 육종 방식을 효과적으로 개선하기 위한 것으로, 환경의 영향을 거의 받지 않고 안정적으로 이용할 수 있어 벼 육종산업의 발전에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 벼에 포함된 RALF 계열 유전자를 확인한 결과로, 도 1(a)는 벼와 애기장대(Arabidopsis)의 RALF(rapid alkalinization factor) 아미노산 서열의 계통발생수(Phylogenetic tree)를 나타낸 결과이고, 도 1(b)는 벼와 애기장대 RALF의 아미노산을 정렬하여 클레이드(Clade) 클러스터(cluster)를 확인한 결과이다. 화살표는 펩타이드 처리를 위한 표준 RR-X-L 절단 모티프(cleavage motif)를 의미한다.

[25] 도 2는 다양한 벼 조직에서 41개 OsRALF 계열 유전자의 마이크로어레이 발현 분석(Microarray expression analysis)을 계통수를 사용하여 수행한 결과이다. 블랙박스의 하위 그룹에서 빨간색 별표로 표시된 유전자는 후기 화분 발달 단계에서 높은 발현을 갖는다.

[26] 도 3은 CRISPR-Cas9을 이용한 유전자 편집을 통한 OsRALF의 동형접합 돌연변이체 생성에 대한 결과이다. 도 3(a)는 *ralf17* 단독 넉아웃 돌연변이체 생성에 대한 것이고, 도 3(b)는 *ralf19* 단독 넉아웃 돌연변이체 생성에 대한 것이며, 도 3(c)는 *ralf17/19* 동시 넉아웃 돌연변이체 생성에 대한 것이다.

[27] 도 4는 *ralf17/19* 돌연변이체의 형태 및 웅성불임성을 확인한 결과이며, 도 4(a) 내지 도 4(d)는 논에서 자란 야생형 벼(wild type, WT), *ralf17, ralf19*, 및 *ralf17/19*의 전체 식물 및 종자 형태를 확인한 결과로, 하얀색 바(bars)는 5cm를 나타낸다. 도 4(e)는 야생형 및 돌연변이체의 소수(Spikelet) 및 꽃을 입체 현미경으로 촬영하고, 화분립(pollen grain)을 염색한 후 GFP 및 UV 형광 현미경으로 촬영한 결과이며, 꽃의 경우 바는 2mm를 의미하고, 화분립의 경우 80μm을 의미한다. 도 4(f)는 야생형 및 돌연변이체의 체외(In vitro) 화분 발아(germination)을 확인한 결과로, 왼쪽 도면의 바는 400μm를 나타내고, 오른쪽 도면의 바는 80μm를 나타낸다. 도 4(g)는 야생형 및 돌연변이체의 체외 발아율(in vitro germination ratio)에 대한 누적 막대그래프를 나타내는 것으로, 파란색 빗금 막대는 수분이 공급되지 않은 화분의 비율을 나타내고, 흰색 막대는 수분이 공급되었지만 화분관(pollen

tube)으로 나오지 않은 화분의 비율을 나타내며, 진한 파란색 막대는 정상적인 수화(hydration) 및 화분관 성장을 보이는 화분의 비율을 나타낸다. 도 4(h)는 야생형과 돌연변이체의 종자 형성 비율(fertility ratio)을 나타낸 결과로, 상자 그림(boxplot) 상단과 하단의 선은 오차 한계(margin of error)를 나타내고, 점은 표준 편차(standard deviation)를 벗어난 값을 나타낸다. Unpaired t-test를 수행하여 유의미한 차이를 결정하였으며, ***는 $p<0.0001$을 나타낸다.

[28] 도 5는 야생형과 *ralf17/19* 돌연변이체의 화분관 성장을 확인한 결과로, 도 5(a)는 야생형을 염색한 결과이고, 도 5(b) 및 도 5(c)는 *ralf17/19* 돌연변이체를 염색한 결과이며, 강한 염색(분홍색)은 화분립 및 화분관을 나타낸다. 암술(pistill) 및 암술머리(stigma)에 있어서 바는 100μm을 나타낸다. 도 5(d)는 암술에 있는 화분관의 통계 분석 결과로, 야생형 또는 *ralf17/19*에 대해 n>50의 암술을 사용하였으며, 오차 막대(Error bar)는 생물학적 3회 반복의 표준 편차를 나타낸다.

[29] 도 6은 야생형과 *ralf17/19* 돌연변이체의 유전자 및 단백질 발현을 확인한 결과로, 도 6(a)는 WT 및 *ralf17/19*의 전사체 및 단백질체 분석 결과를 보여주는 벤 다이어그램(Venn diagram)결과이고, 도 6(b)는 DEG(differentially expressed genes) 및 DEP(differentially expressed proteins)에서 공통적으로 증가(왼쪽 열) 또는 감소(오른쪽 열)를 나타내는 그룹의 GO(Gene ontology) 분석 결과이다.

[30] 도 7은 야생형 벼에 다양한 농도(0 내지 1μM)의 합성된 OsRALF17 (RALF17M)을 처리하고 화분관의 길이를 확인한 결과이다.

[31] 도 8은 *ralf17/19* 돌연변이체에 RALF17M 처리가 미치는 영향을 확인한 결과이며, 도 8(a)는 다양한 농도(0.0005, 0.1 또는 1μM)의 합성된 OsRALF17 (RALF17M)을 처리하고 화분의 발아를 확인한 결과로, 바는 100μm을 의미한다. 도 8(b)는 WT 및 돌연변이체의 체외 발아율에 대한 누적 막대그래프 결과이다. 파란색 빗금 막대는 수분이 공급되지 않은 화분의 비율을 나타내고, 흰색 막대는 수분이 공급되었지만 화분관으로 나오지 않은 화분의 비율을 나타내며, 진한 파란색 막대는 정상적인 수화 및 화분관 성장을 보이는 화분의 비율을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

[32] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[33] 본 발명자들은 웅성불임이 유도된 벼를 제조하기 위하여 다양한 연구를 수행하던 중, *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자가 화분 발아 및 화분관 신장에 관여하는 유전자임을 확인하고, *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 기능을 억제하여 웅성불임 벼를 제조할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[34] 따라서 본 발명은 벼에서 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 웅성불임 벼의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 유전자의 발현 억제는 상기 유전자의 기능의 억제 또는 저하와 상호 교환적으로 사용가능하다.

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

[36] 본 발명에 있어서, 상기 *"Os01g10470"*는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 유전자를 의미할 수 있으나, 이와 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

[37] 본 발명에 있어서, 상기 "*Os05g11330*"는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 유전자를 의미할 수 있으나, 이와 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

[38] 상기 실질적인 동일성은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 또는 상기 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 유전자가 코딩하는 단백질 *Os01g10470* 또는 *Os05g11330*과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 의미할 수 있다. 본 발명에 있어서 상기 *Os01g10470* 유전자는 "RALF17(rapid alkalinization factor 17) 유전자"로 명명될 수 있고, 상기 *Os05g11330* 유전자는 "RALF19 유전자"로 명명될 수 있다.

[39] 본 발명에 있어서, 상기 "웅성불임"은 웅성기관의 형태적 또는 기능적 이상 때문에 수분, 수정, 종자 형성이 이루어지지 않는 현상을 의미하며, 환경적인 일시적 변이로서 발현하는 경우와 유전형질로서 발현하는 경우가 있으나, 본 발명에서의 웅성불임은 유전형질로서 유도되는 것일 수 있다. 특히, 본 발명에서의 웅성불임은 화분 발아 및 화분관 신장에 관여하는 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현 또는 기능을 억제하여 유도되는 것일 수 있다.

[40] 본 발명에서 상기 단계는 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 1bp 이상의 일부 염기를 결손 또는 삽입하여 이루어지는 것일 수 있으며, 예를 들어 전장 DNA 중 10%, 구체적으로는 0.01% 이상의 염기를 결손 또는 삽입하여 이루어지는 것일 수 있다. 더불어 상기 단계는 당 분야에 공지된 다양한 유전자 편집 방법에 의해 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 CRISPR-Cas9에 의한 유전자 편집에 의해 이루어질 수 있다.

[41] 본 발명에 있어서, 상기 *Os01g10470* 유전자의 발현 억제는 *Os01g10470* 유전자의 296 내지 302번째 위치의 1bp 이상의 염기를 결손시켜 이루어지는 것일 수 있다. 상기 296 내지 302번째 위치의 염기는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 유전자의 첫 번째 위치의 ATG(개시코돈)의 A를 첫 번째 염기로 하는 것을 특징으로 한다. 상기 296 내지 302번째 위치의 염기서열은 TGAGCTA 일 수 있으며, 상기 296 내지 302번째 위치의 TGAGCTA이 결손된 *Os01g10470* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[42] 더불어 본 발명에 있어서, 상기 *Os01g10470* 유전자의 발현 억제는 *Os01g10470* 유전자의 300 및 301번째 위치의 염기를 결손시켜 이루어지는 것일 수 있다. 상기 300 및 301번째 위치의 염기는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 유전자의 첫 번째 위치의 ATG(개시코돈)의 A를 첫 번째 염기로 하는 것을 특징으로 한다. 상기 300 및 301번째 위치의 염기서열은 CT 일 수 있으며, 상기 300 및 301번째 위치의 CT가 결손된 *Os01g10470* 유전자는 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[43] 본 발명에 있어서, 상기 *Os05g11330* 유전자의 발현 억제는 *Os05g11330* 유전자의 267번째 위치에 염기를 삽입시켜 이루어지는 것일 수 있다. 상기 267번째 위치의 염기는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 유전자의 첫 번째 위치의 ATG(개시코돈)의 A를 첫 번째 염기로 하는 것을 특징으로 하며, 상기 267번째 위치에 아데닌(A) 또는 티민(T)의 염기가 삽입된 것을 특징으로 한다. 상기 267번째 위치에 아데닌(A)이 삽입된 *Os05g11330* 유전자는 서열번호 5로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한 267번째 위치에 티민(T)이 삽입된 *Os05g11330* 유전자는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

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

[45] 본 발명에 있어서, 상기 "T-DNA"는 아그로박테리움(Agrobacterium) 종의 Ti(tumor-inducing) 플라스미드내의 전달(transfer) DNA로서 숙주 식물세포의 핵으로 전달되는 DNA 절편을 말한다. T-DNA의 양 끝 가장자리에는 25 bp의 반복서열이 존재하며, 전달은 왼쪽 경계(border)에서 전달이 시작되어 오른쪽 경계에서 종료된다. 박테리아 T-DNA는 약 20,000bp 길이로서 이들의 삽입에 의하여 타겟 유전자를 붕괴시킴으로서 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis)를 일으키는 데에 사용되며, 삽입된 T-DNA 서열은 돌연변이를 일으킬 뿐 아니라 타겟 유전자를 표지하기도 한다.

[46] 본 발명에 있어서 웅성불임 벼의 제조 방법은 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현이 억제된 벼를 모본으로 하여, 웅성 가임의 벼와 교배시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이와는 반대로 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현이 억제된 벼를 부본으로 하여, 야생형 모본과 교배시키는 단계를 추가로 포함하게 되면 웅성불임의 벼를 제조할 수 없음은 본 분야의 당업자에게 자명한 사실이다.

[47] 상기 교배 방법은 기존 공지된 방법 중 어느 것을 사용해도 무관하며, 예를 들어 가장 일반적으로 벼 교배 육종에 가장 많이 사용하는 절영법을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[48] 더불어 본 발명은 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현이 억제된, 웅성불임 벼를 제공한다.

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

[50] 또한 본 발명은 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물을 제공한다.

[51] 상기 제제는 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자 또는 mRNA에 직접 또는 간접적으로 결합하여 *Os01g10470* 및 *Os05g11330*의 발현을 억제할 수 있는 물질을 의미한다.

[52] 예를 들어 상기 제제는 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acid) 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 즉, 상기siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acid) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 *Os01g10470* 및/또는 *Os05g11330* 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하여 *Os01g10470* 및/또는 *Os05g11330* 단백질 합성을 위한 번역을 억제할 수 있다.

[53] 본 발명에 있어서, 상기 "siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운 방법이다.

[54] 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음)등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기 , 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 타겟 유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

[55] 본 발명에 있어서, 상기 "shRNA(short hairpin RNA)"는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드를 의미하며, in vivo상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를

이루고 있다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.

[56] 본 발명에 있어서, 상기 "miRNA(microRNA)"는 유전자 발현을 조절하며, 전장 20-50개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 20-45개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 20-40개 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 20-30개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 21-23개의 뉴클레오타이드로 구성된 단일 가닥 RNA분자를 의미한다. miRNA는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드이며, 짧은 스템-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는 2 이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며, 상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.

[57] 본 발명에 있어서, 상기 "리보자임(ribozyme)"은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 되어 있다.

[58] 본 발명에 있어서, 상기 "PNA(Peptide nucleic acid)"는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로, 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다.

[59] 상기 PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.

[60] 본 발명에 있어서, 상기 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

[61] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.

[62] 더불어 본 발명은 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자 발현 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법을 제공한다.

[63] 상기 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자 발현 여부를 측정하는 단계에 있어서, 대상 벼의 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현 여부를 측정하여 그 발현이 억제된 경우 상기 대상 벼가 웅성불임인 것으로 판정할 수 있다.

[64] 상기 웅성불임성을 확인하는 방법은 상기 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 mRNA 수준 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하여 이루어지는 것일 수 있다.

[65] 상기 유전자의 mRNA 수준은 별도의 제제를 이용하여 측정할 수 있다. 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 예를 들어 상기 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[66] 본 발명에 있어서, 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.

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

[68] 상기 단백질의 수준은 별도의 제제를 이용하여 측정할 수 있다. 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 예를 들어 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[69] 본 발명에 있어서, 상기 "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미한다. 이러한 항체는, 각 유전자

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

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

[71] 상기 단백질의 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블릿(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbentassay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[72] 또한 본 발명은 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물을 제공한다.

[73] 상기 제제는 상기 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[74] 상기 제제는 상기 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[75] 더불어 본 발명은 후보물질을 처리한 벼에서 *Os01g10470* 유전자 및 *Os05g11330* 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[76] 상기 방법은 상기 측정된 발현량이, 후보물질을 처리하지 않은 벼의 발현량에 비하여 억제되었을 경우, 처리된 후보물질을 벼의 웅성불임 유도제로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[77] 또한 본 발명에 있어서, 상기 *Os01g10470* 유전자 및 *Os05g11330* 유전자의 돌연변이에 의한 벼의 웅성불임은 가역적인 것일 수 있다. 즉, 상기 웅성불임의 벼의 임성은 정상적인 *Os01g10470* 유전자 또는 펩타이드의 도입에 의해서 회복될 수 있다.

[78] 본 발명의 일실시예에 따르면 *Os01g10470* 유전자 및 *Os05g11330* 유전자가 넉아웃된 돌연변이체에 합성된 *Os01g10470* 펩타이드를 외인성(Exogenous) 처리한 경우, 화분관의 성장 및 발아율이 증가되어 웅성불임이 개선됨을 확인하였다.

[79] 따라서 본 발명은 *Os01g10470* 유전자 및 *Os05g11330* 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 계통 벼에서, *Os01g10470* 유전자 또는 이의 단백질을 과발현시키는 단계를 포함하는, 벼의 임성 회복 방법을 제공한다.

[80] 상기 *Os01g10470* 유전자의 과발현은 당 분야에 공지된 방법이라면 제한없이 적용 가능하며, 바람직하게는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 처리하여 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[81] 또한 본 발명은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는, 벼의 임성 회복용 조성물을 제공한다.

[82] 본 발명의 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 범위에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 발명의 펩타이드와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이를 포함하는데에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.

[83] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 곁사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 곁사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

[84] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신 (+4.5); 발린 (+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스타인 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글라이신 (-0.4); 트레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 타이로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5).

[85] 펩타이드의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유할 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

[86] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 펩타이드를 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (+3.0); 아스팔테이트(+3.0±1); 글루타메이트 (+3.0±1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글라이신 (0); 쓰레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5±1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 루이신 (-1.8); 아이소루이신 (-1.8); 타이로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4).

[87] 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

[88] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

[89] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 펩타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열 비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있는 어떤 방법이라도 제한없이 사용할 수 있다.

[90] 더불어 본 발명의 일실시예에 있어서, *Os01g10470* 유전자 및 *Os05g11330* 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 계통 벼에 상기 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 다양한 농도로 처리한 경우, 0.5μM 이상의 농도에서는 발아하지 않는 것을 확인하였다. 따라서 상기 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 0.0001μM 내지 0.45 μM 농도로 처리될 수 있으며, 바람직하게는 0.0001μM 내지 0.1 μM 농도로 처리될 수 있고, 보다 바람직하게는 0.0005μM 내지 0.1 μM 농도로 처리될 수 있다.

[91]

[92] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[93]

[94] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[95]

[96] **실험예 1. 분석 방법**

[97] **1-1. 유전자 식별 및 계통 발생(phylogenetic) 분석**

[98] Pfam 도메인 검색을 사용하여 Rice Genome Annotation Project(RGAP, / rice.uga.edu/)에서 RALF 단백질을 확인하였다. 또한 벼와 애기장대에서의 RALF 단백질의 계통수(phylogenetic tree)를 구성하기 위해 Arabidopsis Information Resource (TAIR, https:/www.arabidopsis.org/) and Phytozome (https:/phytozome-next.jgi.doe.gov/) platform에서 유전자좌 ID와 함께 단백질 서열을 수집하였다. 그 후 ClustalX를 사용하여 아미노산 서열의 다중 정렬(Multiple alignment)을 수행하였다. 더불어 당분야에 공지된 방법에 따라 MEGA11에서 1,000개의 부트스트랩 반복(bootstrap repeat) 및 이웃 연결 방법(neighbor-joining method)을 사용하여 계통 발생 분석을 수행하였다. 또한 당 분야에 공지된 CAFRI-Rice를 사용하여 Heatmap 및 Pearson의 상관 계수(Pearson's correlation coefficient, PCC) 발현 값 분석을 수행하였다.

[99]

[100] **1-2. RNA 추출 및 실시간 정량 RT-PCR(real-time quantitative RT-PCR)**

[101] RNeasy Mini Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 성숙한 화분이 포함된 벼 꽃밥 조직에서 총 RNA를 추출하였다. 그런 후, 1 μg의 총 RNA를 역전사를 위한 주형으로 사용하고 gDNA 이레이저(Eraser)가 포함된 RT 시약 키트(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 사용하여 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)를 합성하였다. 정량 역전사 PCR(qRT-PCR)의 경우 20μL 반응 부피의 25ng cDNA와 QuantiNovaSYBR Green PCR Kit(QIAGEN)를 사용하였다. Real-time qRT-PCR은 하기 조건하에 CFX Connect Real-Time PCR Detection System(BIO-RAD, California, USA)을 사용하여 수행하였다: 95℃에서 2분, 이어서 95℃에서 5초의 40 사이클(cycle) 및 60℃에서 15초. 각 샘플에 대한 주형 풍부도(abundance)의 상대적 배수 차이를 계산하기 위해 사이클(Ct) 값의 임계값(threshold)을 *OsUbi1*의 Ct 값으로 정규화하고 공식 $2^{-\Delta\Delta Ct}$를 사용하여 교정기(calibrator)에 대해 계산하였다. 모든 qRT-PCR 실험은 3번 반복하여 수행하였으며, 이를 위해 사용한 프라이머는 하기 표에 나타내었다.

[102]

[103] [표1]

RALF17-qRT-F	GACGAACAGGTACGTGAGCT
RALF17-qRT-R	AGTTGGTATTGCGAGCGCAT
RALF19-qRT-F	AAGCCGACGAACCGGTACGT
RALF19-qRT-R	TCAGTTCATGTTGCGGGAGC

[104]

[105] **1-3. 표현형(phenotype)의 특성 확인**

[106] 벼와 원추화서(panicle)는 Canon EOS 550D 카메라(Canon, Tokyo, Japan)를 사용하여 촬영하였다. 묘목(seedling), 꽃 및 꽃밥(anther)은 SZX61 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 촬영하였다. 화분(pollen) 성숙을 확인하기 위해 12~13기의 꽃밥을 채취하고 핀셋으로 화분립(pollen grain)을 수득하였다. 화분립의 전분, 인틴(intine) 및 엑신(exine)은 각각 실온에서 1% I_2-KI, 0.1% 칼코플루오르 화이트(calcofluor white(Sigma-Aldrich, Missouri, United States)) 및 0.001% 아우라민 O (Auramine O (Sigma-Aldrich))로 염색하였다. 염색된 화분립은 BX61 현미경(Olympus)을 사용하여 촬영하였다. 시험관 내 화분의 발아(germination) 및 관 형태(tube morphology)를 관찰하기 위해, 완전히 성숙한 화분립을 꽃밥의 열개직후, 화분발아배지(pollen germination medium, PGM)에 직접 수집하였다. 화분발아배지는 20%(w/v) 수크로오스(sucrose), 10% 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 4000, 3mM 질산칼슘(calcium nitrate), 40 mg/L 붕산(boric acid) 및 10mg/L 비타민 B1(pH 6.8-7.0)로 구성되었다. 1% 아가로오스가 포함되어 응고된 고체 화분발아배지의 슬라이드에 화분립을 수집한 후 커버 글라스(cover glass)로 덮고 20-30분 동안 어두운 곳에서 28℃의 습한 챔버(chamber)에서 배양하였다. 각 검사당 최소 120개의 화분립을 이용해 3회 발아율을 측정하였다. 아닐린 블루(aniline blue) 염색을 위해, 꽃밥의 열개 후, 3-4시간 후에 신선한 심피(carple)를 수집하여 Carnoy 용액에 직접 고정하였다. 고정된 심피를 세척하고, 1M NaOH로 중화한 후, 당분야에 공지된 방법으로 0.05% 아닐린 블루(Sigma-Aldrich)로 염색하였다. 염색한 심피는 UV 조명 하에서 BX61 현미경을 사용하여 촬영하였다.

[107]

[108] **1-4. RALF17M 펩타이드 처리에 따른 효과 확인**

[109] >95% 순도를 갖는 RALF17M 펩타이드는 Bionics Inc(서울, 한국)에 의뢰하여 합성하였다. 상기 RALF17M 펩타이드는 예측된 절단 부위인 RRXL 모티프(motif)(도 1b 참고) 다음에 57개 아미노산 서열을 사용하여 합성하였다. 멸균된 순수한 물에 1mM 농도로 녹인 펩타이드를 사용하였고, -20℃에서 보관하였다. 액체 PGM 및 최소 150개의 화분립을 이용하여 RALF17M 펩타이드 처리에 따른 발아율과 화분관 길이를 확인하였다.

[110]

[111] **실시예 1. 벼에 포함된 RALF 계열 유전자 확인**

[112] 벼에서 모든 RALF 도메인 함유 서열을 얻기 위해 RGAP 데이터베이스(http://rice.plantbiology.msu.edu/)와 Pfam 데이터베이스(PF05498)에서 단백질 서열을 검색하였다. 그 결과 도 1(a) 및 도 2에 나타낸 바와 같이, 벼에서 총 41개의 유전자가 RALF로 추정되었고, 이들을 각각 OsRALF1 내지 OsRALF41로 명명하였다.

[113] OsRALF 펩타이드와 애기장대 RALF(AtRALF) 사이의 진화적 관계를 이해하기 위해 41개의 OsRALF와 당분야에 공지된 37개의 AtRALF 펩타이드의 아미노산 서열을 정렬하고 계통수를 구성하였다(도 1(a)). 그 결과, 대부분의 OsRALF는 클레이드(clades) I 및 II에서 AtRALF와 조상 계통(ancestral lineage)을 공유하는 반면 일부 OsRALF 및 클레이드 III AtRALF는 별도의 그룹을 형성함을 확인하였다. AtRALF 중 9개는 기존 보고된 바와 같이, 클레이드 I 내에서 클러스터를 형성하였으므로, 본 실시예의 계통 발생 분석의 신뢰성이 확인되었다. 벼에 있어서, 4개의 OsRALF(OsRALF14, 17, 18 및 19)가 클레이드 I 구성원과 클러스터되었고, 그 중 OsRALF17과 OsRALF19가 화분 조직에서 강한 발현 패턴을 보임을 확인하였다.

[114] 더불어 낮은 수준의 전체 아미노산 서열 유사성에도 불구하고 RALF 펩타이드에는 몇 가지 보존된 모티프가 확인되었다. 대부분의 OsRALF 유전자는 C-말단에 4개의 보존된 시스테인 잔기를 포함하였으며(도 1(b)), 이를 통해 이황화 결합을 형성하여 펩타이드의 활성 형태를 유지함을 확인하였다. 더불어 성숙한 형태의 OsRALF17(RALF17M)은 RRSL 뒤에 57개의 아미노산을 포함하고, 성숙한 형태의 OsRALF19(RALF19M)는 RRAL 뒤에 57개의 아미노산을 포함하였다. 한편, OsRALF17 및 OsRALF19는 펩타이드가 수용체에 결합하는 데 필요한 N-말단 YI/LSY 모티프와 프로-펩타이드(pro-peptide) 상태에서 성숙한 펩타이드로의 펩타이드 절단에 필요한 RRXL 모티프를 가지고 있는 반면, OsRALF17 및 19에 가장 가까운 펩티드인 OsRALF18은 모티프를 포함하지 않았다. 이를 통해 OsRALF17과 OsRALF19가 분비 경로에서 유사한 기능을 가지며 CrRLK1L 수용체에 결합할 수 있음을 예측하였다.

[115]

[116] **실시예 2. *RALF17* 유전자(*Os01g10470)* 및 *RALF19* 유전자(*Os05g11330)* 돌연변이체의 제작**

[117] **2-1. 식물 및 성장 조건**

[118] 야생형 벼(Wild-type(WT), (*Oryza sativa* L. spp. *japonica* cv. Dongin)와 형질전환 계통(Dongin 벼 기반)을 성장 챔버(growth chamber)에서 28℃(16시간 광(Light))/22℃(8시간 암(dark)) 및 70% 습도 조건하에서 온실 또는 LMO(living modified organism)-규제 환경의 논에서 재배하였다. 반강도(half-strength) MS(Murashige 및 Skoog) 배지에서 자란 10일된 유모를 추가 성장을 위해 토양으로 옮겼다.

[119]

[120] **2-2. CRISPR/Cas을 사용한 *RALF17* 유전자(*Os01g10470), RALF19* 유전자(*Os05g11330)* 단독 또는 동시 넉아웃 돌연변이체의 제작**

[121] CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 도 3(a) 내지 도 3(c)에 나타낸 바와 같이, 동형접합체 돌연변이를 제작하였다. CAFRI-Rice 및 CRISPRdirect 웹 소프트웨어를 사용하여 RALF17 유전자(*Os01g10470*) 단독(*ralf17*), RALF19 유전자(*Os05g11330*) 단독(*ralf19*) 또는 동시 넉아웃 돌연변이체(*ralf17/19*)를 생성하기 위한 가이드 RNA(Guide RNA, gRNA)를 설계하였다. 단독 돌연변이체(single mutant)의 경우, 합성된 gRNA 올리고머(oligomer)를 이합체화하였고(dimerized), 이중 돌연변이체(multiple mutant)의 경우 당분야에 공지된 방법에 따라 여러 gRNA를 골든 게이트 반응(golden gate reaction)을 통해 연결한 후 pRGEB32 이원 벡터(binary vector)(Addgene 플리스미드 번호: 63142)의 BsaI 부위에 결찰시켰다. 이때 클로닝에 사용한 프라이머 및 상기 gRNA는 하기 표 2에 나타내었다. *ralf17* 단독 돌연변이체의 경우, 첫번째 엑손에서 두 개의 표적 부위를 파괴하였다. 첫 번째 표적 부위는 286번째 위치에 아데닌(A) 또는 티민(T)의 염기가 삽입되었으며, 두 번째 표적 부위는 370~373번째 위치에 TCGC의 4개의 염기가 결실되거나 374번째 위치에 사이토신(C)의 염기가 삽입되었다. *ralf19* 단독 돌연변이체의 경우 첫번째 엑손에서 두 개의 표적 부위를 파괴하였다. 첫 번째 표적 부위는 259번째 위치에 아데닌(A) 또는 티민(T)의 염기가 삽입되었으며, 두 번째 표적 부위는 393-401번째 위치에 CTGCTCCCG의 9개의 염기가 결실되거나 396번째 위치에 티민(T)의 염기가 삽입되었다. ralf17/19 이중 돌연변이체의 경우, ralf17 및 ralf19 모두의 첫번째 엑손에서 하나의 표적 부위를 파괴하였다. *ralf17* 유전자의 경우 #2 개체는 296 내지 302번째 위치에 TGAGCTA의 7개의 염기가 결실되었으며, #6 개체는 300 내지 301번째 위치에 CT의 2개의 염기가 결실되었다. #2 개체는 *ralf19* 유전자에 있어서, 267번째 위치에 티민(T) 염기가 삽입되었으며, #6 개체는 *ralf19* 유전자에 있어서, 267번째 위치에 아데닌(A) 염기가 삽입되었다. 넉아웃 돌연변이체의 표적 위치 및 염기 변화는 도 3에 나타내었다.

[122]

[123] [표2]

RALF17_target1_gRNA-F	GGCA TAGCTCACGTACCTGTTCGT
RALF17_target1_gRNA-R	AAAC ACGAACAGGTACGTGAGCTA
RALF17_target2_gRNA-F	GGCA CCAGAACTGCGCCTCGCAGA
RALF17_target2_gRNA-R	AAAC TCTGCGAGGCGCAGTTCTGG
RALF19_target1_gRNA-F	GGCA TAGCTGACGTACCGGTTCGT

RALF19_target1_gRNA-R	AAAC ACGAACCGGTACGTCAGCTA
RALF19_target2_gRNA-F	GGCA AGTTCATGTTGCGGGAGCAG
RALF19_target2_gRNA-R	AAAC CTGCTCCCGCAACATGAACT
RALF1719_RALF17_mCas_F	TAGGTCTCC GTACGTGAGCTACG gttttagagctagaa
RALF1719_RALF17_mCas_R	CGGGTCTCA ACGTACCTGTTCGT tgcaccagccggg
RALF1719_RALF19_mCas_F	TAGGTCTCC GTACCGGTTCGT gttttagagctagaa
RALF1719_RALF19_mCas_R	CGGGTCTCA GTACGTCAGCTA tgcaccagccggg

[124]

[125] 안정적인 형질전환을 위하여 공지된 아그로박테리움 매개 공동 배양 방법(Agrobacterium-mediated co-cultivation method)을 이용하여 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens, A. tumefaciens*) LBA4404로 형질전환시켰다.

[126] 아그로박테리움 컴피턴트 셀(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404) 50μL와 1μg의 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서 액체질소에 75초간 넣은 후, 37℃ 오븐에서 5분 동안 방치하고, 이에 1 ml의 LB 액체 배지를 넣은 다음 3시간 동안 28℃의 진탕배양기에서 배양하였다. 이어서, 테트라사이클린(Tetracyclin) 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간 후 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양하여 선별하였다.

[127] 상기 생성된 형질전환된 아그로박테리움을 벼의 형질전환 실험에 사용하였다. 28℃ 생장실에서 동진벼 종자를 N6D 고체 배지에서 7일 정도 키워서 벼의 캘러스를 유도하였다. 생성된 캘러스와 72시간동안 배양한 pGA2707 식물 발현용 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 세포를 혼합하고, 22℃ 암실의 생장실에서 N6D-아세토시린곤을 포함하는 배지에서 배양하였다.

[128] 아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 세척한 후 50mg/L의 카나마이신(kanamycin)을 첨가한 N6D 고체배지를 이용해 형질전환 식물체를 스크리닝하였다. 상기 스크리닝은 28℃ 생장실에서 4 주 동안 이루어졌다(각 차수마다 2주씩 수행). 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR (hygromycin 40 mg/L) 고체배지에 옮겨 4주 28℃ 광조건 생장실에서 재분화를 유도한 후, 식물체를 MS 고체 배지로 옮기고 7일 28℃ 광조건 생장실에서 키우고 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

[129] 재분화된 형질전환 식물체 잎의 DNA를 추출 후, 하기 표 3의 프라이머를 이용하여 PCR을 통한 염기서열 증폭한 후 시퀀싱 분석을 통하여 염기서열의 돌연변이가 일어난 식물체를 선발하였다.

[130]

[131] [표3]

RALF17_genotyping-F	CGTTCGTTCGTCCTACTCGT
RALF17_genotyping-R	GCGGAGGAAGAGGAGATGAT
RALF19_genotyping-F	AATTGCTCCAAACGCCAAC
RALF19_genotyping-F	GGGAATTTGGATGGACAATG

[132]

[133] **실시예 3. *RALF17* 유전자(Os01g10470), *RALF19* 유전자(*Os05g11330*) 동시 넉아웃 돌연변이체의 웅성불임성 확인**

[134] 상기 실시예 2를 통해 제작한 동형접합 단독(*ralf17*, *ralf19*) 및 이중(*ralf17/19*) 넉아웃 돌연변이체를 통해 *OsRALF17* 및 *OsRALF19*의 기능을 확인하였다. 상기 돌연변이체의 성장을 확인한 결과, 모든 돌연변이체에서 성장에 대한 결함은 확인되지 않았다(도 4(a) 내지 4(d)). 그러나 *ralf17/19* 돌연변이는 원추화서에서 거의 종자를 생산하지 않음을 확인하였다(도 4(d)). 또한 각 돌연변이에 있어, 생식 조직(reproductive tissue)의 형성에서 유의한 차이가 확인되지 않았으며, 정상적인 크기의 화분이 확인되었다(도 4(e)). 더불어 각 돌연변이의 성숙한 화분립을 I_2-KI, calcofluor white, auramine O로 염색한 결과, WT와 유사한 염색 패턴을 보임을 확인하였다.

[135] 두 유전자 모두 화분 특이적 발현을 보인다는 점을 감안할 때, 이러한 결과는 OsRALF17 및 OsRALF19의 결손이 엑신 및 인틴과 같은 화분벽의 형성 또는 세포질(cytoplasm)의 전분 축적에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다.

[136] 더불어 시험관내 화분 발아를 추가로 조사한 결과, *ralf17/19*에서는 거의 온전하지 않은 화분관이 확인된 반면(도 4(f), 도 4(g)), *ralf17* 및 *ralf19* 돌연변이는 WT와 비슷한 정상적인 화분관을 생성함을 확인하였다(도 4(f)). 발아율을 확인한 결과, WT의 경우 약 88.23%의 발아율을 보였으며, 약 4.62%의 화분을 제외한 모든 화분에서 수화(hydration)가 일어났다.

[137] 그러나, 3개의 독립적인 *ralf17/19*의 발아율은 1.03~9.66%로 크게 감소하였으며, 비수화(non-hydrated) 화분의 비율은 16.27~31.33%로 증가하였다(도 4(g)). 수화된 *ralf17/19* 화분에 있어서, 온전한 화분관은 거의 관찰되지 않았으며, 대부분의 화분립에 있어 화분관이 없거나 짧은 모양의 화분관이 관찰되었다. 종자 번식력(seed fertility)을 확인한 결과, *ralf19*의 경우 WT(84-87%)에 비해 큰 변화를 보이지 않았으나(68-72%), *ralf17*의 경우 WT의 종자 번식력 대비 약 절반의 종자 번식력을 보였고(35-61%), *ralf17/19*는 0.5%-2.0%의 거의 불임(sterile) 표현형의 종자 번식력을 보였다(도 4(h)). 따라서 이를 통해 OsRALF17 및 OsRALF19는 화분

관 성장에 있어 중복적인 기능을 하며, 특히 OsRALF17가 크게 기여함을 확인하였다.

[138] *ralf17/19*의 웅성불임(male sterility)의 원인을 확인하기 위하여, 암술(pistil)에서 화분관의 성장을 확인하였다. 생체 내 화분관 생장을 확인한 결과, 암술머리에서 화분립이 50% 이상 남아있지 않은 것으로 나타나, 돌연변이체의 화분은 수화 및 발아 결함으로 인하여 암술머리에 부착하기 어려운 것으로 나타났다. 또한 화분관의 약 30%는 암술머리(stigma)/암술대(style)에서 성장을 멈추고 난소(ovary)에 도달하지 않아, 화분관 신장에도 결함이 야기함을 확인하였다(도 5(a) 내지 도 5(d)). 따라서 이를 통해 OsRALF17 및 OsRALF19가 수화, 발아 및 화분관 신장 과정을 조절하는 데 중복적으로 기능함을 확인하였다.

[139]

[140] **실시예 4. *RALF17* 유전자(Os01g10470), *RALF19* 유전자(*Os05g11330*) 동시 넉아웃 돌연변이체의 전사체(Transcriptome) 및 단백질체 (Proteomics) 확인**

[141] *ralf17/19*에 의해 조절되는 경로를 탐색하기 위해, 성숙한 화분이 포함된 꽃밥을 수집하여 전사체학(transcriptomic) 및 단백질체학(proteomic) 분석을 수행하였다. 전사체학 분석을 위해 다음 기준을 사용하여 차별적으로 발현된 유전자(differentially expressed genes, DEGs)를 선택하였다: (1) $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 0.57$, (2) p-값 ≤ 0.05 및 (3) 표현 값(백만 개당 읽기 수(read count per million, RPM)) > WT 샘플에서 10. 그 결과, 벼의 55,986개 유전자좌 중 *ralf17/19*에서 267개 DEG가 상향조절되었고, 203개 DEG가 하향조절되었다.

[142] 더불어 단백질체 분석을 위해 다음 기준을 사용하여 차별적으로 발현된 단백질(differentially expressed proteins, DEP)을 선택하였다: (1) $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 0.5$ 및 (2) p-값 ≤ 0.05. 그 결과, 벼 꽃밥과 화분 조직에서 총 4,504개 단백질이 검출되었으며, 그 중 1,148개의 DEP가 상향조절되었고, 1,235개의 DEP가 하향조절되었다.

[143] *ralf17/19*에서 DEG와 DEP 사이의 관계를 분석한 결과, 전사체와 단백질 모두 22개 유전자좌에서 증가하였고, 66개 유전자좌에서 감소하였다. 대조적으로, 27개 유전자좌에서 전사체 발현은 증가하였으나 단백질 발현은 감소하였고, 22개 유전자좌에서 전사체 발현은 감소하였으나 단백질 발현은 증가하였다(도 6(a) 및 표 4).

[144]

[145] [표4]

Locus	DEG	DEP	Putative Function	GO group	GO number	GO name
Os04g08550	-1.89	-0.83	oxidoreductase	Oxidation	GO:0055114	oxidation reduction

Os12g19470	-1.19	-0.59	ribulose bisphosphate carboxylase small chain	reduction	GO:0055114	oxidation reduction
Os04g52130	-1.01	-0.95	coproporphyrinogen III oxidase		GO:0055114	oxidation reduction
Os12g15530	-0.90	-1.38	OsLAC28		GO:0055114	oxidation reduction
Os04g37480	-0.88	-0.80	oxidoreductase		GO:0055114	oxidation reduction
Os02g09220	-0.77	-0.74	cytochrome P450		GO:0055114	oxidation reduction
Os07g37420	-0.76	-0.83	versicolorin reductase		GO:0055114	oxidation reduction
Os04g59190	-0.75	-1.98	peroxidase precursor		GO:0055114	oxidation reduction
Os03g09020	-0.66	-1.11	dehydrogenase		GO:0055114	oxidation reduction
Os03g55240	-0.56	-1.32	cytochrome P450		GO:0055114	oxidation reduction
Os04g38600	-0.54	-0.76	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		GO:0055114	oxidation reduction
Os11g29290	-0.51	-1.95	cytochrome P450		GO:0055114	oxidation reduction
Os09g17740	-1.12	-1.04	chlorophyll A-B binding protein	Photosynthesis	GO:0015979	photosynthesis
Os02g10390	-0.79	-0.95	chlorophyll A-B binding protein		GO:0009765	photosynthesis, light harvesting
Os03g39610	-0.79	-1.66	chlorophyll A-B binding protein		GO:0015979	photosynthesis
Os01g41710	-0.52	-1.63	chlorophyll A-B binding protein		GO:0015979	photosynthesis
Os03g62740	-2.30	-1.48	GELP54	Metabolism	GO:0006629	lipid metabolic process

Os02g45530	-1.27	-0.81	HOTHEAD precursor	GO:0006066	alcohol metabolic process
Os09g28730	-1.20	-2.61	gibberellin receptor GID1L2	GO:0008152	metabolic process
Os05g44922	-1.18	-2.12	6-phosphofructokinase	GO:0006096	glycolysis
Os03g09250	-1.03	-1.01	inositol-3-phosphate synthase	GO:0008152	metabolic process
Os04g58110	-1.00	-0.67	pyruvate kinase	GO:0006096	glycolysis
Os04g16680	-0.98	-0.66	fructose-1,6-bisphosphate	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
Os05g15880	-0.80	-3.72	glycosyl hydrolase	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
Os11g03780	-0.77	-1.09	alpha-N-arabinofuranosidase	GO:0046373	L-arabinose metabolic process
Os04g37680	-0.75	-0.94	alpha/beta hydrolase fold	GO:0008152	metabolic process
Os09g31490	-0.66	-1.00	reductase	GO:0008152	metabolic process
Os07g43820	-0.65	-0.95	glycosyl hydrolase	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
Os10g17650	-0.64	-0.66	BGLU34	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
Os01g67860	-0.59	-0.84	fructose-bisphospate aldolase isozyme	GO:0008152	metabolic process
Os04g41340	-0.56	-2.43	4-nitrophenylphosphatase	GO:0008152	metabolic process

Os01g08110	-0.50	-1.09	flavonol-3-O-glycoside-7-O-glucosyltransferase 1		GO:0008152	metabolic process
Os03g50490	-0.62	-0.86	glutamine synthetase		GO:0006542	glutamine biosynthetic process
Os11g38260	-1.62	-1.61	PAP fibrillin family domain containing protein	Transport	GO:0006810	transport
Os08g01380	-0.92	-1.55	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein		GO:0006810	transport
Os02g39930	-0.91	-0.88	OsTIL-1		GO:0006810	transport
Os02g35190	-0.75	-0.61	chloride channel protein		GO:0006821	chloride transport
Os12g02340	-0.67	-3.07	OsLTP1.20		GO:0006869	lipid transport
Os11g02400	-0.65	-1.65	OsLTP1.12		GO:0006869	lipid transport
Os08g28670	-1.76	-1.49	pathogenesis-related Bet v I family protein	Stress	GO:0009607	response to biotic stimulus
Os03g21560	-1.23	-1.84	photosystem II 11 kD protein		GO:0050826	response to freezing
Os01g42870	-0.60	-0.73	transferase family protein		GO:0050826	response to freezing
Os07g39620	-0.57	-1.00	C2 domain containing protein		GO:0050826	response to freezing
Os05g50890	-0.54	-0.68	OsGH3.5		GO:0009733	response to auxin stimulus
Os11g20790	-2.54	-0.94	adenylate kinase	Transcription	GO:0006260	DNA replication
Os09g21370	-0.91	-1.04	cysteine proteinase EP-B 1 precursor	Protein	GO:0006508	proteolysis

Os12g15470	-0.87	-1.71	OsSCP65	modification	GO:0006508	proteolysis
Os05g18604	-0.73	-0.77	OsSCP27		GO:0006508	proteolysis
Os11g14900	-0.58	-1.49	thiol protease SEN102 precursor		GO:0006508	proteolysis
Os08g29770	-0.70	-1.88	OsGH9B13	Cell wall	GO:0007047	cellular cell wall organization
Os03g15920	-1.76	-0.66	expressed protein	N/A	N/A	N/A
Os02g01300	-1.63	-1.38	OsPMEI5			
Os06g11660	-1.24	-0.68	phosphate-induced protein			
Os07g37240	-1.13	-2.56	chlorophyll A-B binding protein			
Os07g28480	-1.11	-1.42	GSTU46			
Os01g03340	-1.02	-4.77	BBTI4			
Os01g11230	-1.01	-0.61	SOUL heme-binding protein			
Os08g06530	-0.98	-0.69	rubredoxin family protein			
Os12g07150	-0.77	-1.19	amidase family protein			
Os05g11330	-0.65	-1.17	RALFL19			
Os04g52320	-0.60	-1.30	QRT3			
Os10g33550	-0.55	-2.30	alcohol oxidase-related			

Os12g44020	-0.55	-0.77	PAP10C			
Os06g14350	-0.54	-0.77	caleosin related protein			
Os03g63580	-0.51	-1.36	OsNPC3			

[146]

[147] 상기를 통해 확인된 *ralf17/19*에서 전사 및 단백질 수준이 감소된 65개 유전자좌를 기반으로 GO(Gene Ontology) 분석을 수행하였다. 그 결과 광합성, 해당 과정, 지질 수송 및 산화 환원과 같은 생물학적 과정에 관련된 GO 특성이 *ralf17/19*에서 풍부하다는 것을 확인하였다(도 6(b)). 한편 *ralf17/19*에서 2개의 산화환원효소(Os04g37480 및 Os04g08550), 환원효소(Os09g31490), 탈수소효소(Os03g09020) 및 과산화효소(Os04g59190)는 전사 및 단백질 수준 모두에서 하향조절되었다(표 4). 또한 펙틴 메틸 에스테라아제 억제제(pectin methyl esterase inhibitor(Os02g01300)), 엔도글루카나아제(endoglucanase(Os08g29770)) 등 세포벽과 관련된 단백질도 확인되었다.

[148]

[149] **실시예 5. 넉아웃되었던 *RALF17* 유전자(*Os01g10470)* 의 회복에 따른 웅성불임 개선 효과 확인**

[150] RALF 기능 중 하나는 세포의 확장(expansion) 및 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이에 화분관 성장에 대한 OsRALF의 효과를 알아보기 위해, 합성한 RALF17M을 야생형벼의 화분립에 다양한 농도(1nM~1μM)로 적용한 후 화분립의 발아 및 화분관 길이를 확인하였다(도 7).

[151] 그 결과 벼 화분은 RALF17M 0.5μM 이상의 농도에서는 발아하지 않는 것을 확인하였다(도 7). 0.25~0.001μM 농도에서는 벼 화분이 정상적으로 발아하였지만 비처리군보다 화분관의 길이가 짧았다. 반면 0.0005μM 농도에서는 화분관의 길이가 비처리군에 비해 크게 증가하였다. 이를 통해 OsRALF17이 단순히 억제를 하는 것이 아닌, 적절한 화분 발아, 화분관 신장 및 무결성(integrity)에 필수적인 역할을 함을 확인하였다.

[152] 낮은 농도의 RALF17M이 *ralf17/19*의 화분관 성장에 긍정적인 역할을 미치는지 확인하기 위하여, 체외 발아 시스템(in vitro germination system)을 사용하였다(도 8). WT 화분은 RALF17M 처리 전후(0, 0.0005, 0.1μM)에 84-95%의 수화율을 보였다. ralf17/19의 수화율은 약 75.6%였지만, RALF17M 처리 후 약 87%로 증가하였다. 또한 *ralf17/19*의 발아율은 약 4.55%였지만 RALF17M 처리시 온전한 관형성이 증가되어, 12.78%(0.0005 μM) 및 20.96%(0.1 μM)로(도 8(b)) 발아율이 증가되었다(도 8(a)). RALF17M을 사용한 외인성(Exogenous) 처리는 *ralf17/19* 화분의 수화 및 발아율을 개선하여, 세포외(extracellular) OsRALF17 적용이 결함이 있

는 *ralf17/19* 화분이 복구됨을 확인한 바, 정상적인 화분관 성장에 OsRALF17 및 OsRALF19가 모두 필요함을 확인하였다.

[153]

[154] 종합적으로 본 발명은 OsRALF17 유전자(*Os01g10470*) 및 OsRALF19 유전자(*Os05g11330*) 기능을 결실시킨 벼의 웅성불임 동형접합 돌연변이체를 제조하였으며, 이를 통해 상기 OsRALF17 유전자(*Os01g10470*) 및 OsRALF19 유전자(*Os05g11330*)의 발현 및/또는 기능이 억제되는 경우, 화분관 발아 및 신장이 감소되어 웅성불임이 야기되는 것을 확인하였고, *Os01g10470* 펩타이드를 외인성 처리한 경우, 화분관의 발아와 신장이 개선됨을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] 벼에서 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

[청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 단계는 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 일부 염기를 결손 또는 삽입시켜 이루어지는 것인, 웅성불임 벼의 제조방법.

[청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 단계는 CRISPR-Cas9에 의한 유전자 편집에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

[청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 *Os01g10470* 유전자의 발현 억제는 *Os01g10470* 유전자의 296 내지 302번째 위치의 1bp 이상의 염기를 결손시켜 이루어지는 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

[청구항 5] 제 4항에 있어서,
상기 *Os01g10470* 유전자의 발현 억제는 *Os01g10470* 유전자의 296 내지 302번째 위치의 TGAGCTA를 결손시켜 이루어지는 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

[청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 296 내지 302번째 위치의 TGAGCTA가 결손된 *Os01g10470* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

[청구항 7] 제 4항에 있어서,
상기 *Os01g10470* 유전자의 발현 억제는 *Os01g10470* 유전자의 300 및 301번째 위치의 CT를 결손시켜 이루어지는 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

[청구항 8] 제 7항에 있어서,
상기 300 및 301번째 위치의 CT가 결손된 *Os01g10470* 유전자는 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

[청구항 9] 제 1항에 있어서,
상기 *Os05g11330* 유전자의 발현 억제는 *Os05g11330* 유전자의 267번째 위치에 염기를 삽입시켜 이루어지는 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

[청구항 10] 제 9항에 있어서,
상기 267번째 위치에 아데닌(A) 또는 티민(T)의 염기가 삽입된 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

[청구항 11] 제 9항에 있어서,

상기 267번째 위치에 염기가 삽입된 *Os05g11330* 유전자는 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 웅성불임 벼의 제조방법.

[청구항 12] *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현이 억제된, 웅성불임 벼.

[청구항 13] *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물.

[청구항 14] 제 13항에 있어서,
상기 제제는 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acid) 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 벼의 웅성불임 유도용 조성물.

[청구항 15] *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 발현 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임성을 확인하는 방법.

[청구항 16] *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물.

[청구항 17] 제 16항에 있어서,
상기 제제는 상기 *Os01g10470* 및 *Os05g11330* 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브인 것인, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물.

[청구항 18] 제 16항에 있어서,
상기 제제는 상기 *Os01g10470* 및 *Os05g11330*로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머인 것인, 벼의 웅성불임성 확인용 조성물.

[청구항 19] 후보물질을 처리한 벼에서 *Os01g10470* 유전자 및 *Os05g11330* 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는, 벼의 웅성불임 유도제의 스크리닝 방법.

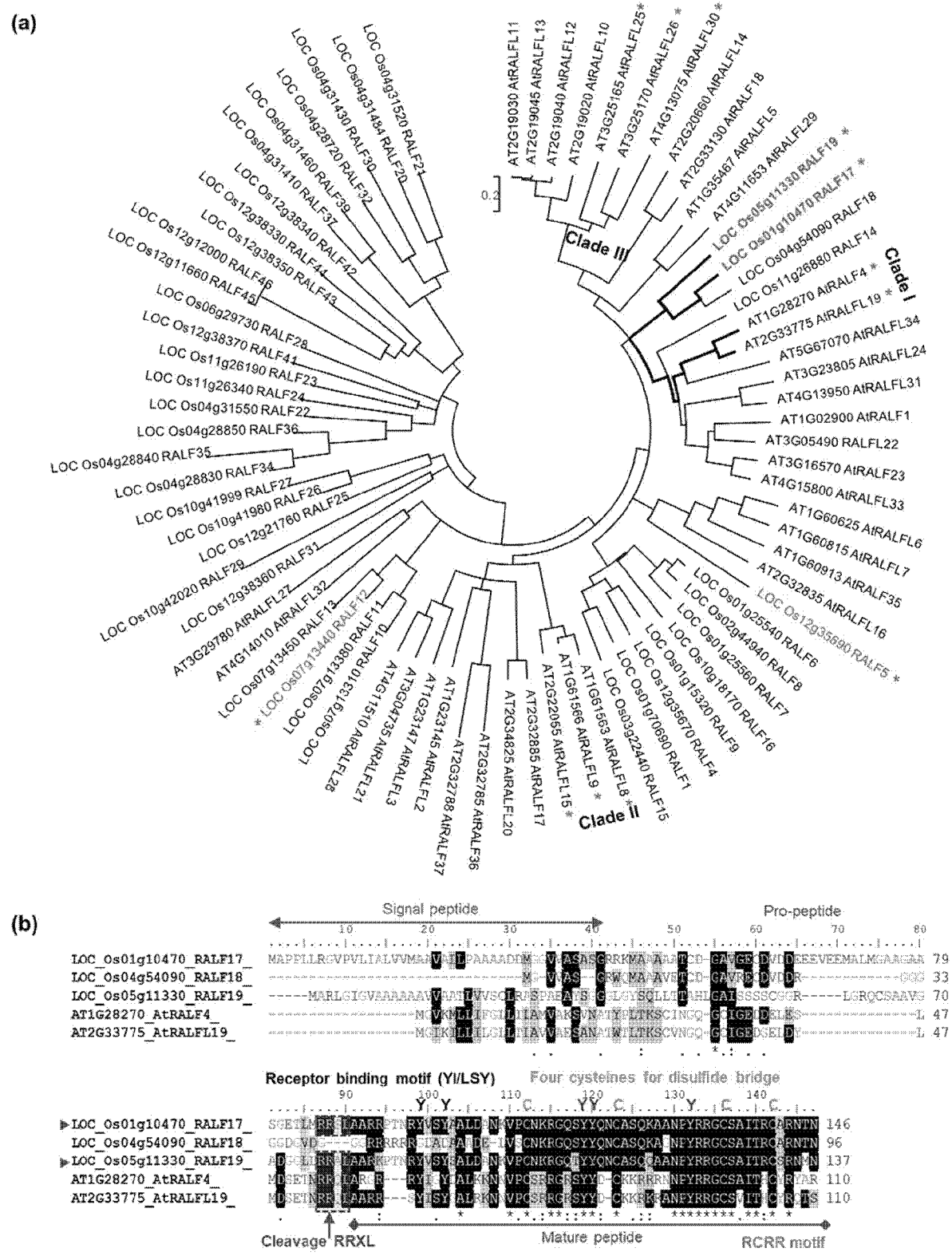
[청구항 20] 제 19항에 있어서,
상기 방법은 상기 측정된 발현량이, 후보물질을 처리하지 않은 벼의 발현량에 비하여 억제되었을 경우, 벼의 웅성불임 유도제로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 벼의 웅성불임 유도제의 스크리닝 방법.

[청구항 21] *Os01g10470* 유전자 및 *Os05g11330* 유전자의 발현이 억제된 웅성불임 계통 벼에서, *Os01g10470* 유전자 또는 이의 단백질을 과발현시키는 단계를 포함하는, 벼의 임성 회복 방법.

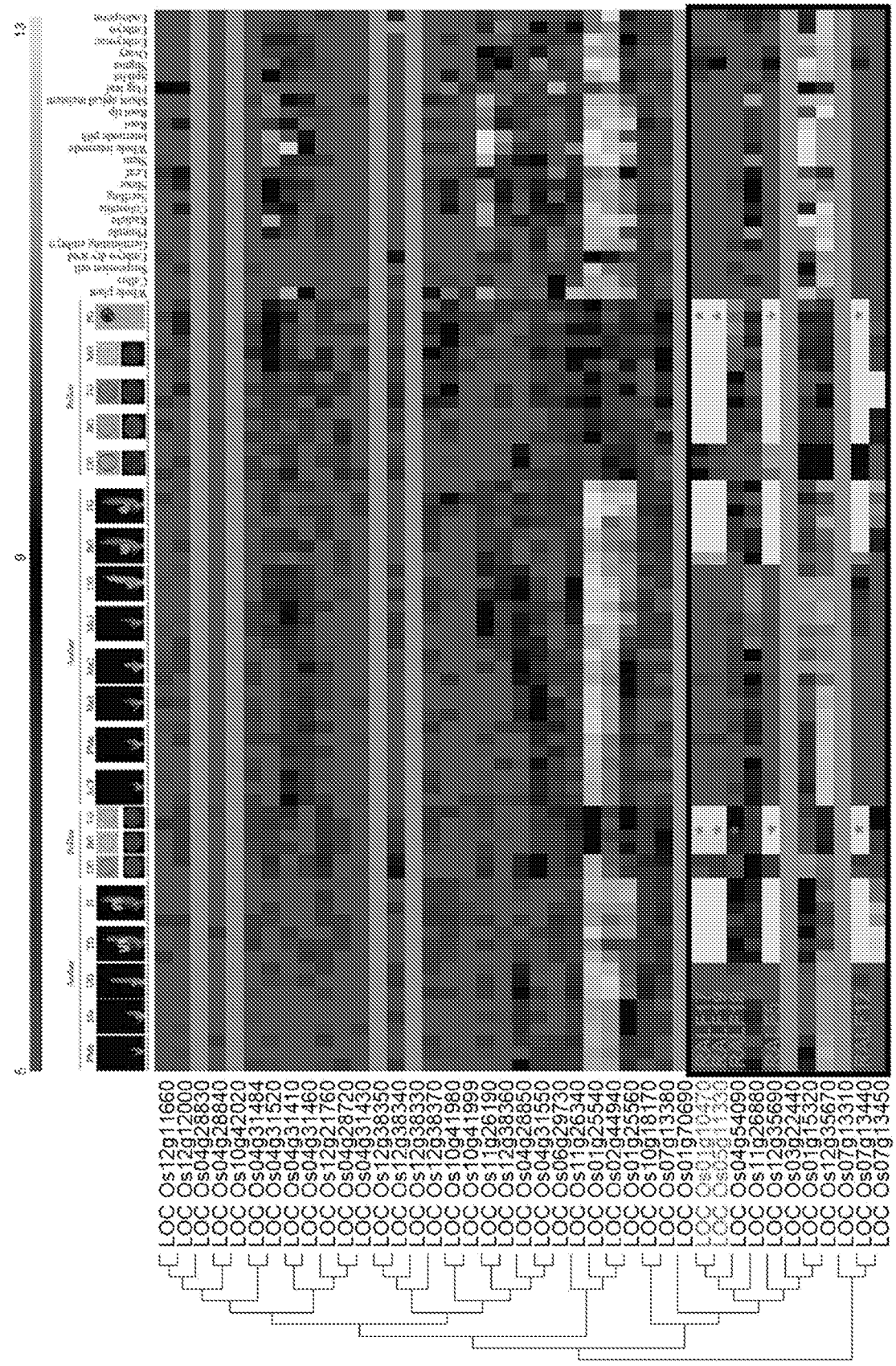
[청구항 22] 제 21항에 있어서,
상기 *Os01g10470* 유전자의 과발현은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 처리하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 벼의 임성 회복 방법.

[청구항 23] 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는, 벼의 임성 회복용 조성물.

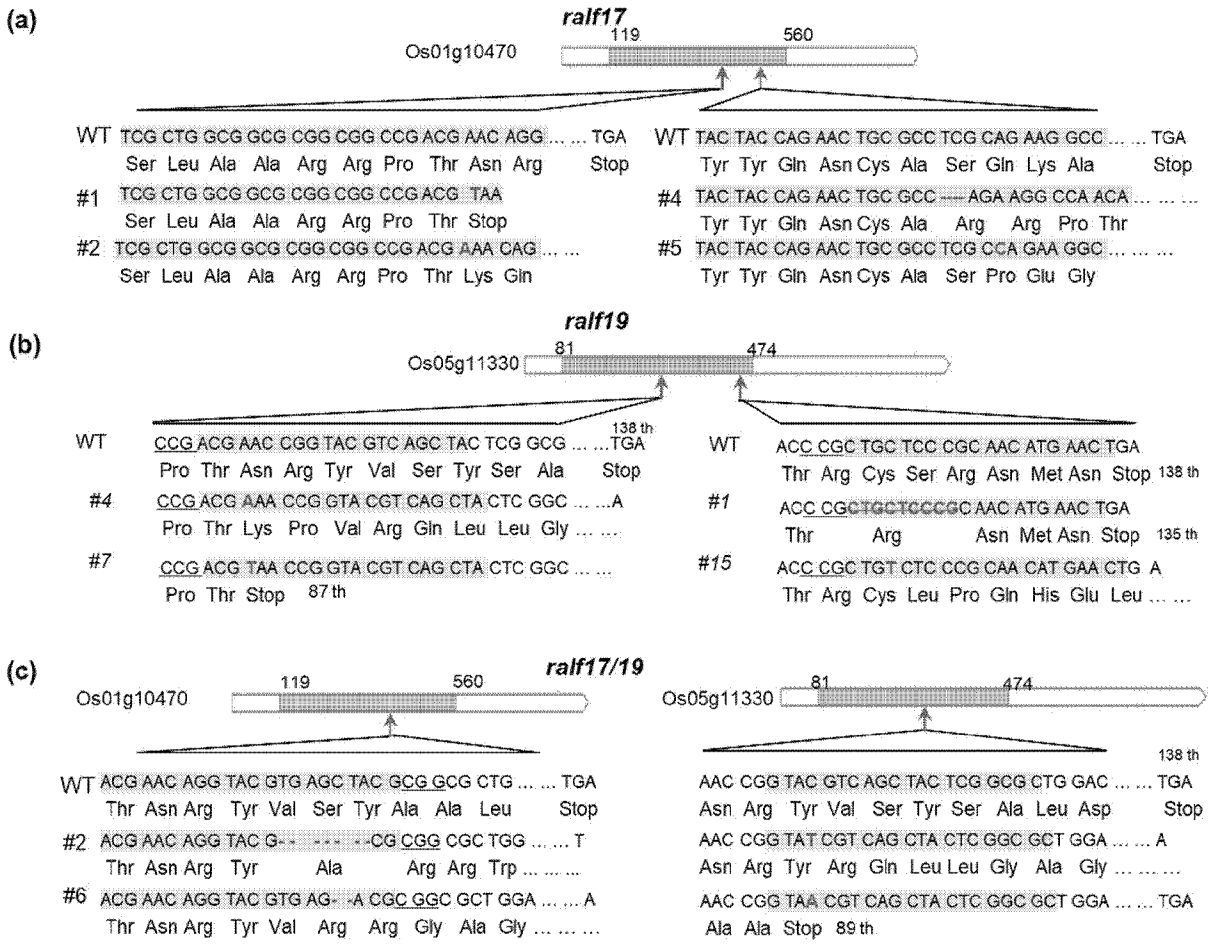
[도1]


(a)
Clade I
Clade II
Clade III
0.2
(b)
Signal peptide
Pro-peptide
Receptor binding motif (YI/LSY)
Four cysteines for disulfide bridge
Cleavage
RRXL
Mature peptide
RCRR motif

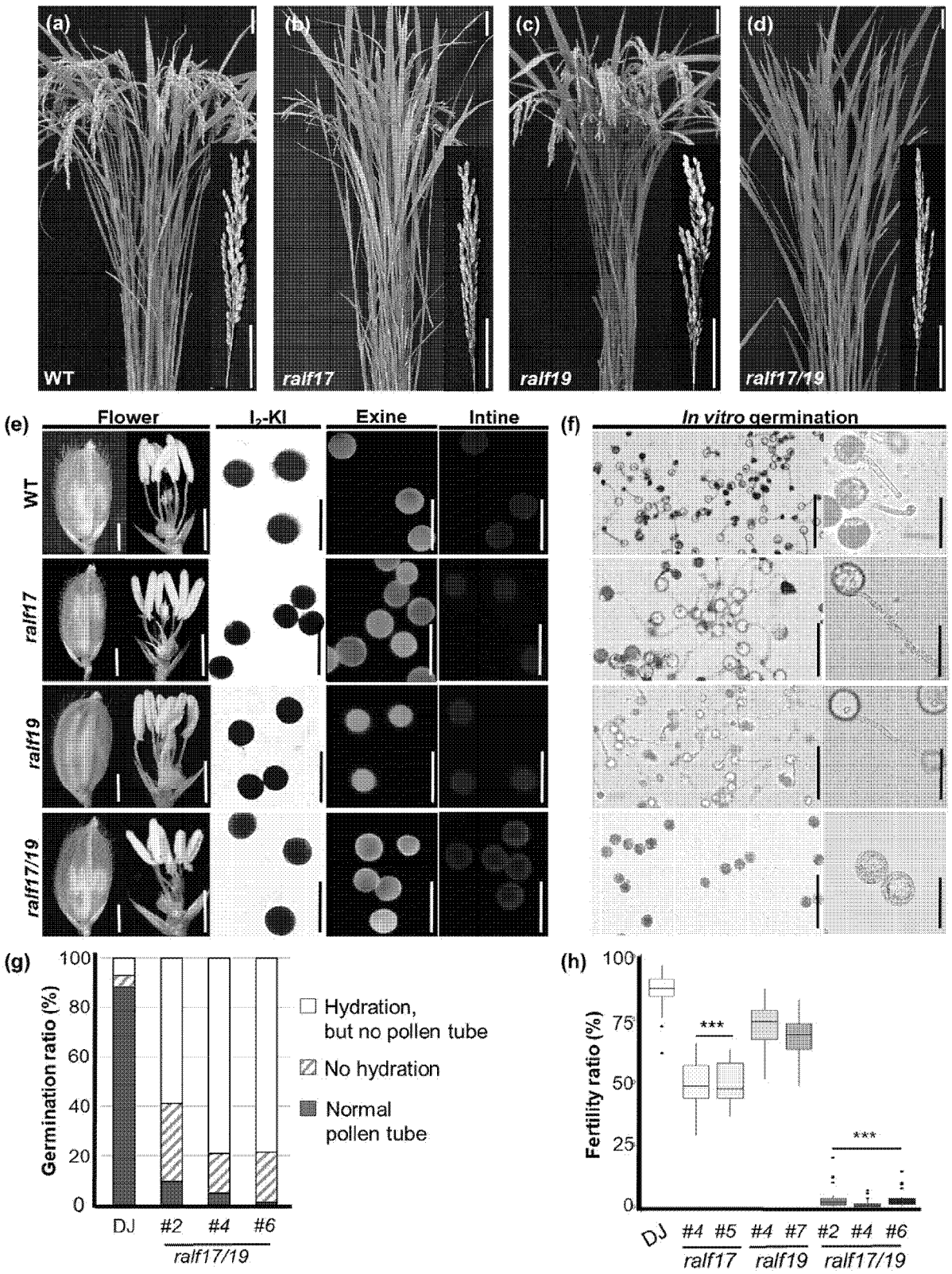
[도 2]


Os12g11660
Os12g12000
Os04g28840
Os10g42020
Os04g31484
Os04g31520
Os04g31460
Os12g21760
Os04g28720
Os04g31430
Os12g38340
Os12g38330
Os12g38370
Os10g41980
Os10g41999
Os11g26190
Os12g38360
Os04g28650
Os04g31550
Os06g28730
Os11g26340
Os01g25540
Os02g44940
Os01g25560
Os10g41870
Os07g13380
Os01g70690
Os04g54090
Os11g26880
Os12g38560
Os03g24440
Os01g15320
Os12g38670
Os07g13310
Os07g13440
Os07g13450

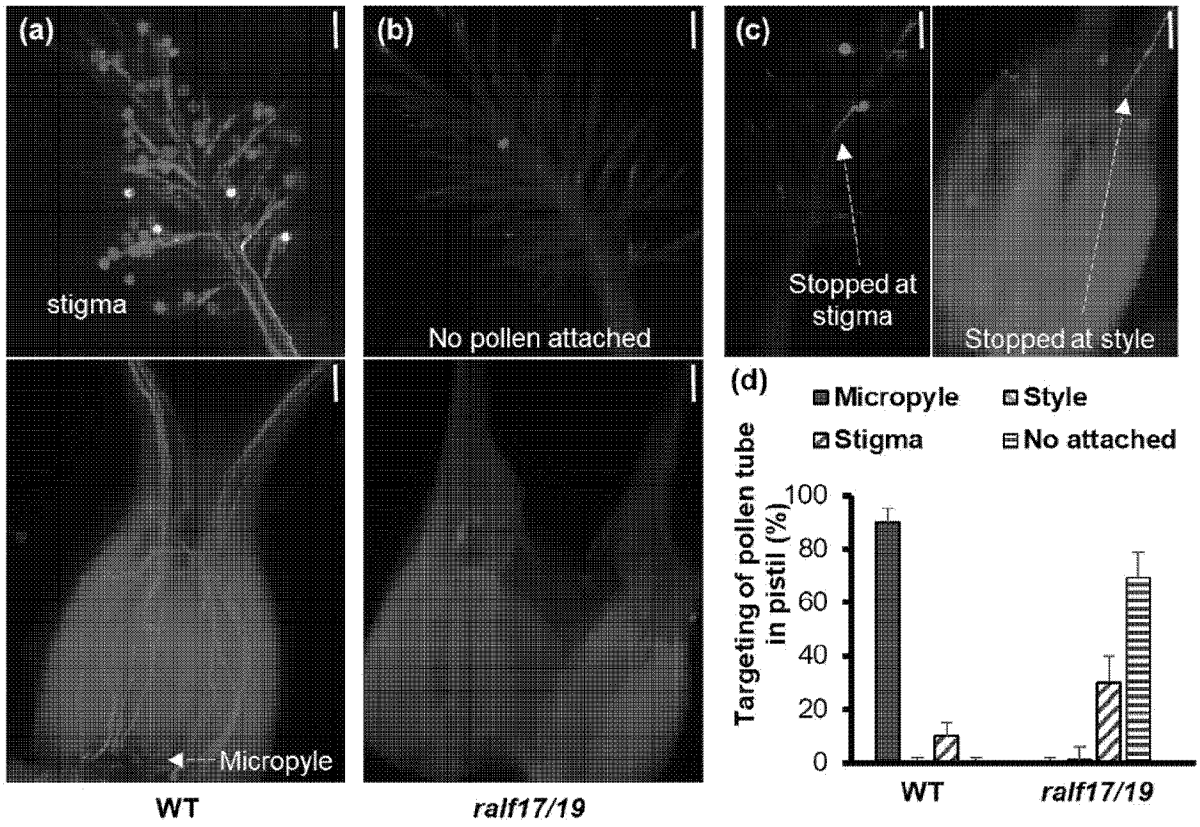
[도3]


(a)
ralf17
Os01g10470
119
560
WT TCG CTG GCG GCG CGG CGG CCG ACG AAC AGG ... ... TGA
Ser Leu Ala Ala Arg Arg Pro Thr Asn Arg Stop
#1 TCG CTG GCG GCG CGG CGG CCG ACG TAA
Ser Leu Ala Ala Arg Arg Pro Thr Stop
#2 TCG CTG GCG GCG CGG CGG CCG ACG AAA CAG ... ...
Ser Leu Ala Ala Arg Arg Pro Thr Lys Gln
WT TAC TAC CAG AAC TGC GCC TCG CAG AAG GCC ... ... TGA
Tyr Tyr Gln Asn Cys Ala Ser Gln Lys Ala Stop
#4 TAC TAC CAG AAC TGC GCC ---- AGA AGG CCA ACA ... ...
Tyr Tyr Gln Asn Cys Ala Arg Arg Pro Thr
#5 TAC TAC CAG AAC TGC GCC TCG CCA GAA GGC ... ...
Tyr Tyr Gln Asn Cys Ala Ser Pro Glu Gly
(b)
ralf19
Os05g11330
81
474
138 th
WT CCG ACG AAC CGG TAC GTC AGC TAC TCG GCG ... ...TGA
Pro Thr Asn Arg Tyr Val Ser Tyr Ser Ala Stop
#4 CCG ACG AAA CCG GTA CGT CAG CTA CTC GGC ... ...A
Pro Thr Lys Pro Val Arg Gln Leu Leu Gly ... ...
#7 CCG ACG TAA CCG GTA CGT CAG CTA CTC GGC ... ...
Pro Thr Stop 87 th
WT ACC CGC TGC TCC CGC AAC ATG AAC TGA
Thr Arg Cys Ser Arg Asn Met Asn Stop 138 th
#1 ACC CGCTGCTCCCGC AAC ATG AAC TGA
Thr Arg Asn Met Asn Stop 135 th
#15 ACC CGC TGT CTC CCG CAA CAT GAA CTG A
Thr Arg Cys Leu Pro Gln His Glu Leu ... ...
(c)
ralf17/19
Os01g10470
119
560
Os05g11330
81
474
138 th
WT ACG AAC AGG TAC GTG AGC TAC GCG GCG CTG ... ... TGA
Thr Asn Arg Tyr Val Ser Tyr Ala Ala Leu Stop
#2 ACG AAC AGG TAC G- - - - - - -CG CGG CGC TGG ... ... T
Thr Asn Arg Tyr Ala Arg Arg Trp ... ...
#6 ACG AAC AGG TAC GTG AG- -A CGC GGC GCT GGA ... ... A
Thr Asn Arg Tyr Val Arg Arg Gly Ala Gly ... ...
AAC CGG TAC GTC AGC TAC TCG GCG CTG GAC ... ... TGA
Asn Arg Tyr Val Ser Tyr Ser Ala Leu Asp Stop
AAC CGG TAT CGT CAG CTA CTC GGC GCT GGA ... ... A
Asn Arg Tyr Arg Gln Leu Leu Gly Ala Gly ... ...
AAC CGG TAA CGT CAG CTA CTC GGC GCT GGA ... ... TGA
Ala Ala Stop 89 th

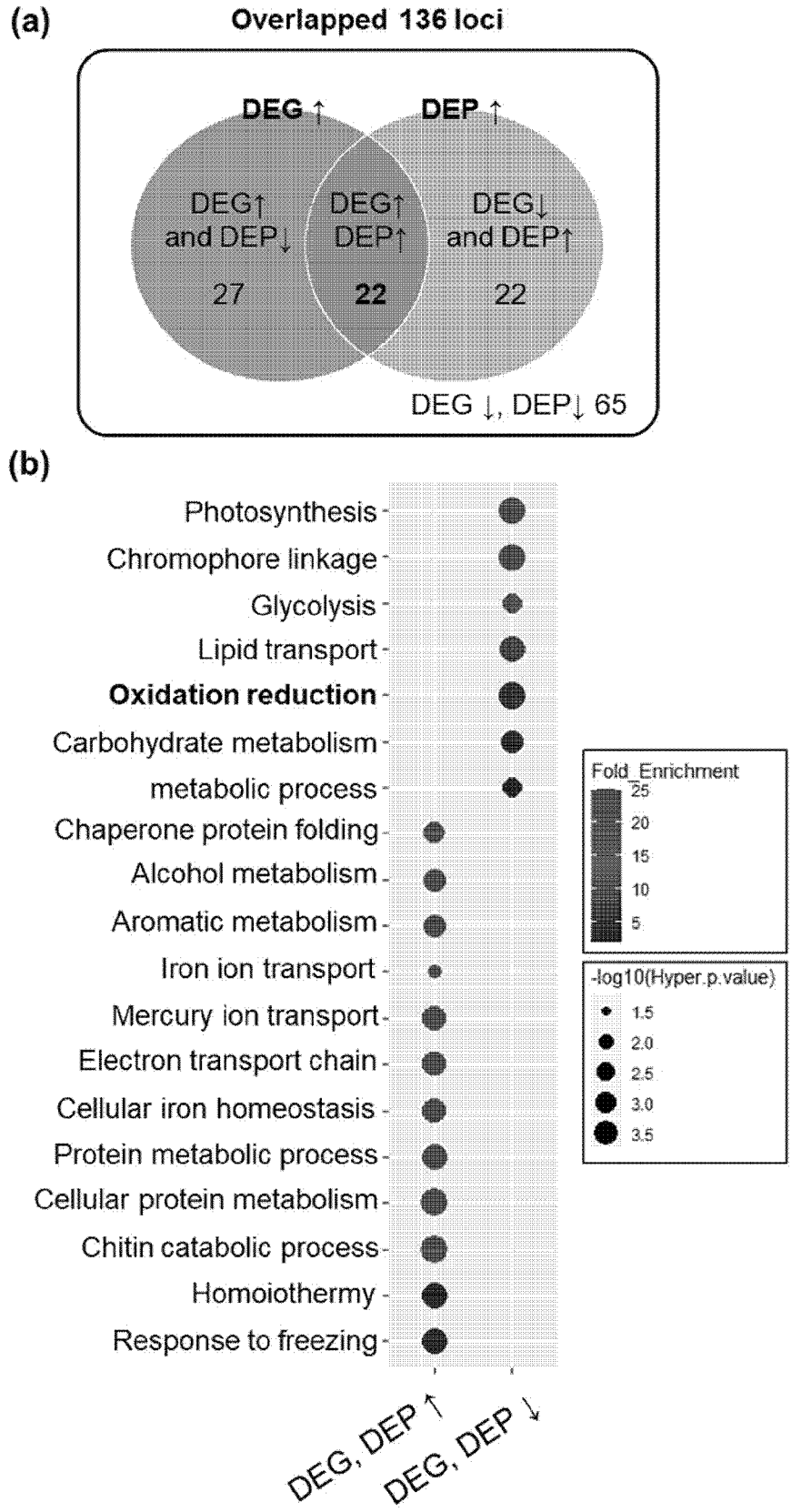
[도4]


(a)
(b)
(c)
(d)
WT
ralf17
ralf19
ralf17/19
(e)
Flower
I2-KI
Exine
Intine
WT
ralf17
ralf19
ralf17/19
(f)
In vitro germination
(g)
Germination ratio (%)
100
80
60
40
20
0
DJ
#2
#4
#6
ralf17/19
Hydration, but no pollen tube
No hydration
Normal pollen tube
(h)
Fertility ratio (%)
100
75
50
25
0
***
***
DJ
#4
#5
#4
#7
#2
#4
#6
ralf17
ralf19
ralf17/19

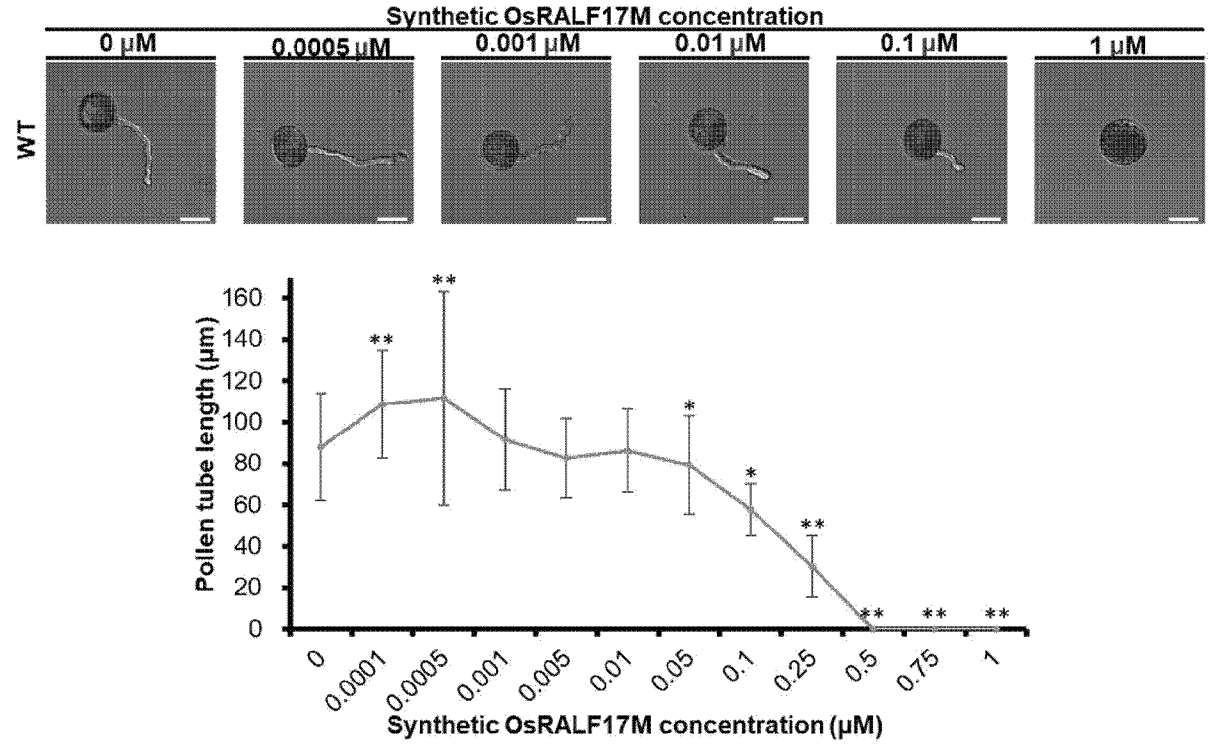
[도5]


(a)
stigma
(b)
No pollen attached
(c)
Stopped at stigma
Stopped at style
Micropyle
WT
ralf17/19
(d)
Micropyle
Style
Stigma
No attached
Targeting of pollen tube in pistil (%)
100
80
60
40
20
0
WT
ralf17/19

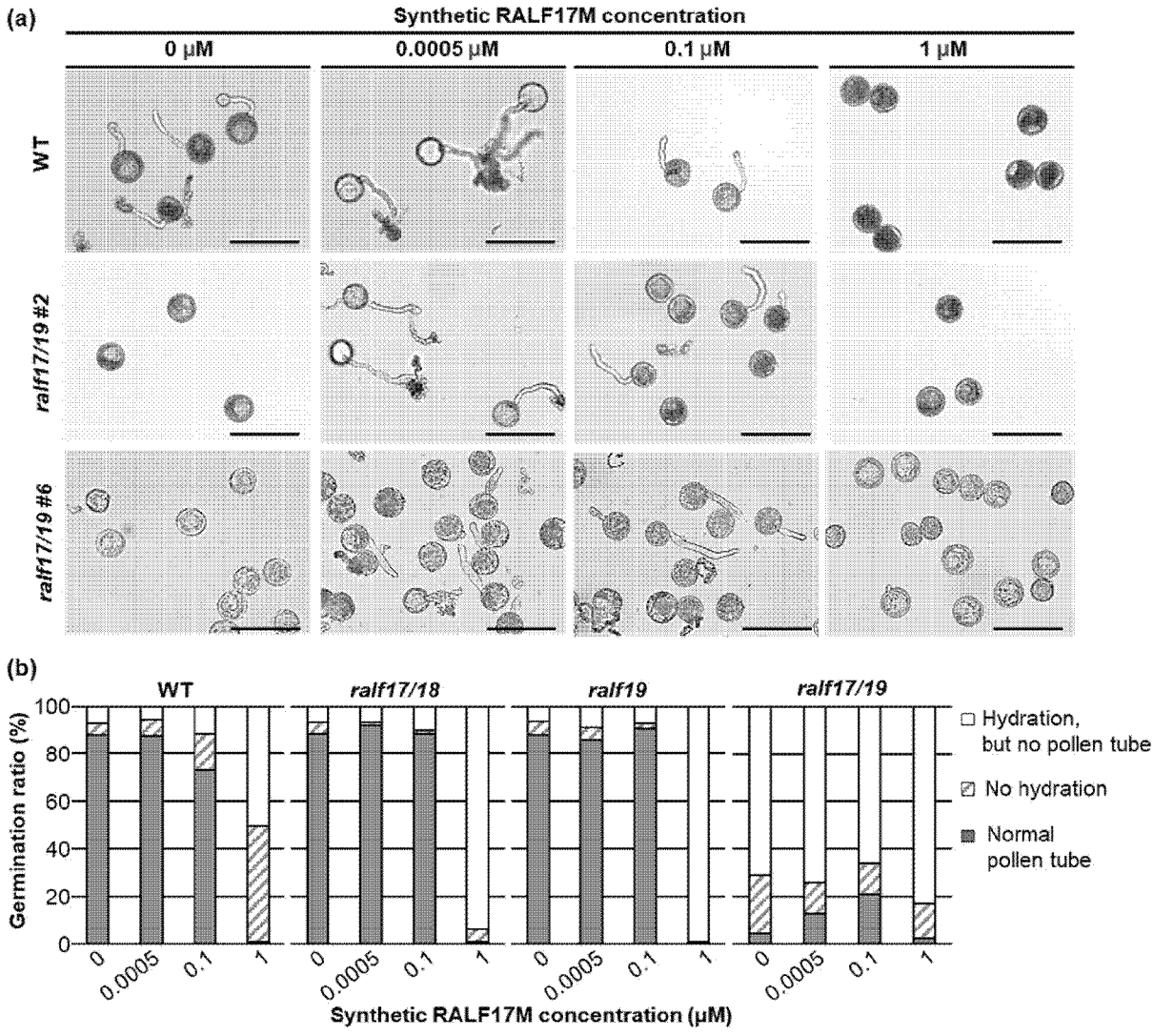
[도6]


(a)
Overlapped 136 loci
DEG ↑
DEP ↑
DEG↑ and DEP↓
27
DEG↑ DEP↑
22
DEG↓ and DEP↑
22
DEG ↓, DEP↓ 65
(b)
Photosynthesis
Chromophore linkage
Glycolysis
Lipid transport
Oxidation reduction
Carbohydrate metabolism
metabolic process
Chaperone protein folding
Alcohol metabolism
Aromatic metabolism
Iron ion transport
Mercury ion transport
Electron transport chain
Cellular iron homeostasis
Protein metabolic process
Cellular protein metabolism
Chitin catabolic process
Homoiothermy
Response to freezing
DEG, DEP ↑
DEG, DEP ↓
Fold_Enrichment
25
20
15
10
5
-log10(Hyper.p.value)
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5

[도7]


Synthetic OsRALF17M concentration
0 μM
0.0005 μM
0.001 μM
0.01 μM
0.1 μM
1 μM
WT
Pollen tube length (μm)
Synthetic OsRALF17M concentration (μM)

[도8]


(a)
Synthetic RALF17M concentration
0 μM
0.0005 μM
0.1 μM
1 μM
WT
ralf17/19 #2
ralf17/19 #6
(b)
WT
ralf17/18
ralf19
ralf17/19
Germination ratio (%)
Hydration, but no pollen tube
No hydration
Normal pollen tube
Synthetic RALF17M concentration (μM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/095296

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; **C12N 9/22**(2006.01)i; **C12N 15/10**(2006.01)i; **A01H 1/02**(2006.01)i; **A01H 6/46**(2018.01)i; **G01N 33/53**(2006.01)i; **C12Q 1/6844**(2018.01)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 15/113(2010.01); A01H 6/46(2018.01); C12Q 1/6895(2018.01)

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: Os01g10470(RALF17), Os05g11330(RALF19), 웅성불임(male sterility), 벼(Oryza sativa L.), miRNA(micro RNA)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MECCHIA, M. A. et al. RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in Arabidopsis. Science. 2017, vol. 358, pp. 1600-1603 (inner pp. 1-4). See abstract; figure 1; and inner page 1.	1-23
A	KIM, Y.-J. et al. Molecular basis of pollen germination in cereals. Trends in Plant Science. 2019, vol. 24, no. 12, pp. 1126-1136. See abstract; and pages 1130-1131.	1-23
A	NCBI. NCBI Reference Sequence No. XP_015645772.1. protein RALF-like 33 [Oryza sativa Japonica Group]. See entire document.	1-23
A	KR 10-2022-0150125 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY et al.) 10 November 2022 (2022-11-10) See entire document.	1-23

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
21 May 2024	**22 May 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2421653 B1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 18 July 2022 (2022-07-18) See entire document.	1-23
X	KIM, E.-J. et al. [GM21] OsRALF 17/19 regulates pollen germination and tube growth by Activating ROS Signaling Through OsMTD2 in Rice (Oryza Sativa). 2022 International Conference of Korean Society of Plant Biologist. 09-11 November 2022, p. 125. See page 125. ※ This document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-23
PX	KIM, E.-J. et al. Rice pollen-specific OsRALF17 and OsRALF19 are essential for pollen tube growth. Journal of Integrative Plant Biology. 17 May 2023, vol. 65, no. 9, pp. 2218-2236. See abstract; figures 1, 3 and 9; and pages 2221 and 2230-2232.	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/095296

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/095296

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2022-0150125 A	10 November 2022	None	
KR 10-2421653 B1	18 July 2022	KR 10-2021-0077585 A	25 June 2021
		KR 10-2021-0132339 A	04 November 2021
		WO 2021-125500 A1	24 June 2021
		WO 2021-125503 A1	24 June 2021

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/095296

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/113(2010.01)i; **C12N 9/22**(2006.01)i; **C12N 15/10**(2006.01)i; **A01H 1/02**(2006.01)i; **A01H 6/46**(2018.01)i; **G01N 33/53**(2006.01)i; **C12Q 1/6844**(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/113(2010.01); A01H 6/46(2018.01); C12Q 1/6895(2018.01)

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: Os01g10470(RALF17), Os05g11330(RALF19), 웅성불임(male sterility), 벼(Oryza sativa L.), miRNA(micro RNA)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MECCHIA, M. A. 등, `RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in Arabidopsis`, Science, 2017, 358권, 페이지 1600-1603(내부페이지 1-4) 초록; 도면 1; 내부 페이지 1	1-23
A	KIM, Y.-J. 등, `Molecular basis of pollen germination in cereals`, Trends in Plant Science, 2019, 24권, 12호, 페이지 1126-1136 초록; 페이지 1130-1131	1-23
A	NCBI, NCBI Reference Sequence No. XP_015645772.1, `protein RALF-like 33 [Oryza sativa Japonica Group]`, 2018.08.07 전체 문헌	1-23
A	KR 10-2022-0150125 A (경희대학교 산학협력단 등) 2022.11.10 전체 문헌	1-23
A	KR 10-2421653 B1 (경희대학교 산학협력단) 2022.07.18 전체 문헌	1-23

☑ 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 이후에 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 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년05월21일(21.05.2024)	**2024년05월22일(22.05.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**허주형**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, E.-J. 등, `[GM21] OsRALF 17/19 regulates pollen germination and tube growth by Activating ROS Signaling Through OsMTD2 in Rice (Oryza Sativa)`, 2022 International Conference fo Korean Society of Plant Biologist, 2022.11.09-11.11, 페이지 125 페이지 125 ※위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-23
PX	KIM, E.-J. 등, `Rice pollen-specific OsRALF17 and OsRALF19 are essential for pollen tube growth`, Journal of Integrative Plant Biology, 2023.05.17, 65권, 9호, 페이지 2218-2236 초록; 도면 1, 3, 9; 페이지 2221, 2230-2232	1-23

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/095296

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

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

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/095296

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2022-0150125 A	2022/11/10	없음	
KR 10-2421653 B1	2022/07/18	KR 10-2021-0077585 A	2021/06/25
		KR 10-2021-0132339 A	2021/11/04
		WO 2021-125500 A1	2021/06/24
		WO 2021-125503 A1	2021/06/24