



- (51) 국제특허분류: *A01H 5/00* (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/004043
- (22) 국제출원일: 2013년 5월 8일 (08.05.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2012-0048511 2012년 5월 8일 (08.05.2012) KR
- (71) 출원인: 경상대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 660-701 경상남도 진주시 가좌동 900, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 이균오 (LEE, Kyun Oh); 660-779 경상남도 진주시 가좌동 가좌주공그린빌 109동 304호, Gyeongsangnam-do (KR). 이상열 (LEE, Sang Yeol); 660-290 경상남도 진주시 주악동 삼환나우빌 101동 1801호, Gyeongsangnam-do (KR). 유재용 (YOO, Jae Yong); 627-894 경상남도 밀양시 하남읍 수산리 835-7번지, Gyeongsangnam-do (KR). 고기성 (KO, Ki Seong); 668-801 경상남도 남해군 남해읍 서변리 281-6번지, Gyeongsangnam-do (KR). 손보화 (SON, Bo Hwa); 668-801 경상남도 진주시 호탄동 629-8번지 403호,

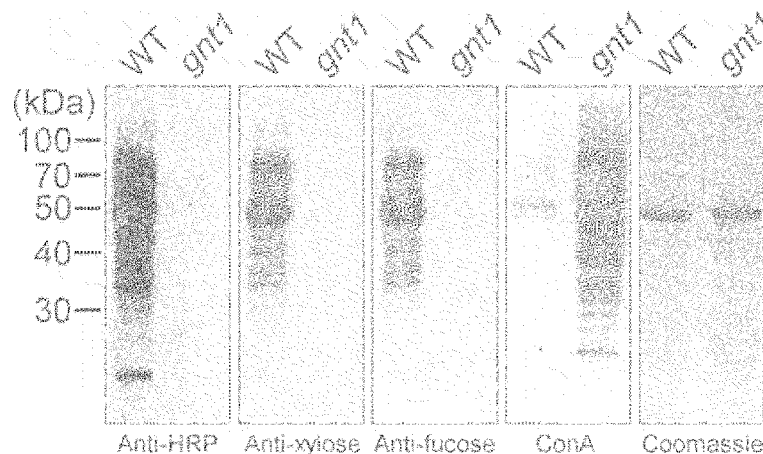
Gyeongsangnam-do (KR). 와유인드라 드위 파나타 (Wahyu, Indra Duwi Fanata); 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동, 경상대학교) 660-701, Gyeongsangnam-do 660-701 (ID). 립노하르모코 (Rikno, Harmoko); 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동, 경상대학교) 660-701, Gyeongsangnam-do 660-701 (ID).

- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 152-766 서울시 구로구 구로동 197-22번지 에이스테크노타워 5차 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PLANT FOR PRODUCING HIGH-MANNOSE N-GLYCAN, AND METHOD FOR PRODUCING HIGH-MANNOSE N-GLYCAN USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체 및 이를 이용한 고-만노오스형 N-글라이칸의 생산방법



(57) Abstract: The present invention relates to a plant for producing high-mannose N-glycan, and a method for producing high-mannose N-glycan using the same. The *gnt1* mutant plant of the present invention loses the function of UDP-GlcNAc:α3-D-mannoside β1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI), and thus it is possible to inhibit the production of combined and complex N-glycan glycoproteins and produce high-mannose N-glycan glycoproteins instead when using the plant. Therefore, the protein comprising high-mannose N-glycan of the present invention can be used in glycoprotein medical supplies and the like having a mannose terminal corresponding to a therapeutic protein for lysosomal storage diseases, and thus can be useful in the protein medical supplies field.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, **공개:**

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체 및 및 이를 이용한 고-만노오스형 N-글라이칸의 생산방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 *gntI* 돌연변이 식물체는 UDP-GlcNAc:α3-D-만노사이드 β1,2-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이스 I(GnTI)의 기능을 상실함으로써 상기 식물체를 이용할 경우 혼합형 및 복합형의 N-글라이칸 당단백질의 생산을 억제하고, 대신 고-만노오스 N-글라이칸 당단백질을 생산할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 고-만노오스 N-글라이칸을 갖는 단백질은 라이소좀 축적 질환의 단백질 치료제에 따른 만노오스 말단을 가지는 당단백질 의약품 등에 이용될 수 있으므로 단백질 의약품 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체 및 이를 이용한 고-만노오스형 N-글라이칸의 생산방법

기술분야

- [1] 본 발명은 고-만노오스형(high-mannose type) N-글라이칸(N-glycan)을 생산하는 식물체 및 이를 이용한 고-만노오스형 N-글라이칸의 생산방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 진핵세포에서 소포체(endoplasmic reticulum)와 골지체(golgi apparatus)는 세포막, 세포벽, 액포, 라이소좀 등으로 이동하거나 세포 밖으로 분비되는 다양한 단백질의 가공 과정에서 중요한 역할을 하는 세포소기관이다. 막 단백질을 포함한 분비 경로의 단백질들을 코딩하는 메신저 RNA(mRNA)는 리보솜과 결합하면 소포체막으로 이동하는 신호서열을 포함한 폴리펩타이드의 합성이 시작되고 새로 만들어진 폴리펩타이드는 소포체막에서 신호서열이 제거되어 소포체 내로 이동하거나 막에 삽입된 상태에서 글라이코실화, 이황화 결합 형성 등 다양한 단백질 번역 후 변형 과정을 거치게 된다. 이러한 소포체에서의 번역 후 변형 과정에 있어서, N-글라이코실화(N-glycosylation)는 단백질의 접힘, 조립, 이동 그리고 활성 등과 같은 단백질의 생화학적 성질에 큰 영향을 미친다 (Ruiz-Canada et al., 2009). 따라서, 단백질의 고유한 글라이코실화는 생물학적 특성 및 활성을 결정하는데 매우 중요한 역할을 하고 있다.

- [4] 단백질 글라이코실화는 두 개의 카테고리, 즉 N-결합 및 O-결합 변형으로 나누어진다. 이 두 형태는 글라이칸 부위가 부착되는 아미노산이 다르다. 즉, O-결합은 세린(Ser) 또는 트레오닌(Thr) 잔기에 부착되는 반면, N-결합은 아스파라긴(Asn) 잔기에 부착된다. N-결합 또는 O-결합 형태의 글라이칸은 각각의 고유한 구조적 특징을 가지고 바이오의약품을 포함한 당단백질의 기능에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 특히 N-글라이칸 가공과정이 당단백질에서 더 많이 발견되고 있으며 최근 N-글라이코실화와 관련된 단백질의 기능과 질환에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

- [5] N-글라이코실화 과정과 관련하여 중요한 효소로 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이스 I(N-acetylglucosaminyltransferase I: GnTI)을 들 수 있다. GnTI은 $\text{Man}_5\text{GlcNac}_2$ 형태의 기본 N-글라이칸에 $\beta 1,2$ -linked GlcNac을 부가하여 $\text{GlcNacMan}_5\text{GlcNac}_2$ 형태의 N-글라이칸을 만드는데 필수적인 효소에 해당한다. GnTI에 의한 $\beta 1,2$ -linked GlcNac의 부가는 N-글라이칸의 성숙(N-glycan maturation)을 위하여 선행되어야 하는 필수적인 과정으로 이 과정이 진행되어야 $\alpha 1,3$ -퓨코오스(fucose), $\beta 1,2$ -자일로오스(xylose),

β 1,3-갈락토오스(galactose), α 1,4-푸코오스(fucose)와 같은 식물 특이적인 당당류를 포함하는 혼합형(hybrid type)과 복합형(complex type)의 N-글라이칸 당단백질이 만들어질 수 있는 것이다. 따라서, 상기 효소의 유전자가 결여된 진핵세포는 N-글라이칸의 성숙이 일어나지 못하여 혼합형과 복합형의 N-글라이칸 당단백질이 만들어지지 않으며 대신 고-만노오스형 N-글라이칸 당단백질이 만들어지는 것으로 알려져 있다.

- [6] 라이소좀 축적 질환은 심각한 임상학적 징후를 유발할 수 있는 희귀 유전 질환의 거대 부류이다. 라이소좀 효소, 운반체 또는 라이소좀 생합성 또는 라이소좀 기능과 관련된 단백질의 결핍으로부터 기인한 약 50여종의 라이소좀 축적 질환이 알려져 있다. 라이소좀 축적 질환의 총체적 발생 빈도는 약 7000명의 신생아 중 1명 정도이다. 라이소좀 축적 질환의 대표적인 병으로 고세병(Gaucher disease)을 들 수 있다. 고세병은 글루코스와 세라미드로 구성된 글리코스핑고지질인 글루코세레브로사이드(글루코실세라미드, GlcCer)의 가수분해를 촉매하는 라이소좀막에 결합된 글루코세레브로시데이즈(glucocerebrosidase)라는 효소의 결핍증이 원인이 되어 발병한다. 글루코세레브로시데이즈 결핍증은 염색체 1번의 q21-q31 부위에 위치하는 인간 글루코세레브로시데이즈 유전자의 돌연변이에 의해 야기되고 고세세포라 불리는 특유의 저장 세포(characteristic storage cell)가 고세병 환자의 비장, 간, 골수 등에서 발견된다. 관련 임상적 증상으로는 간비종대(hepatosplenomegaly), 빈혈(anemia), 저혈소판증(thrombocytopenia) 및 골격 퇴화(skeletal deterioration) 등이 포함된다.
- [7] 인간 글루코세레브로시데이즈를 코딩하는 유전자의 서열은 1985년에 최초로 결정되었다. 단백질은 536-머(mer) 프로-펩타이드로부터 유도된 497개의 아미노산으로 구성된다. 인간 글루코세레브로시데이즈는 5개의 N-글라이코실화 아미노산 공통서열(consensus sequence)(Asn-X-Ser/Thr)을 가진다. 이들 부위 중 4개는 정상적으로 글라이코실화되고 고-만노오스 형 및 복합형의 N-글라이칸이 가공된다. 제 1 부위의 글라이코실화는 활성을 가진 단백질 생산에 있어서 필수적이다. 태반으로부터 분리된 인간 글루코세레브로시데이즈는 7%의 탄수화물 부위를 포함하며, 그 중 20%는 고-만노오스 형태이다. 글루코세레브로시데이즈에 관한 생화학적 연구와 부위-특이적 돌연변이 연구는 접힘(folding), 활성화제 상호작용(activator interaction) 및 활성 부위 지정(active site location)에 중요한 영역 및 잔기의 초기 지도(initial map)를 제공한다. 글루코세레브로시데이즈 결핍이 고세병의 일차적인 원인으로 확인됨에 따라, 이들 장애에 대한 치료방법으로 효소 대체 치료법이 개발되었는데, 최근에 유전자 재조합 기술로 생산된 효소인 CerezymeTM으로 치료했던 유형 I 고세병 환자들에서 가장 성공적인 결과가 나타났다.
- [8] 라이소좀 축적 질환의 치료제로 사용되는 베타-글루코세레브로시데이즈(β -glucocerebrosidase)와 같은 단백질 의약품은

대식세포의 표면에 존재하는 만노오스 수용체를 통해 단백질이 전달되어야 하기 때문에 혼합형과 복합형의 N-글라이칸 대신 고-만노오스형 N-글라이칸을 가지도록 뉴라미니데이즈(neuraminidase), 갈락토시데이즈(galactosidase), 헥소사미니데이즈(hexosaminidase) 등과 같은 글리코시데이즈(glycosidases)를 처리하여 생산되고 있다. 하지만 이와 같은 생산방법은 생산공정을 길고 복잡하게 함으로써 단백질 치료제의 안정성과 생산단가에 많은 영향을 미치고 있다.

- [9] 본 발명에서는 상기와 같은 현재 기술 분야의 문제점을 해결하기 위하여 고세병 치료제로 사용되는 베타-글루코세레브로시데이즈(β -glucocerebrosidase)를 포함한 라이소좀 축적 질환의 단백질 치료제와 만노오스 말단을 가지는 당단백질 의약품을 효율적으로 생산하는 기술을 개발하고자 한다. 이를 위하여, UDP-GlcNAc: α 3-D-만노사이드 β 1,2-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I(UDP-GlcNAc: α 3-D-mannoside β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I; GnTI)의 유전자 발현과 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I의 기능이 상실된 벼와 그 씨앗으로부터 유래된 캘러스를 동정하고 이들을 고-만노오스형 N-글라이칸을 가진 단백질 의약품을 생산하는데 이용하고자 한다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I(N-acetylglucosaminyltransferase I)(GnTI)의 기능을 상실한, 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 *gnt1* 돌연변이 식물체를 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I(N-acetylglucosaminyltransferase I)(GnTI)의 기능을 상실한, *gnt1* 돌연변이 식물체 또는 그 캘러스를 이용하여 고-만노오스형 N-글라이칸 단백질의 생산 방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I(N-acetylglucosaminyltransferase I)(GnTI)의 기능을 상실한, 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체의 선별 및 분석 방법을 제공하는 것이다.

[14]

과제 해결 수단

- [15] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I(N-acetylglucosaminyltransferase I)(GnTI)의 기능을 상실한, 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 *gnt1* 돌연변이 식물체를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I(N-acetylglucosaminyltransferase I)(GnTI)의 기능을 상실한, *gnt1* 돌연변이

식물체, 종자 또는 그 캘러스를 이용하여 고-만노오스형 N-글라이칸 단백질의 생산 방법을 제공한다.

- [17] 또한, 본 발명은 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I(N-acetylglucosaminyltransferase I)(GnTI)의 기능을 상실한, 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체의 선별 및 분석 방법을 제공한다.

[18]

발명의 효과

- [19] 본 발명에 따른 *gnt1* 돌연변이 식물체는 UDP-GlcNAc:α3-D-만노사이드 β1,2-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I(GnTI)의 기능을 상실시킴으로써, 상기 식물체를 이용할 경우 혼합형 및 복합형의 N-글라이칸 당단백질의 생산을 억제하고, 대신 고-만노오스 N-글라이칸 당단백질을 생산할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 고-만노오스 N-글라이칸을 갖는 단백질은 라이소좀 축적 질환의 단백질 치료제에 따른 만노오스 말단을 가지는 당단백질 의약품 등에 이용될 수 있으므로 단백질 의약품 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 벼 GnTI의 발현에 의한 애기장대의 상보작용(complementation)을 나타낸 도이다. 복합형 및 혼합형 N-글라이칸의 형성을 항-홀스래디쉬(anti-horseradish peroxidase; anti-HRP), 항-퓨코오스(anti-fucose) 및 항-자일로오스(anti-xylose) 항체들을 이용한 면역블롯(immunoblot)에 의해 비교하고, 고-만노오스형 N-글라이칸의 양을 콘카나발린(concanavalin) A를 이용한 렉틴 블롯 분석에 의해 측정하였다.
- [22] 도 2는 벼에서 *gnt1*에 T-DNA를 삽입한 돌연변이체를 확인한 도이다. 도 2(a)는 벼의 GnTI 및 T-DNA 삽입 위치의 게놈 구조를 도식화하였다. 도 2(b)는 T-DNA 삽입에 의한, *gnt1*에서 44 뉴클레오타이드의 결실을 나타내었다. 도 2(c)는 표시된 프라이머쌍을 이용하여 이형접합성(He) *gnt1*, 동형접합성(Ho) *gnt1* 및 WT의 지노타이핑(genotyping)을 나타내었다. 도 2(d)는 HE, Ho 및 WT의 RT-PCR 분석을 나타내었다. 도 2(e)는 HE, Ho 및 WT의 DNA 젤 블롯 분석을 나타내었다.
- [23] 도 3은 *gnt1* 및 WT에서 GnTI 및 인접 유전자의 발현 분석을 나타낸 도이다. WT과 GnTI에서 양이온 방출 패밀리 단백질(Os02 g58580), GnTI 단백질(Os02 g58590), 가상 단백질(hypothetical protein; Os02 g58600) 및 단백질 카이네이즈(Os02 g58610)를 암호화하는 유전자의 발현을 각각 나타내었다.
- [24] 도 4는 *gnt1* 및 WT으로부터 수득한 잎 단백질 전체의 면역 블롯(immunoblot) 친화성 블롯(affinoblot)을 나타낸 도이다. 상기 블롯들은 항-홀스래디쉬(HRP), 항-퓨코오스(anti-fucose), 항-자일로오스(anti-xylose) 항체로 표시하였고, 친화성 블롯 분석은 콘카나발린 A(concanavalin A; con A)/퍼옥시데이즈 시스템을 이용하였다.

- [25] 도 5는 WT에서 PNGase A-방출 피메틸화 N-글라이칸의 MALTI-TOF 질량분석 결과를 나타낸 도이다. N-아세틸글루코사민(사각형), 푸코오스(삼각형), 자일로오스(별표), 만노오스(까만 원(black circle)) 및 갈락토오스 잔기(빈원(empty circle))를 각각 도형으로 나타내었다.
- [26] 도 6은 *gnt1* 캘러스에서 PNGase A-방출 피메틸화 N-글라이칸의 MALTI-TOF 질량분석 결과를 나타낸 도이다. N-아세틸글루코사민(사각형), 푸코오스(삼각형), 자일로오스(별표), 만노오스(까만 원(black circle)) 및 갈락토오스 잔기(빈원(empty circle))를 각각 도형으로 나타내었다.
- [27] 도 7은 *gnt1* 및 WT에서 형광 표지된 N-글라이칸의 HPLC 프로파일(profile)을 나타낸 도이다. N-아세틸글루코사민(사각형), 푸코오스(삼각형), 자일로오스(별표), 만노오스(까만 원(black circle)) 및 갈락토오스 잔기(빈원(empty circle))를 각각 도형으로 나타내었다.

[28]

발명의 실시를 위한 형태

- [29] 본 발명은 *gnt1* 유전자의 발현을 완전히 억제시킴으로써 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I(N-acetylglucosaminyltransferase I)(GnTI)의 기능을 상실한, 고-만노오스형 N-글라이칸 단백질을 생산하는 *gnt1* 돌연변이 식물체를 제공한다.
- [30] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [31] 본 발명에 따른 *gnt1* 돌연변이 식물체는 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I(N-acetylglucosaminyltransferase I)(GnTI)의 기능을 상실시킴으로써 고-만노오스형 N-글라이칸 단백질을 생산하는 것을 특징으로 한다.
- [32] 상기 식물체는 이에 한정되지 않지만, 식량작물류, 채소작물류, 특용작물류, 과수류, 화훼류 및 사료작물류일 수 있으며, 바람직하게는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수, 애기 장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립, 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 또한 실험용으로 애기 장대를 포함한 식물에서 효과적으로 발현이 결여될 수 있으며, 본 발명에서는 GnTI 유전자의 발현이 완전히 억제된 벼(*Oryza sativa*)를 선별하였다.
- [33] 포유류와 식물 단백질 발현계 사이의 주요 차이점의 하나는 골지체 내에서의 N-글라이칸 생합성 경로의 차이에 의해 야기된 단백질 N-글라이칸 구조의 변이(variation)이다. 글라이코실화(glycosylation)는 단백질의 활성, 폴딩, 조립,

이동, 안정성, 용해도, 프로테아이즈에 대한 감수성, 반감기 및 항원성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 따라서, 식물체에서 당단백질 의약품을 생산할 때는 식물 특이적 글라이코실화의 잠재적 영향을 고려해야 한다. 글라이칸 가공과정은 가장 통상적인 번역 후 가공과정(post-translational modificaiton)중 하나이다. 단백질 글라이코실화는 두 개의 카테고리, 즉, N-결합 및 O-결합으로 나뉘어진다. 이 두 형태는 단백질 상에서 글라이칸 부위가 부착되는 아미노산이 다르다. 즉, O-결합은 세린 또는 트레오닌 잔기에 부착되는 반면, N-결합은 아스파라긴 잔기에 부착된다. 또한, 각각의 형태의 글라이칸 서열은 특유의 뚜렷한 특징을 가진다. 본 발명에서는 GnTI 유전자 발현이 결여된 벼를 동정하고 이를 고-만노오스형 N-글라이칸 단백질 생산에 이용하고자 하며 고-만노오스형 N-글라이칸은 하나 이상의 노출 만노오스 잔기를 가진 글라이칸을 말한다.

[34]

[35] 본 발명에서는 *gntI* 유전자의 발현을 완전히 억제시킴으로써, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이스 I(GnTI)의 기능이 완전히 상실된 식물체를 제조할 수 있다.

[36] 상기 GnTI의 기능을 상실시키는 방법은 당업계에서 공지된 방법, 즉, 유전자 제거(gene deletion), 유전자 삽입(gene insertion), T-DNA 삽입, 동종 재조합(homologous recombination) 또는 트랜스포존 태깅(transposon tagging) 등의 방법이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 T-DNA가 삽입된 식물체의 형질전환(transformation) 집단에서 UDP-GlcNAc:alpha 3-D-mannoside β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I(GnTI)의 유전자 발현이 결여됨으로써 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이스 I의 기능을 상실한 식물체(*gntI*)를 선별하는 방법을 이용하였다.

[37] 상기 GnTI 기능 상실은 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 전체 또는 일부를 제거하여 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 상기 염기서열의 제거는 T-DNA를 식물체에 도입함으로써 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지 않고 GnTI유전자에 T-DNA가 삽입되어 기능상실된 식물체가 제조되는 과정은 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의하여 이루어질 수 있다.

[38] 상기 *gntI* 유전자의 발현을 완전히 억제시킴으로써 GnTI의 기능을 상실한 *gntI* 돌연변이 식물체 집단을 구축하기 위한 방법 중의 하나로, T-DNA 유전자를 식물체 내에 삽입되는 방법이 이용될 수 있다. 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부인 T-DNA 영역을 식물 세포의 염색체 DNA에 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다.

[39] Ti-플라스미드 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수

있다. 상기 마커는 통상적으로 생화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [40] 상기 Ti-플라스미드 벡터를 이용하여 원핵 세포를 형질전환시키는 경우 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 바람직하게는 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)이다. Ti-플라스미드 벡터로 진행 세포를 형질전환시키는 경우 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다. 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl_2 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법(Capecci, M.R., Cell, 22:479(1980)), 전기천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.
- [41] 상기 *gntI* 유전자의 발현을 완전히 억제시킴으로써 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 I(GnTI)의 기능이 완전히 상실된 식물체를 확인하는 방법에 있어서 한 개의 T-DNA가 GnTI 유전자 내에만 삽입되어 GnTI 유전자의 발현이 완전히 결여된 라인을 선별하기 위해서는 선택 배지에서 제초제나 항생제 내성의 분리 비율을 분석하거나, 선택성 마커와 같은 T-DNA 내의 유전자를 프로브(probe)로 사용하여 형질전환 식물체의 게놈 DNA 내에 존재하는 비슷한 서열을 가진 유전자를 혼성화하여 찾아내는 써던 블랏(Southern blot) 분석 등을 통해 형질전환체 내에 한 개의 T-DNA 삽입된 벼의 라인을 선별하는 것이 바람직하다.
- [42] 상기 T-DNA가 GnTI 유전자 내의 어떤 위치에 어떻게 삽입되어 *gntI* 유전자의 발현을 억제하는지를 알아보기 위하여 T-DNA의 왼쪽 경계(left-border)와 오른쪽 경계(right-border) 부위를 PCR로 증폭하고 T-벡터에 클로닝 한 후 그 서열을 분석하는 측면 서열(flanking sequence) 분석 기법으로 상기 벼의 GnTI 유전자에 삽입된 T-DNA의 위치와 제거된 유전자 서열을 분석하는 것이 바람직하다. 이때 GnTI 유전자의 발현이 완전히 결여된 개체를 확보하기 위해서 T-DNA가 GnTI 유전자의 엑손 부위에 삽입되거나 엑손의 일부가 제거되어 해독틀 이동 돌연변이(frame shift mutation)나 넌센스 돌연변이(nonsense mutation)가 유도된 개체를 선별하는 것이 더욱 바람직하다.
- [43] 상기 T-DNA가 GnTI 유전자에 삽입된 식물체는

N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이스 I의 기능 상실을 분석하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다. N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이스 I의 활성은 당업계에 공지된 어떠한 방법으로도 분석할 수 있으며, 바람직하게는 α 1,3-퓨코오스(fucose), β 1,2-자일로오스(xylose)(각각 1:10000 희석, Agrisera), HRP(horseradish peroxidase)(1:20000 희석, Sigma) 항체를 이용해 식물 특이적 당단류와 복합형 N-글라이칸을 탐지하는 면역블로팅(immunoblotting)과 콘카나발린 A(Concanavalin A; Con A)를 이용해 고-만노오스형 N-글라이칸을 탐지하는 친화성 블로팅(affinoblotting)을 수행하여 분석할 수 있고, 또는 전체 N-글라이칸을 펩타이드:N-글라이카네이즈 에이(peptide:N-glycanase A: PNGase A)로 잘라낸 후 MALDI-TOF 질량 분석을 통하여 전체 N-글라이칸 프로파일을 분석할 수 있다.

[44]

[45] 또한, 본 발명은 GnTI 유전자 발현이 결여된 식물체 또는 그 캘러스를 이용한 고-만노오스형 N-글라이칸 단백질의 생산 방법을 제공한다.

[46] 상기 당단백질의 생산 방법은 식물체 내에서 고-만노오스형 N-글라이칸 단백질을 발현시키고, 상기 단백질을 정제하는 단계를 포함하나, 이에 한정하지 않고, 당업계에 공지된 방법에 의한 것을 포함한다.

[47] 상기 N-글라이칸 단백질의 정제 방법으로는 염석법, 투석법, 크로마토그래피, 전기영동법 등의 방법이 있다. 취급규모가 큰 경우에는 염농도나 pH를 변화시켜 이에 대한 용해도가 다른 단백질을 원심조작으로 분리하는 방법(염석)을 일반적으로 사용한다. 담체와의 정전기적 상호작용의 차이를 이용한 이온크로마토그래피나 가교분자 간을 분자의 크기나 형태에 따라 분리시키는 분자체 여과크로마토그래피는 보편적으로 사용하는 방법들이 모두 이용될 수 있다. 특이적인 분자간 상호작용을 이용한 친화성 크로마토그래피, 원심력에 대한 침강속도의 차이를 이용하여 용액내 또는 설탕 등의 밀도구배 내에서 생체물질을 분리시키는 초원심분리법이 가능할 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 당업계에 공지된 통상의 방법을 모두 포함할 수 있다.

[48]

[49] 또한, 본 발명은

[50] (a) *gnt1* 유전자가 제거된 식물체의 유전자 염기서열을 RT-PCR 반응 및 qRT-PCR 반응을 이용하여 확인하는 단계;

[51] (b) 면역 블롯(immunoblot) 또는 친화성 블롯(affinoblot)을 이용하여 상기 식물체로부터 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체를 선별하는 단계;

[52] (c) N-글라이칸을 정제 및 분석하여 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체를 확인하는 단계;

[53] 를 포함하는 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이스

I(N-acetylglucosaminyltransferase I)(GnTI)의 기능을 상실한, 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체의 선별 및 분석 방법을 제공한다.

[54]

[55] 상기 (a) 단계는 *gnt 1* 유전자가 제거된 식물체 dml 프라이머를 mRNA에 대해 PCR 반응을 적용하기 위한 방법으로써, 상기 식물체의 cDNA를 제작한다. 즉, 역전사효소와 올리고(dT)시발체를 사용하여 역전사반응을 전단계로서 시행한다. 또한, 실시간 중합효소연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)은 중합효소 연쇄 반응을 기반으로 한 실험방법이다. 실시간 중합효소연쇄반응은 목표 DNA분자의 증폭과 양의 측정을 동시에 한다. DNA 샘플에서 하나 또는 그 이상의 특정 서열을 위해, 실시간 중합효소연쇄반응은 검출과 양의 측정을 할 수 있게 한다. 측정은 절대적인 복제 수 또는 상대적인 양을 셀 수 있다. 상기 RT-PCR 반응 및 q-RT-PCR 반응의 방법은 하기의 실시예에 한정되지 않고, 당업계의 공지된 모두 포함할 수 있다.

[56]

[57] 상기 (b) 단계는 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체를 선별하는 단계로, 고-만노오스형 N-글라이칸의 생산 여부를 면역 블롯 및 친화성 블롯을 이용하여 상기 식물체로부터 확인할 수 있다.

[58] 상기 면역 블롯 및 친화성 블롯에는 퍼옥시데이즈(POD), 알칼리포스포테이즈, β -갈락토시데이즈, 유레이즈, 카탈레이즈, 글루코스옥시데이즈, 락트산 탈수소 효소, 아밀레이즈 또는 바이오틴-아비딘 복합체 등의 효소가 사용될 수 있고, 형광 면역 측정법의 경우에는 플루오레세인이소티오시아네이트, 테트라메틸로다민이소티오시아네이트, 치환 로다민이소티오아네이트, 디클로로리아진이소티오시아네이트, 알렉사(Alexa) 또는 알렉사플루오로(AlexaFluoro)등의 형광성 물질 또는 형광단이 사용될 수 있으며, 방사 면역 측정법에는 트리티움, 요오드, 인, 황 등의 방사성 동위원소가 사용될 수 있으며, 발광 면역 측정법에는 루시퍼레이즈 방법, 루미놀 퍼옥시데이즈 POD 방법 등이 디옥세탄 화 d물 등의 발광성 물질 등과 함께 사용될 수 있다. 아비딘-바이오틴 방법, 스트렙토아비딘-바이오틴 방법 등을 이용할 때 처럼 항체가 필요에 따라서는 표지 물질과 결합될 수도 있다. 표지 물질과 항체의 결합은 효소 면역 측정법에 있어서는 글루타르알데히드법, 말레이미드법, 피리딜디술피드법, 과요오드산법 등의 방법이 사용될 수 있으며, 방사 면역 측정법에 있어서는 클로라민T법, 볼턴-헌터법 등의 방법이 사용될 수 있다.

[59] 면역학적 측정 방법으로는 상기 예시한 4가지 방법 이외에, 면역 침강법, 면역비탐법, 웨스턴 블로팅법, 면역 염색법, 면역 확산법 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 당업계에 통상의 면역 블롯 방법(immunoblotting)을 모두 포함할 수 있다.

[60]

[61] 상기 (c)단계는 N-글라이칸을 정제 및 분석하여 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체를 확인하는 단계로, 상기 N-글라이칸 단백질의 정제방법에는 단백질의 용해성, 전하, 분자량, 흡착성이나 다른 생체분자에 대한 친화성 등에

따라 정제하는 것을 의미하며, 생체계에서의 단백질정제는 일반적인 단백질과 같은 방법을 이용할 수 있다.

- [62] 상기 N-글라이칸 단백질의 정제 및 분석 방법은 공지된 방법에 의해 확인될 수 있다. 공지된 방법은 크로마토그래피법, 전기영동법, 질량분석법 등의 통상의 당업계에 공지된 방법을 모두 포함한다. 바람직하게는 HPLC(high performance liquid chromatography) 프로파일링, MALDI-TOF(matrix-assisted laser desorption/ionization) 질량분석법을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[63]

- [64] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 설명일 뿐 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[65]

- [66] [실시예 1] 벼(*Oryza sativa*) **GnTI** 단백질의 효소활성 및 기능활성의 검증

- [67] 벼 GnTI의 *in vivo* 활성을 측정하기 위해, PCR(polymerase chain reaction) 방법을 이용하여 벼 잎의 cDNA 라이브러리(library)로부터 GnTI을 암호화하는 cDNA를 분리하였고, 항구적으로 발현되는 CaMV 35S 프로모터(promoter)의 조절 하에 애기장대(arabidopsis) *cglI-T* 돌연변이체에서 발현시켰다(Frank et al., 2008). 복합형 및 혼합형 N-글라이칸의 형성을 항-홀스래디쉬(anti-horseradish peroxidase; anti-HRP), 항-퓨코오스(anti-fucose) 및 항-자일로오스(anti-xylose) 항체들을 이용한 면역블롯(immunoblot)에 의해 비교하였다. 또한 상기 식물에서 고-만노오스형 N-글라이칸의 양을 콘카나발린(concanavalin) A를 이용한 렉틴 블롯 분석에 의해 측정하였다. 그 결과를 도 1(A-D)에 나타내었다.

- [68] 도 1에 나타난 바와 같이, 면역블롯 및 렉틴 블롯 분석 결과, *cglI-T*에서 벼 GnTI의 발현이 N-글라이칸 성숙(N-glycan maturation)의 결함을 *cglI-T* 골지체에서 회복시키도록 유도함을 확인하였다.

- [69] *cglI*의 스트레스 감수성 표현형은 당단백질(glycoprotein)의 불완전한 N-글라이칸 성숙에 의해 야기된다고 알려져있다(Kang et al., 2008). *cglI-T*에서 회복된 N-글라이칸 성숙이 스트레스 감수성 표현형의 회복을 야기하는지를 검사하기 위해, 염을 포함하는 배지 상에서 WT, *cglI-T* 및 벼 GnTI-발현된 *cglI-T*의 뿌리 성장(C3 및 C7 선)을 분석하였다. 상기 결과를 도 1(E)에 나타내었다.

- [70] 도 1(E)에 나타난 바와 같이, 염 포함 배지 상에서 *cglI-T*의 억제된 뿌리 성장은 벼 GnTI의 발현에 의해 완전히 회복되었다.

- [71] 이러한 실험 결과들은 N-글라이칸 성숙에 있어서 돌연변이체의 GnTI 활성 뿐만 아니라 염 스트레스 감수성 표현형이 벼 GnTI의 발현에 의해 상보(complementation)될 수 있다는 것을 나타내고 상기 결과는 벼 GnTI이 생체내에서(*in vivo*) 효소활성적 및 기능활성적이라는 것을 시사한다.

[72]

- [73] [실시예 2] T-DNA가 삽입된, 벼 **GnTI** 유전자의 결실 돌연변이체(null mutant),

gnt1* 돌연변이체의 제조*[74] 1. 식물 재료 및 성장 조건**

[75] 표면-멸균처리된 벼(*O. sativa* L cv. Nipponbare) 종자를 1% 수크로오스 절반 강도의 Murashige-Skoog(MS) 아가 배지(Duchefa, <http://www.duchefa-biochemie.nl/>)에서 발아시켰다. 묘목을 보광(supplemental lighting)(8 시간 암기/16 시간 명기; $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) 및 낮/밤(30/25°C) 온도 조건을 갖는 성장 챔버에서 2주 동안 배양한 후 온실(태양광)로 옮겼다. 배아-유래의 벼 캘러스를 당업계의 통상의 방법에 따라 유도하여, 유지하였다(Kim et al., 2011).

[76] 애기장대 콜롬비아(*Arabidopsis thaliana* Columbia; Col-0), *cgli-T* 및 상보된 *cgli-T* 종자를 멸균하여, 3% 수크로오스 및 0.25% 젤라틴 검이 보충된 염 혼합물을 포함하는 MS 배지(Duchefa)를 이용하여 보광(supplemental lighting)(8 시간 암기/16 시간 명기; $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)을 갖는 성장 챔버에서 22°C 및 70% 습도 조건으로 5일 동안 배양하였다.

[77]

[78] 2. 삽입 서열의 지노타이핑(Genotyping) 및 분석**[79] GnTI에 T-DNA가 삽입된 돌연변이주를**

Genoplante(<http://www.genoplante.com/>)에서 생산된 T-DNA 돌연변이체 컬렉션으로부터 수득하였다. 게놈 DNA를 페놀-클로로포름을 이용하여 벼의 잎과 캘러스로부터 추출하였다. [P2 + LB] 및 [P1 + P2]인 특이적 프라이머의 조합을 이용한 PCR반응을 T-DNA의 삽입 부위 및 동형접합성을 확인하기 위해 이용하였다. T-DNA 삽입 부위를 [P2 + LB] 및 [P1 + P2]인 특이적 프라이머를 이용하여 PCR로 회복시켰고, pGEM-T 벡터(Promega, <http://www.promega.com/>)로 클로닝하였으며 시퀀싱(sequencing)으로 분석하였다. 본 발명에서 이용된 프라이머를 하기 표 1에 나타내었다.

[80]

[81] 표 1

[Table 1]

프라이머명	염기서열 (5' → 3')	용도
OsRR2-F	5'-CGTGCTGACCGACTACTG-3'	qPCR
OsRR2-R	5'-GCTCATTCTCCGACGACAT-3'	qPCR
OsRR4-F	5'-CAAGAGGGTGAAGGGATCAT-3'	qPCR
OsRR4-R	5'-ACCATCTTCCAAGCACCTGT-3'	qPCR
OsORR6-F	5'-CATCACCGACTACTGGATGC-3'	qPCR
OsORR6-R	5'-GAGCTGAGACGATTCCTTGAC-3'	qPCR
OsCesA3-F	5'-CGGTGTGTGCTGAAGGAATA-3'	qPCR
OsCesA3-R	5'-GTTTGCCCAAATATTGCAGA-3'	qPCR
OsCesA4-F	5'-GATGGGTGGTTTCCTCTCTC-3'	qPCR
OsCesA4-R	5'-AACGGTGCCCTCTCATAGTT-3'	qPCR
OsCesA7-F	5'-GAGCAAGATCAACCCGTACC-3'	qPCR
OsCesA7-R	5'-GATCCGGAACCTTGAGGAAGA-3'	qPCR
OsCesA9-F	5'-GCAGCTGTGTTCTCATTGCT-3'	qPCR
OsCesA9-R	5'-ACTTCAGCCCTTGACCAAAT-3'	qPCR
OsCSLD4-F	5'-CTCCCTCCTCTGGGTCTACA-3'	qPCR
OsCSLD4-R	5'-TCAAGAACTGAACTCGACACC-3'	qPCR
OsActin1q-F	5'-AGCACATTCCAGCAGGTA-3'	qPCR
OsActin1q-R	5'-CAACGGCAAGCAACATTG-3'	qPCR
Os02g58580-F	5'-TACGGAGTGCAGGCTTGATA-3'	qPCR
Os02g58580-R	5'-TGAACACTGCCACTGAAACA-3'	qPCR
Os02g58590-F	5'-TGGAATAAATGGAGAAGTGAAGAA-3'	qPCR
Os02g58590-R	5'-TTGGCTATCTTGTAATATGCTATCAAC-3'	qPCR
Os02g58610-F	5'-TCAAGTCCGACGTCTACAGC-3'	qPCR
Os02g58610-R	5'-CTGCGTCCAGTGATGAGC-3'	qPCR
P3	5'-CCGAAAACCAATGCACCAGTCAAC-3'	RT-PCR
P4	5'-TGTATGTTCTGCAGACTTCCGGGC-3'	RT-PCR
OsActin1-F	5'-ACCCCATCGAGCATGGTATCGTCA-3'	RT-PCR
OsActin1-R	5'-CAGCCTTGGCAATCCACATCTGCT-3'	RT-PCR
P1	5'-CACATCGACCTCCATGTGACATGC-3'	지노타이핑

P2	5'-GTGGAAACTTTGAAGCCACTGATGTCTG-3'	지노타이핑
LB	5'-AGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATAT-3'	지노타이핑
RB	5'-GATCGTTAAAACTGCCTGGCACAGC-3'	지노타이핑
HPT-F	5'-CTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCG-3'	PCR
HPT-R	5'-CGGCGAGTACTTCTACACAGCCATCG-3'	PCR
GnTI-F	5'-GAGCTCATGGCGCGGAGCC-3'	클로닝
GnTI-R	5'-TCTA ACTATACCCTAAGCTGACTGAGGGAATCC-3'	클로닝

[82]

[83] **3. RT-PCR 및 qRT-PCR 분석**

[84] 전체 RNA를 NucleoSpin RNA Plant Kit(Macherey-Nagel, <http://www.mn-net.com/>)를 이용하여 매뉴얼에 따라 벼의 다양한 조직으로부터 추출하였다. 각 조직을 RevertAid™ kit(Fermentas, <http://www.thermoscientificbio.com/fermentas/>) 또는 ReverTraAce-a kit (Toyobo, <http://www.toyobo-global.com/>) 매뉴얼에 따라 1 µg의 정제된 RNA와 poly(T)₁₈ 프라이머를 사용하였다. 1 µl의 단일 가닥 cDNA를 후속 PCR의 주형(template)으로 사용하였다.

P3(5'-CCGAAAACCAATGCACCAGTCAAC-3')와

P4(5'-TGTATGTTCTGCAGACTTCCGGGC-3')를 정방향 및 역방향 프라이머

세트로서 각각 이용하였다. 액틴1 프라이머를 RNA 함량의 대조군으로

이용하였다. PCR 반응 조건은 하기와 같다; 1회, 94°C에서 2분(변성); 28회,

94°C에서 15초(변성), 60°C에서 30초(복원), 70°C에서 1분(신장); 및 1회, 70°C에서

5분. qRT-PCR을 CFX96® Detection System(Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com/>) 및

SsoFast® Eva-Green® Supermix (Bio-Rad) RT-PCR 혼합물을 이용하여 수행하였다.

OsAct1를 증폭하여 내부적 양성 대조군으로 이용하였다.

[85] 쿼리(query)로서의 벼 cDNA(AJ457976) 서열을 갖는 TIGR 벼 게놈 어노테이션 데이타베이스(genome annotation database)의 BLAST 검색은 18개의 엑손으로 구성된 GnTI 유전자가 Os02 g58590 좌위에서 단일 복제체(copy)로서 존재한다는 것을 나타내었다.

[86] 벼 식물체에서 GnTI의 생리학적 역할을 설명하기 위해서, 본 발명자들은 Rice functional Genomic Express Database(<http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE>)에서의 Loc_Os02 g58590와 결합된 벼 돌연변이체를 스크리닝하여 Grenoplane 벼로 태그를 붙인 라인 셀렉션으로부터 수득하였다. GnTI에서 T-DNA 삽입을 포함하는 돌연변이체 라인(SAI3G12)을 검색으로 확인하였고 Genoplane 벼-태그된 라인 콜렉션으로부터 수득하였다. *gnt1* 돌연변이체로 표기된, 동형접합성 돌연변이 식물체를 유전자 특이적 프라이머(P1, P2, P3 및 P4) 및

T-DNA(LB) 프라이머를 이용하여 게놈 PCR 및 RT-PCR 분석에 의해 확인하였다. 이형접합성 식물체는 하이그로마이신 저항성에 대한, 예상된 멘델성 분리 비율을 나타내었다. 상기 결과를 표 2에 나타내었다.

[87]

[88] 표 2

[Table 2]

전체	저항성	감수성	χ^2
451	327	124	1.49

[89]

[90] 표 2에 나타낸 바와 같이, 하이그로마이신을 포함하는 배지에서 자손으로부터 수득한 이형접합성 *gnt1* 돌연변이체의 분리 비율을 확인하였다. 표 2에 검증된 묘목의 전체 수 및, 하이그로마이신에 저항성 또는 감수성을 보여주는 묘목의 수를 나타내었다. χ^2 검증을 T-DNA 삽입의 복제체 수를 평가하여 이용하였고, 유의수준은 0.05이다.

[91] 본 발명자들은 동형접합성 *gnt1* 돌연변이 식물체에서 RT-PCR에 의해 GnTI의 자연상의 전사체를 감지할 수 없었다. *gnt1*의 이형접합성 식물체로부터 수득된 야생형(WT)의 자매종을 본 발명의 야생형 대조군으로 이용하였다. 본 발명자들은 인접 유전자의 발현이 GnTI에 삽입된 T-DNA에 의해 영향을 받는지를 확인하기 위해 qRT-PCR(quantitative real-time PCR)에 의한 유전자 발현을 측정하였다. 상기 결과를 도 3에 나타내었다.

[92] 도 3에 나타낸 바와 같이, 양이온 방출 패밀리 단백질(Os02 g58580), 가상 단백질(hypothetical protein; Os02 g58600) 및 단백질 카이네이즈(Os02 g58610)를 암호화하는 유전자의 발현에 있어서 *gnt1*와 WT간의 유의한 차이를 보이지 않았다.

[93]

[94] 4. DNA 젤 블롯(gel blot) 분석

[95] 이형접합성 *gnt1* 돌연변이체 또는 동형접합성 *gnt1* 돌연변이체의 야생형 벼 캘러스로부터 수득한 10가지 미생물의 게놈 DNA를 *Bam*HI 및 *Eco*RI를 이용하여 분해하였다. 상기 DNA 단편들을 0.8% 아가로오스 젤 상에서 전기영동에 의해 분리하였고, 염 전달 프로토콜을 이용한 모세혈관 이전법(capillary transfer)에 의해 나일론 멤브레인(Hypobond-N+, GE Healthcare, <http://www.gelifesciences.com>)으로 이동시켰다. DNA를 1200 μ J cm⁻²의 UV 교차-결합에 의해 멤브레인상에 고정하였고 2 x SSC에서 5분 동안 세척하였다. 이후 주형으로서 *gnt1* 돌연변이체 유래의 게놈 DNA를 이용하여 PCR에 의해 T-DNA 특이적 프로브를 생산하기 위해, HPT-F 및 HPT-R 프라이머쌍을 이용하였다. 멤브레인을 ³²P-표지된 T-DNA 특이적 프로브로 혼성화하였고 온건한 조건 하에서 세척하였다. 상기 블롯을 70°C에서 24 내지 72시간 동안 증감

스크린을 갖는 카세트에서 엑스레이 필름에 노출시켜 자가방사법에 의해 가시화하였다.

- [96] DNA 젤 블롯 및 분리 분석으로부터의 실험결과는 *gnt1* 돌연변이체가 단일 T-DNA 삽입 유전자를 포함한다는 것을 나타내었다. 상기 결과를 도 2에 나타내었다.
- [97] 도 2에 나타낸 바와 같이, 유전자 특이적(P1 및 P2) 프라이머 및 T-DNA(LB 및 RB) 프라이머를 이용하여 제조된 PCR 단편들의 서열분석은 T-DNA가 GnTI에 삽입되었다는 것과 6개의 엑손(42 nt)과 6개의 인트론(2 nt)을 각각 포함하는 44 뉴클레오타이드(nt)가 결실되었으며 T-DNA에 의해 치환되었다는 것을 확인하였다. 따라서 6개의 엑손/인트론 연결부분에서의 T-DNA 삽입은 비정상적인 GnTI의 스플라이싱(splicing) 및 미성숙 종결 코돈의 도입을 유도하고, 이것은 궁극적으로 전사후 mRNA 분해(post-transcriptional mRNA degradation)를 야기시킨다.
- [98]
- [99] [실시예 3] *gnt1* 돌연변이체에서 N-글라이칸 성숙(maturation)의 기능 상실(abolishment)의 검증
- [100] 1. 면역 블롯(immunoblot) 및 친화성 블롯(affinoblot) 분석
- [101] 식물체(벼) 단백질 추출물을 면역 블롯 및 친화성 블롯 분석을 위해 3주생의 *gnt1* 돌연변이체 및 야생형 묘목을 이용하여 상술한 바와 같이(Strasser et al., 2004) 수행하였다. 10가지 미생물의 전체 단백질 추출물을 10% SDS-PAGE 겔에 용해하였고 나이트로셀룰로오스 멤브레인에 이동시켰다(Hybond-ECL, Amersham). 식물체 특이적인 당 잔기를 갖는 N-글라이칸을 면역 블로팅으로 측정하기 위해 멤브레인을 α 1,3-푸코오스, β 1,2-자일로오스(Agrisera) 또는 HRP(Sigma, <http://www.sigmaaldrich.com/>)에 대한 항체로 표지하였다. 콘카나발린 A를 면역블로팅으로 고-만노오스 N-글라이칸을 측정하기 위해 이용하였다.
- [102] 벼 *gnt1* 돌연변이체가 포시만노오스(paucimannose) 또는 복합형 N-글라이칸 대신 고-만노오스 N-글라이칸을 갖는 당단백질을 생산하는지를 확인하기 위해 본 발명자는 항-홀스래디쉬(anti-HRP), 항-푸코오스(anti-fucose), 항-자일로오스(anti-xylose) 항체를 이용한 면역블롯 및 con A를 이용한 렉틴 블롯 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [103] 도 4에 나타낸 바와 같이, 항-홀스래디쉬, 항-푸코오스, 항-자일로오스 항체는 야생형으로부터 유래된 단백질에만 반응하였고, *gnt1* 돌연변이체에는 반응하지 않았다. 이것은 코어 α 1,3-푸코오스 및 β 1,2-자일로오스 잔기를 포함하는 포시만노오스 및 복합형 N-글라이칸의 형성은 *gnt1* 돌연변이체에서 기능 상실되었다는 것을 보여주었다. 대조적으로, 콘카나발린 A는 *gnt1* 돌연변이체로부터 유래된 단백질과 강한 반응을 나타내었으나, 야생형으로부터 유래된 단백질과는 약한 반응을 보여주었고, 이것은 고-만노오스 N-글라이칸의

양이 *gnt1* 돌연변이체에서 증가되었다는 것을 확인하였다.

[104]

[105] **2. N-글라이칸 정제 및 분석**

[106] N-글라이칸 정제를 위한 단백질을 상술한 바와 같이 캘러스로부터 추출하였다(Bakker et al., 2006). 상기 단백질을 트립신을 이용하여 분해하였고 고정된 N-글라이칸을 PNGase A에 의해 방출하였다(Roche, <http://www.roche.com/>). 분해 후, 상기 샘플을 C18 Sep-Pak 카트리지를 통과시킨 후, 동결 건조시켰다. 탄수화물 분획물을 다이메틸설폭사이드에서 용해시킨 후 상술한 바와 같이(Anumula and Taylor, 1992) 퍼메틸화(permethylation)시켰다.

[107]

[108] **3. MALDI-TOF(Matrix-assisted laser-desorption time-of-flight) 질량 분석**

[109] 본 발명자들은 리플렉터 양이온 모드(reflector positive ion mode)에서 MALDI-TOF 질량 분석법을 다이하이록시벤조산(DHBA; 20 mg ml⁻¹ solution in 50% methanol:water)을 이용하여 수행하였다. 스펙트럼을 Microflex LRF(Bruker, <http://www.bruker.com/>)을 이용함으로써 획득하였다.

[110] 정량적이고 비교 구조적인 정보를 얻기 위해서, 배아-유래의 캘러스로부터 추출된 당단백질을 MALDI-TOF 질량분석기(matrix-assisted laser-desorption time-of-flight mass spectrometry) 분석에 이용하였다. 상기 결과를 도 5, 도 6 및 표 3에 나타내었다.

[111] 야생형(WT) 캘러스로부터 획득한 N-글라이칸의 질량 스펙트럼은 β 1,2-자일로오스, α 1,3-푸코오스를 포함하는 다양한 복합형 N-글라이칸 및 루이스(Le^a) 항원결정부위(epitope)가 WT 캘러스에서 발현되었다는 것을 나타내었다. 대조적으로, *gnt1* 돌연변이체 캘러스로부터 유래된 N-글라이칸은 대부분 주요한 형태로 Man₅GlcNAc₂을 갖는 고-만노오스 N-글라이칸(Man_{4,9}GlcNAc₂)(76.7%)으로 구성되어 있지만, 포시만노오스 및 복합형 N-글라이칸은 발견되지 않았다.

[112]

[113] 표 3

[Table 3]

이론적 <i>m/z</i>	측정된 <i>m/z</i>	N-글라이칸 구조	WT(%)	<i>gnt1</i> (%)
		복합형 N-글라이칸		
1330	1332	Man ₃ XylGlcNAc ₂	6.83	ND
1504	1506	Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	51.63	ND
1575	1577	GlcNAcMan ₃ XylGlcNAc ₂	2.79	ND
1750	1752	GlcNAcMan ₃ XylFucGlcNAc ₂	15.72	ND
1821	1823	GlcNAc ₂ Man ₃ XylGlcNAc ₂	1.44	ND
1954	1956	GalGlcNAcMan ₃ XylFucGlcNAc ₂	2.76	ND
1995	1997	GlcNAc ₂ Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	8.07	ND
2128	2130	GalFucGlcNAcMan ₃ XylFucGlcNAc ₂	1.59	ND
2199	2201	GalGlcNAc ₂ Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	1.81	ND
2373	2375	GalFucGlcNAc ₂ Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	3.47	ND
2577	2579	Gal ₂ FucGlcNAc ₂ Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	0.38	ND
2751	2754	Gal ₂ Fuc ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	1.81	ND
		합계	98.3	0
		고-만노오스형 N-글라이칸		
1374	1376	Man ₄ GlcNAc ₂	ND	17.47
1579	1581	Man ₅ GlcNAc ₂	ND	76.72
1783	1785	Man ₆ GlcNAc ₂	1.7	2.8
1987	1989	Man ₇ GlcNAc ₂	ND	1.4
2191	2193	Man ₈ GlcNAc ₂	ND	1.4
2395	2397	Man ₉ GlcNAc ₂	ND	0.21
		합계	1.7	100

[114]

[115] 표 3은 WT 및 *gnt1* 켈러스로부터 수득한 N-글라이칸의 MALDI-TOF MS 분석 결과를 나타낸 것이다. 상기 수치는 전체 피크 지역의 백분율(%)을 나타낸 것이다.[ND, not detected; Man, 만노오스; Xyl, 자일로오스; GlcNAc,

N-아세틸글루코사민; Fuc, 푸코오스; Gal, 갈락토오스]. WT 및 *gntI* 으로부터
수득한 N-글라이칸의 정량 분석을 MALDI-TOF MS로 수행하였다.

- [116] WT 및 *gntI* 으로부터 수득한 N-글라이칸의 정량 분석을 분석 이전에
퍼메틸화에 의해 유도체로 생성된 N-글라이칸을 이용하여 MALDI-TOF
질량분석에 의해 수행하였다(Wada et al., 2007). 양호한 이온 통계를 얻기 위해,
제시된 스펙트럼을 100 레이저 샷의 다양한 스펙트럼으로부터 생성하였다. 전체
통합된 동위 원소 집단의 적분된 피크 면적을 상대적 정량 분석으로 측정하였다.

[117]

[118] **4. N-글라이칸의 HPLC 프로파일링(profiling)**

- [119] HPLC 프로파일링을 1.0 ml/분의 유속에서 Asahipak NH2P-50 칼럼(Shodex,
Munich, Germany)을 이용하여 수행하였다. 70% 용매 A(200 mM; 1:9
아세트산/트라이에틸아민(pH 7.3): 아세토나이트릴의 비율) 및 30%의 용매
B(200 mM; 9:1 아세트산/트라이에틸아민(pH 7.3): 아세토나이트릴의 비율)를
포함하는 용액을 이용하여 칼럼을 용액과 평형을 유지시켰다. 샘플을 주입한 후,
용매 B의 비율은 45분 동안 45%까지 선형으로 증가되었다. PA-올리고당을 모델
275 형광 감지기(Waters, Milford, MA)를 이용하여 형광에 의해 측정하였다(320
및 400 nm의 여기 파장 및 방출 파장). 통과된 분획물을 질량 분석기(Microflex
TOF, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)에 의한 피크 동정을 위한 분획물
수집기(fraction collector)를 이용하여 매분마다 수집하였다.

- [120] 상기 MALDI-TOF 질량 분석과 유사한 결과가 야생형(WT) 및 *gntI* 캘러스
유래의 N-글라이칸의 HPLC분석으로부터 얻어졌다. 상기 결과를 도 7 및 표 4에
나타내었다.

[121]

[122] 표 4

[Table 4]

피크 넘버	<i>m/z</i>	N-글라이칸 구조	WT	<i>gnt1</i>
복합형 N-글라이칸				
1	1185.5	Man ₃ XylGlcNAc ₂	9.1	ND
2	1331.7	GlcNAcMan ₃ XylGlcNAc ₂	3.7	ND
3	1388.2	Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	40.0	ND
4	1533.4	GlcNAcMan ₃ XylFucGlcNAc ₂	11.2	ND
5	1737.6	GlcNAc ₂ Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	6.6	ND
6	1695.8	GalGlcNAcMan ₃ XylFucGlcNAc ₂	6.4	ND
7	1842.2	GalGlcNAc ₂ Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	4.2	ND
8	1899.0	GalFucGlcNAcMan ₃ XylFucGlcNAc ₂	2.8	ND
9	2045.1	GalFucGlcNAc ₂ Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	9.2	ND
10	2207.0	Gal ₂ FucGlcNAc ₂ Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	2.2	ND
11	2353.3	Gal ₂ Fuc ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ XylFucGlcNAc ₂	4.6	ND
전체			100	0
고-만노오스형 N-글라이칸				
12	1215.0	Man ₄ GlcNAc ₂	ND	7.4
13	1377.5	Man ₅ GlcNAc ₂	ND	79.6
14	1539.2	Man ₆ GlcNAc ₂	ND	7.6
15	1701.1	Man ₇ GlcNAc ₂	ND	1.9
16	1863.0	Man ₈ GlcNAc ₂	ND	1.9
17	2025.5	Man ₉ GlcNAc ₂	ND	1.6
전체			0	100

[123]

[124] 상기 표 4는 WT 및 *gnt1* 켈러스로부터 수득한 N-글라이칸의 HPLC 분석을 나타낸 것이다. 상기 수치는 전체 피크 지역의 백분율(%)을 나타낸 것이다.[ND, no detected; Man, 만노오스; Xyl, 자일로오스; GlcNAc, N-아세틸글루코사민; Fuc,

퓨코오스; Gal, 갈락토오스]. WT 및 *gnt1*으로부터 수득한 N-글라이칸의 정량 분석을 분석 이전에 퍼메틸화에 의해 유도체로 생성된 N-글라이칸을 이용하여 HPLC에 의해 수행하였다(Wada et al., 2007). 피크 면적을 상대적 정량 분석으로 측정하였다.

[125]

[126] 상기 실험결과를 종합해볼 때, 본 발명자는 벼에서 GnTI 활성의 부족은 골지체에서 N-글라이칸 성숙을 완전히 억제하게 만들고, N-글라이칸 성숙의 결함은 Man5GlcNAc₂ 형태를 갖는, 고-만노오스 N-글라이칸의 축적을 주요한 생생물로 유도한다는 것을 확인하였다.

[127]

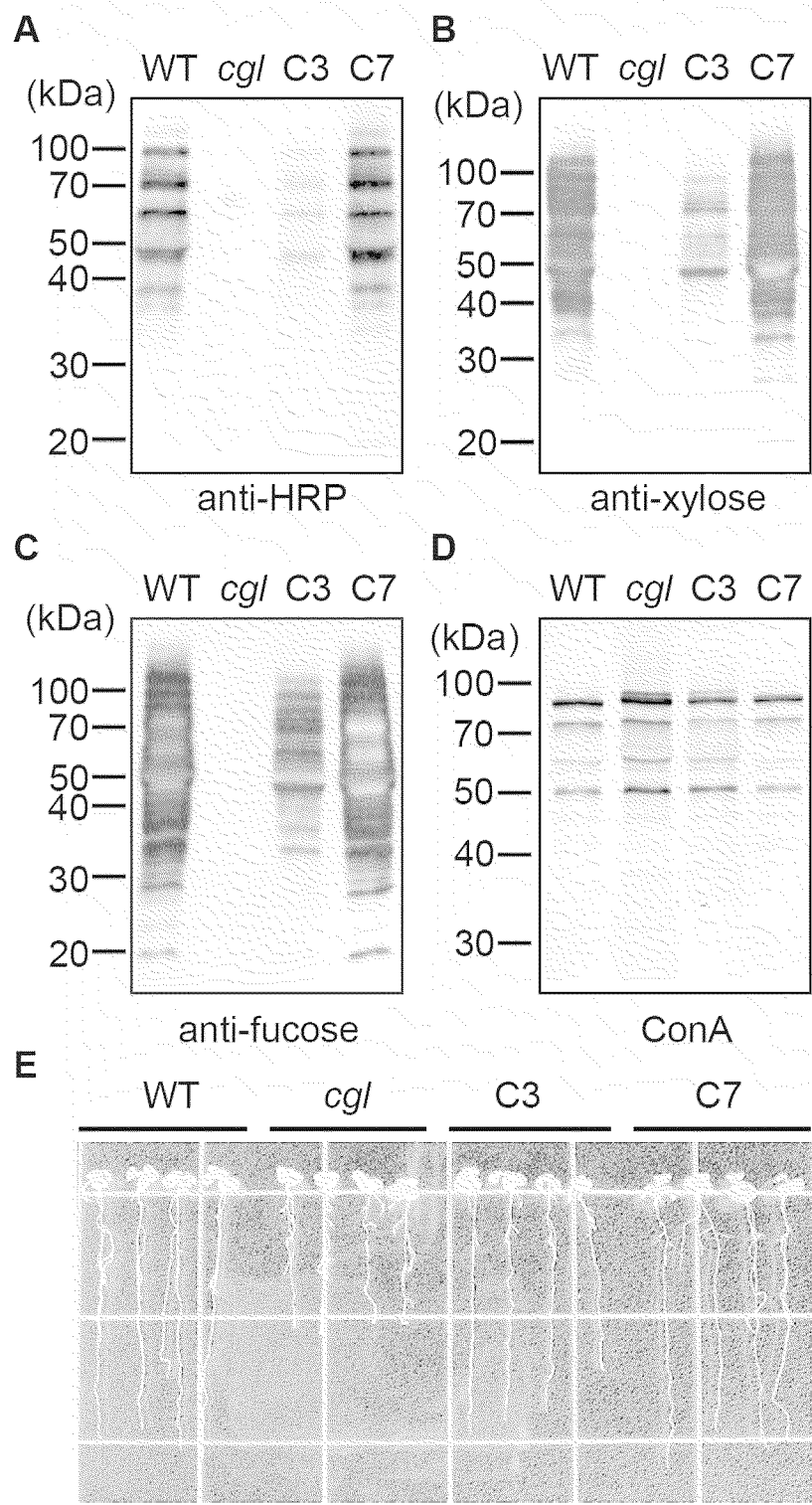
청구범위

- [청구항 1] N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈
I(N-acetylglucosaminyltransferase I)(GnTI)의 기능을 상실한,
고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 *gnt1* 돌연변이 식물체.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 GnTI의 기능을 상실한 *gnt1* 돌연변이
식물체는 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 일부 또는 전체가
제거된 것을 특징으로 하는, *gnt1* 돌연변이 식물체.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 GnTI의 기능 상실은 유전자 제거(gene
deletion), 유전자 삽입(gene insertion), T-DNA 삽입, 동종
재조합(homologous recombination) 또는 트랜스포존
태깅(transposon tagging)의 방법으로 이루어진 군으로부터 선택된
1종 이상의 방법에 의해 상실되는 것을 특징으로 하는, *gnt1*
돌연변이 식물체.
- [청구항 4] 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀,
보리, 옥수수, 콩, 감자, 쌀, 귀리, 수수, 애기 장대, 배추, 무, 고추,
딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근, 인삼,
담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무,
배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구,
바나나, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립,
라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파파, 톨페스큐 및
페레니얼라이그라스로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의
식물체인 것을 특징으로 하는, *gnt1* 돌연변이 식물체.
- [청구항 5] 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 식물체를 이용하여
고-만노오스형 N-글라이칸 단백질을 생산하는 단계를 포함하는,
고-만노오스형 N-글라이칸 단백질의 생산 방법.
- [청구항 6] (a) 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 *gnt1* 유전자가 제거된
식물체의 유전자 염기서열을 RT-PCR 반응 또는 qRT-PCR 반응을
이용하여 확인하는 단계;
(b) 면역 블롯(immunoblot) 또는 친화성 블롯(affinoblot)을 이용하여
상기 식물체로부터 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는
식물체를 선별하는 단계; 및
(c) N-글라이칸 단백질을 정제 및 분석하여 고-만노오스형
N-글라이칸을 생산하는 식물체를 확인하는 단계;
를 포함하는 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈
I(N-acetylglucosaminyltransferase I)(GnTI)의 기능을 상실한,
고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체의 선별 및 분석
방법.

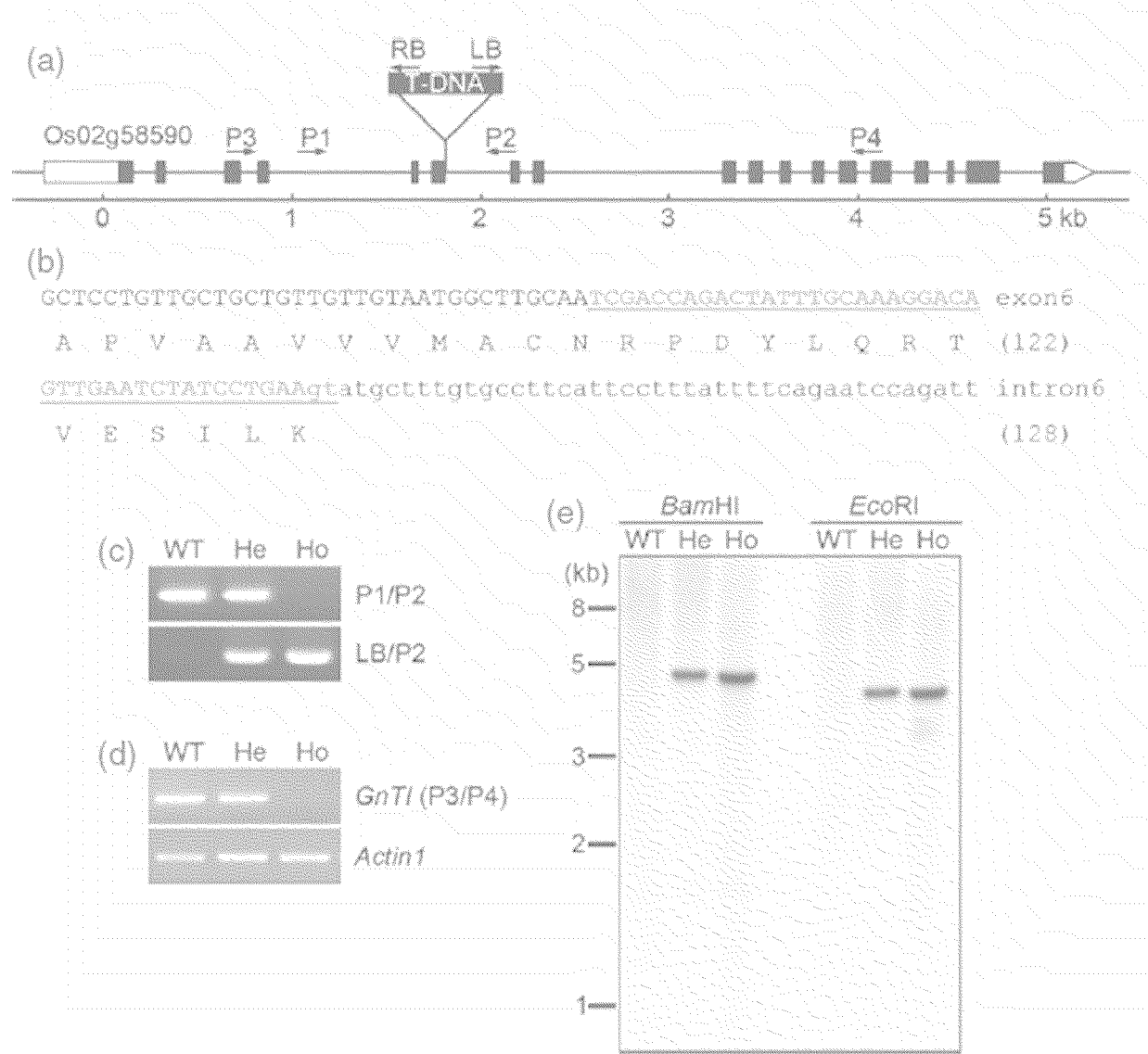
[청구항 7]

제 6항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수, 애기 장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립, 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 식물체인 것을 특징으로 하는, 고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체의 선별 및 분석 방법.

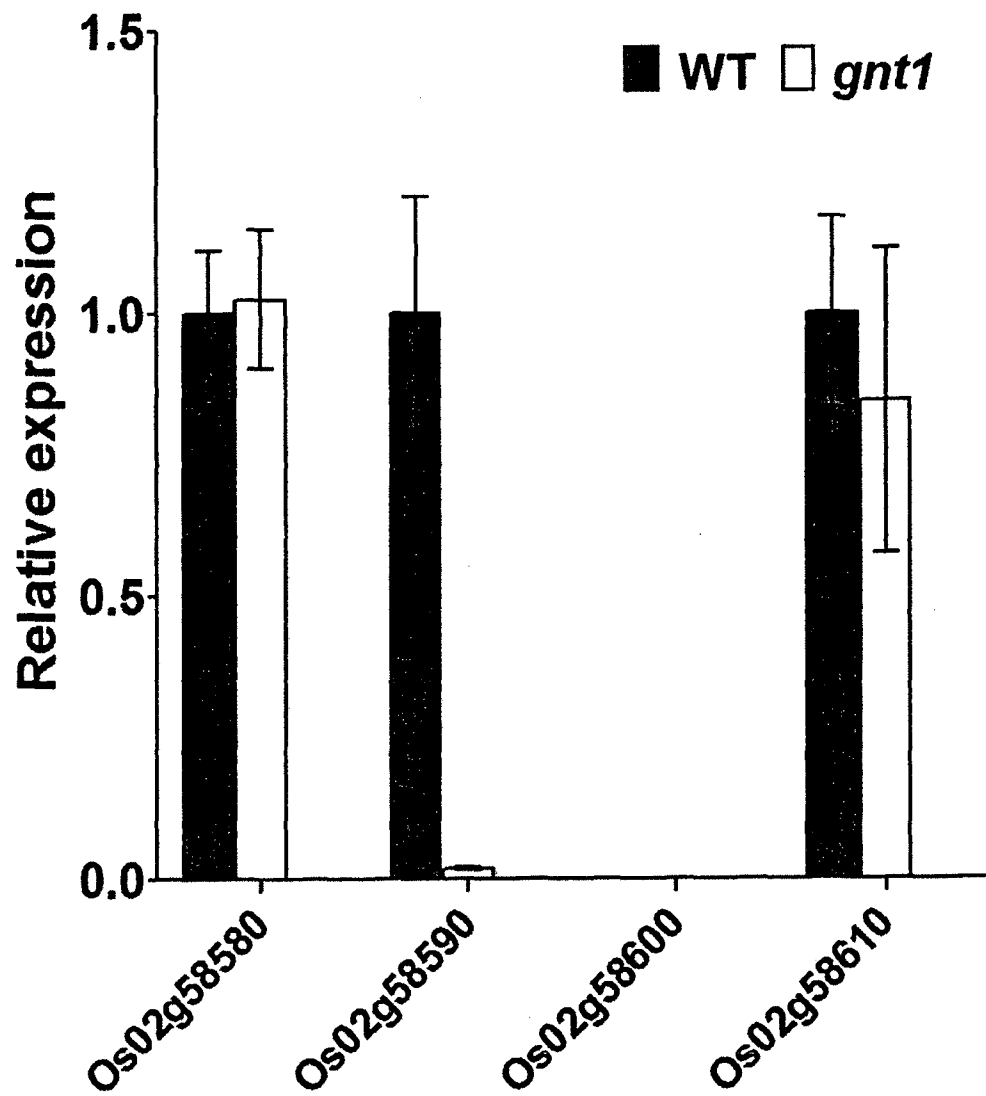
[Fig. 1]



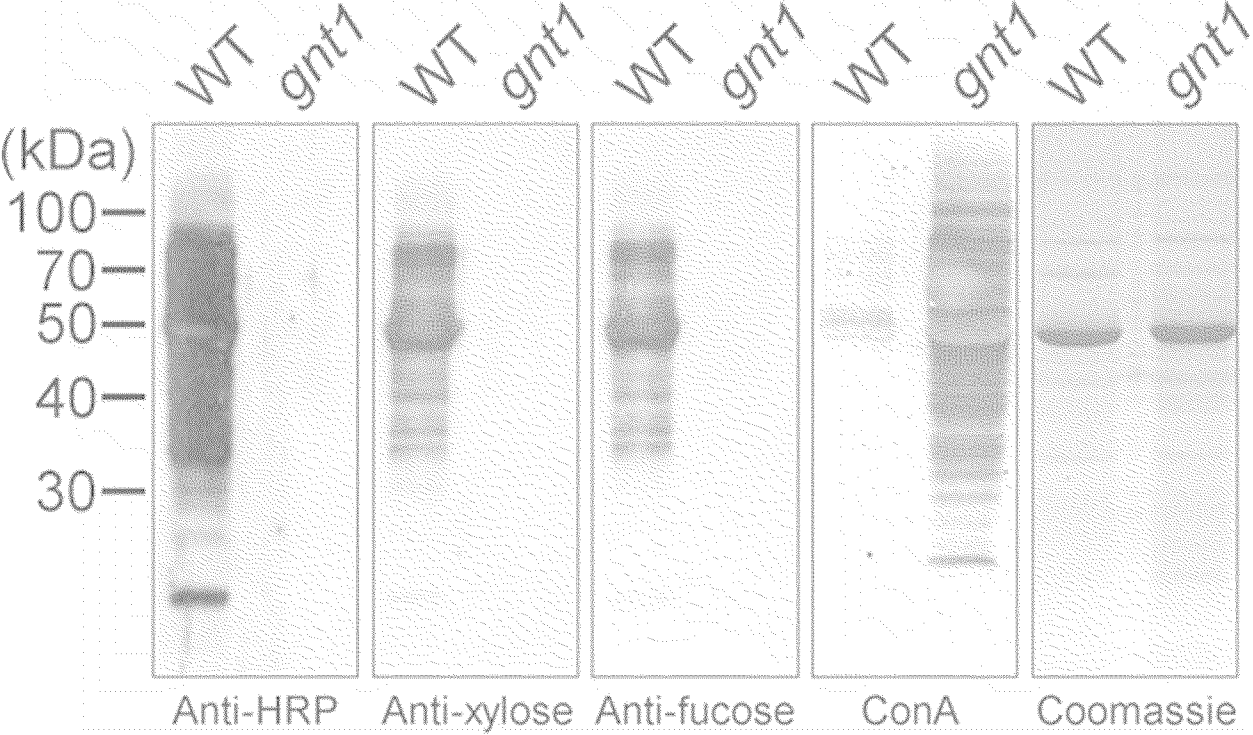
[Fig. 2]



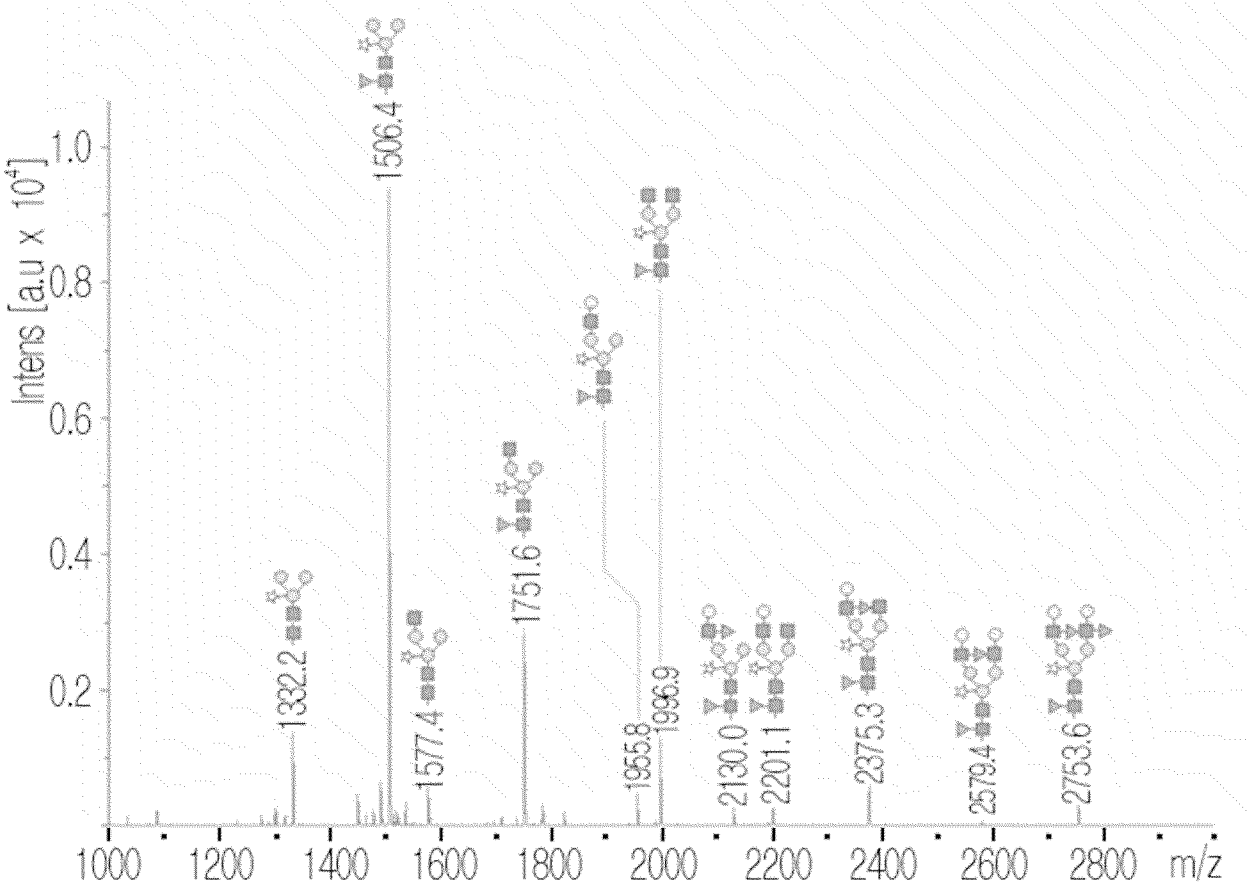
[Fig. 3]



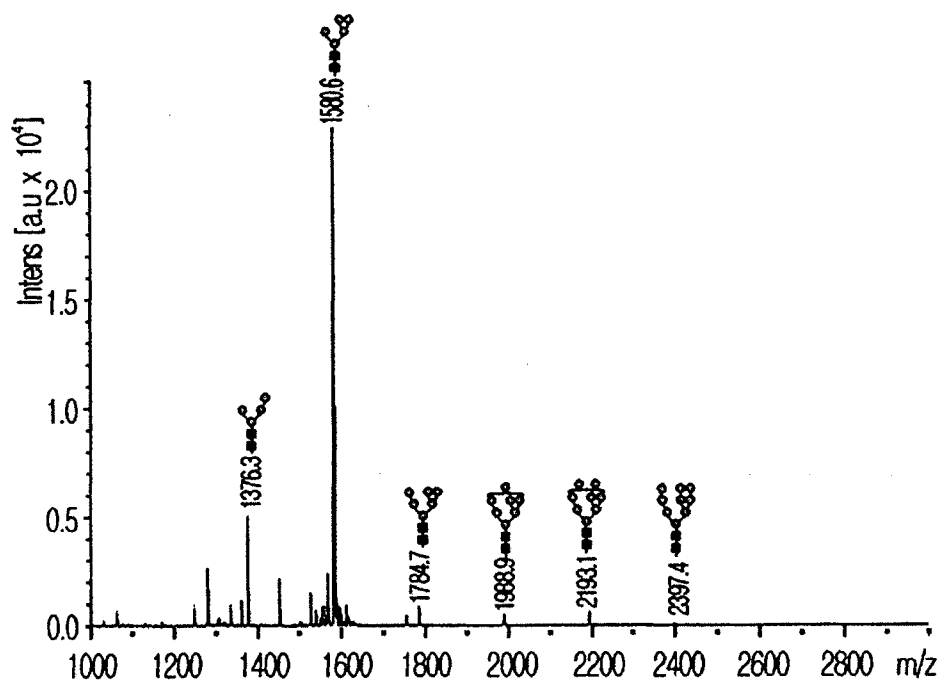
[Fig. 4]



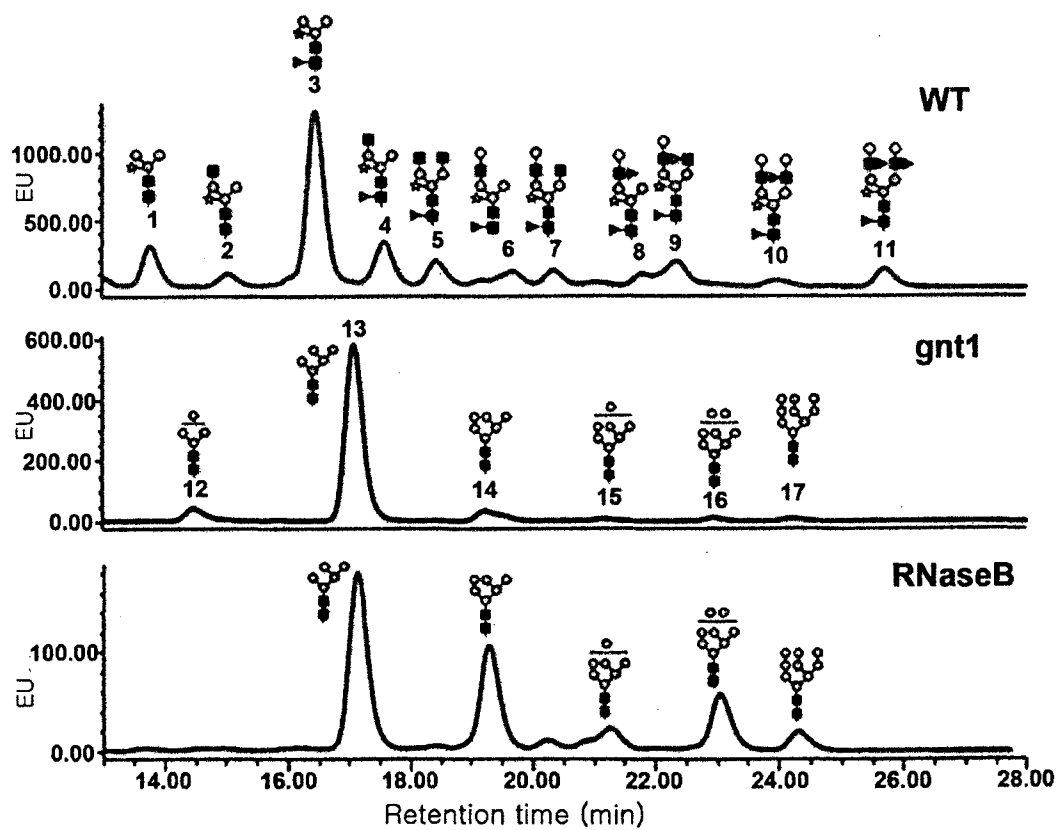
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/004043**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A01H 5/00(2006.01)i, C12N 15/82(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H 5/00; C12P 21/00; C12P 21/04; C12N 5/10; C12N 15/56; C12N 15/82

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: N-acetylglucosaminy transferase, N-acetylglucosaminyl transferase I (GnTI), high-mannose type N-glycan, high-mannose glycan, plant

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VON SCHAEWEN, A. et al., "Isolation of a mutant Arabidopsis plant that lacks N-Acetyl Glucosaminyl Transferase I and is unable to synthesize Golgi-Modified Complex N-Linked Glycans", Plant Physiology, August 1993, vol. 102, pp. 1109-1118. See pages 1110-1112 ; abstract.	1,3-7
A		2
A	SARIBAS, A. Sami et al., "Refolding of human β -1-2 GlcNAc transferase (GnT1) and the role of its unpaired Cys 121", Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, vol. 362, no. 2, pp. 381-386. (13 August 2007) See pages 382-384.	1-7
A	US 2011-0008837 A1 (D-AOUST, Marc-Andre et al.) 13 January 2011 See abstract.	1-7
A	WO 2011-119115 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH et al.) 29 September 2011 See abstract.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 JULY 2013 (19.07.2013)

Date of mailing of the international search report

22 JULY 2013 (22.07.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/004043

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	FANATA, Wahyu Indra Duwi et al., "N-glycan maturation is crucial for cytokinin-mediated development and cellulose synthesis in <i>Oryza sativa</i> ", The Plant Journal, March 2013, vol. 73. no. 6, pp. 966-979. See pages 967-969 and 976-977; abstract.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/004043

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2011-0008837 A1	13/01/2011	AU 2008-261527 A1	18/12/2008
		AU 2008-261527 A8	21/01/2010
		CA 2700180 A1	18/12/2008
		CA 2700180 C	29/01/2013
		CA 2795379 A1	18/12/2008
		CN 101918559 A	15/12/2010
		EP 2155880 A1	24/02/2010
		EP 2155880 A4	04/08/2010
		IL 202568 D0	01/08/2011
		JP 2010-531136 A	24/09/2010
		KR 10-2010-0037602 A	09/04/2010
		MA 31516 B1	01/07/2010
		MX 2009013665 A	02/06/2010
		NZ 581944 A	30/03/2012
		RU 2010101024 A	20/07/2011
		SG 185249 A1	29/11/2012
		WO 2008-151440 A1	18/12/2008
		WO 2008-151440 A4	26/02/2009
		WO 2008-151440 A8	04/03/2010
WO 2011-119115 A1	29/09/2011	SG 184051 A1	30/10/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A01H 5/00(2006.01)i, C12N 15/82(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A01H 5/00; C12P 21/00; C12P 21/04; C12N 5/10; C12N 15/56; C12N 15/82 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈I, N-acetylglucosaminyltransferase I(GnTI), 고-만노오스형N-글라이칸, high-mannose glycan, plant		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	VON SCHAEWEN, A. et al., "Isolation of a mutant Arabidopsis plant that lacks N-Acetyl Glucosaminyl Transferase I and is unable to synthesize Golgi-Modified Complex N-Linked Glycans ", Plant Physiology, August 1993, Vol. 102, pp. 1109-1118. 페이지 1110-1112 ; 요약 참조.	1,3-7
A		2
A	SARIBAS, A. SAMI et al., "Refolding of human β -1-2 GlcNAc transferase (GnT1) and the role of its unpaired Cys 121", Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, Vol. 362, No. 2, pp. 381-386. (13 August 2007) 페이지 382-384 참조.	1-7
A	US 2011-0008837 A1 (D-AOUST, MARC-ANDRE 외 12명) 2011.01.13 초록 참조.	1-7
A	WO 2011-119115 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH 외 2명) 2011.09.29 초록 참조.	1-7
☒ 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 “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 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 07월 19일 (19.07.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 07월 22일 (22.07.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김동석 전화번호 +82-42-481-8647 

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	FANATA, WAHYU INDRA DUWI et al., "N-glycan maturation is crucial for cytokinin-mediated development and cellulose synthesis in <i>Oryza sativa</i> ", <i>The Plant Journal</i> , March 2013, Vol. 73, No. 6, pp. 966-979. 페이지 967-969 및 976-977; 요약 참조.	1-7

제1기제란 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 또는 추후 제출된 서열목록

☐ 서면

☒ 전자적 형태

b. 제출시기

☒ 출원시 국제출원에 포함

☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

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

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2011-0008837 A1	2011/01/13	AU 2008-261527 A1 AU 2008-261527 A8 CA 2700180 A1 CA 2700180 C CA 2795379 A1 CN 101918559 A EP 2155880 A1 EP 2155880 A4 IL 202568 D0 JP 2010-531136 A KR 10-2010-0037602 A MA 31516 B1 MX 2009013665 A NZ 581944 A RU 2010101024 A SG 185249 A1 WO 2008-151440 A1 WO 2008-151440 A4 WO 2008-151440 A8	2008/12/18 2010/01/21 2008/12/18 2013/01/29 2008/12/18 2010/12/15 2010/02/24 2010/08/04 2011/08/01 2010/09/24 2010/04/09 2010/07/01 2010/06/02 2012/03/30 2011/07/20 2012/11/29 2008/12/18 2009/02/26 2010/03/04
WO 2011-119115 A1	2011/09/29	SG 184051 A1	2012/10/30