



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월02일  
(11) 등록번호 10-2369344  
(24) 등록일자 2022년02월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/82 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/8247 (2013.01)  
C12N 9/1029 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-0007302  
(22) 출원일자 2020년01월20일  
심사청구일자 2020년01월20일  
(65) 공개번호 10-2021-0029065  
(43) 공개일자 2021년03월15일  
(30) 우선권주장  
1020190109991 2019년09월05일 대한민국(KR)  
(56) 선행기술조사문헌  
EP02546262 A1\*  
GenBank Accession Number MG827061 AJ431183  
(2002.02.19.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
세종대학교산학협력단  
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)  
(72) 발명자  
김현욱  
전라북도 완주군 이서면 출판로 25, 103동 1804호(혁신도시 에코르 1단지 아파트)  
박민음  
서울특별시 광진구 광나루로16길 6, 603호(화양동)  
김원녕  
서울특별시 광진구 면목로 7(군자동)  
(74) 대리인  
특허법인리채

전체 청구항 수 : 총 8 항

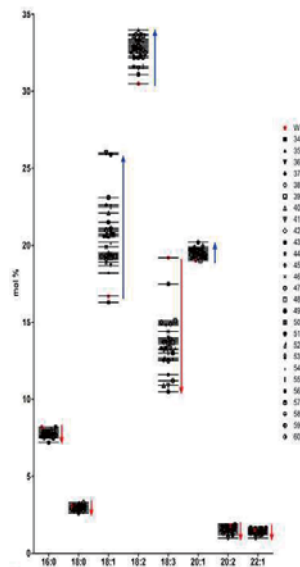
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 불포화지방산 비율이 조절된 종자를 제조하기 위한 조성물 및 이로부터 제조된 종자

(57) 요약

본 발명은 불포화지방산 비율이 조절된 종자를 제조하기 위한 조성물 및 이를 이용한 종자에 관한 것으로, 식물체 전사조절인자인 HAT2를 과발현 또는 억제시켜 식물체의 종자 내 올레산, 리놀레산 또는 리놀렌산의 비율을 조절할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류  
*C12Y 203/01048* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395059730
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명	카멜리나의 식용 적합 지방산조성 변경 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진하는 물질을 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물로서,

상기 조절은 올레산 및 리놀레산의 비율이 증가하고, 리놀렌산의 비율은 감소한 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 종자는 애기장대 또는 유지식물(oil plant)의 종자인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.

#### 청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 유지식물은 카멜리나(camelina), 참깨, 유채, 해바라기, 아주까리, 땅콩, 콩, 코코야자, 기름야자 및 호호바로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 종자는 애기장대 또는 카멜리나의 종자이고, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진하는 물질은 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자가 도입된 벡터인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.

#### 청구항 8

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조 방법으로서,

상기 조절은 올레산 및 리놀레산의 비율이 증가하고, 리놀렌산의 비율은 감소한 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조 방법.

## 청구항 9

삭제

## 청구항 10

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하는 단계;

상기 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및

형질전환 식물체를 선발하는 단계; 를 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 생성용 식물체의 제조방법으로서,

상기 조절은 올레산 및 리놀레산의 비율이 증가하고, 리놀렌산의 비율은 감소한 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 생성용 식물체의 제조방법.

## 청구항 11

삭제

## 청구항 12

삭제

## 청구항 13

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현이 감쇄 또는 상기 유전자가 결실된 종자를 배양하는 단계; 및

상기 종자를 배양하여 얻은 식물 중에 상기 감쇄 또는 결실된 유전자가 호모화된 돌연변이 식물체를 선발하는 단계; 를 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 식물체의 제조방법으로서,

상기 조절은 올레산 및 리놀레산의 비율이 감소하고, 리놀렌산의 비율은 증가한 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 식물체의 제조방법.

## 청구항 14

삭제

## 청구항 15

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 불포화지방산 비율이 조절된 종자를 제조하기 위한 조성물 및 이를 이용한 종자에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0003] 식물체 내의 지방산들은 세포막과 종자 내 저장 오일을 이루는 중요한 구성 성분이다. 식물의 종자 오일에는 포화지방산(saturated fatty acid)과 불포화지방산(unsaturated fatty acid)이 일정 비율로 존재하고 있다. 포화지방산과 불포화지방산은 그 구조와 성질에 따라 산업에서 다양하게 사용되고 있다. 예를 들면 포화지방산인 팔미트산(palmitic acid, 16:0)과 스테아르산(stearic acid, 18:0)은 상온에서 고체이기 때문에 마가린 제조에 사용되며, 단일 불포화지방산인 올레산(oleic acid, 18:1)은 산화에 안정하기 때문에 샐러드용 또는 튀김용으로 사용되기 좋으며 바이오디젤용 지방산으로 유용하다. 다중 불포화 지방산인 리놀레산(linoleic acid, 18:2)과 리놀렌산(linolenic acid, 18:3)은 건강기능 지방산으로 알려져 있다.

[0004] 이에 따라 산업적 활용도를 높이기 위해 선별된 지방산을 갖는 식물 및 식물 오일을 생산하기 위한 연구가 진행되고 있다. 예를 들면, 한국등록특허 0914454호의 들깨 유래 마이크로솜 리놀레산 불포화효소 유전자로 형질전

환된 형질전환 식물체, 및 이 유전자를 이용하여 형질전환 식물체의 종자 오일에서 지방산 조성을 조절하는 방법에 대한 연구가 있다. 그러나, 애기장대(Arabidopsis thaliana) 전사조절인자인 HAT2를 암호화하는 유전자를 식물체에 도입하여 식물 종자 내의 특정 지방산의 함량을 증가시키는 연구는 밝혀진 바가 없다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 0914454호(2009.08.21.)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 본 발명은 불포화지방산 비율이 조절된 종자 및 이의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명은 불포화지방산 비율이 조절된 종자 생성용 식물체 및 이의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0011] 1. HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진하는 물질을 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.
- [0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 불포화지방산은 올레산, 리놀레산 또는 리놀렌산인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.
- [0013] 3. 위 1에 있어서, 종자 내 전체 지방산 중 올레산 및 리놀레산의 함량은 증가시키고, 리놀렌산의 함량은 감소시키는, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.
- [0014] 4. 위 1에 있어서, 상기 종자는 애기장대 또는 유지식물(oil plant)의 종자인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.
- [0015] 5. 위 4에 있어서, 상기 유지식물은 카멜리나(camelina), 참깨, 유채, 해바라기, 아주까리, 땅콩, 콩, 코코야자, 기름야자 및 호호바로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.
- [0016] 6. 위 1에 있어서, 상기 종자는 애기장대 또는 카멜리나의 종자이고, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.
- [0017] 7. 위 1에 있어서, 상기 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진하는 물질은 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자가 도입된 벡터인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.
- [0018] 8. HAT2 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조 방법.
- [0019] 9. 위 8에 있어서, 종자 내 전체 지방산 중 올레산 및 리놀레산의 함량은 증가시키고, 리놀렌산의 함량은 감소시키는 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조방법.
- [0020] 10. HAT2 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및 형질전환 식물체를 선발하는 단계; 를 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 생성용 식물체의 제조방법.
- [0021] 11. 위 10에 따른 방법으로 제조된 불포화 지방산 비율이 조절된 종자 생성용 식물체.
- [0022] 12. 위 11에 따른 식물체가 생성한 불포화지방산 비율이 조절된 종자.
- [0023] 13. HAT2 단백질을 암호화하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 종자를 배양하는 단계; 및 상기 종자를 배양하여 얻은 식물 중에 상기 감쇄 또는 결실된 유전자가 호모화된 돌연변이 식물체를 선발하는 단계; 를 포함하는 불포화

지방산 비율이 조절된 종자 제조용 식물체의 제조방법.

[0024] 14. 청구항 13에 따른 방법으로 제조된 불포화지방산 비율이 조절된 종자 생성용 식물체.

[0025] 15. 청구항 14에 따른 식물체가 생성한 불포화 지방산 비율이 조절된 종자.

### 발명의 효과

[0027] 본 발명은 불포화지방산 비율이 조절된 종자를 제조하기 위한 조성물 및 이를 이용한 종자에 관한 것으로, 애기장대 전사조절인자인 HAT2를 과발현 또는 억제시켜 식물체의 종자 내 올레산, 리놀레산 또는 리놀렌산의 비율을 조절할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0029] 도 1a는 HAT2 단백질의 아미노산 서열을 분석하여 구조를 확인한 도이고, 도 1b는 HAT2 단백질의 핵 내 위치를 확인한 도이다.

도 2a는 HAT2 유전자의 qRT-PCR에 의한 애기장대 조직별 발현을 분석한 도이고, 도 2b는 종자 발달단계별 발현을 분석한 도이며, 도 2c는 HAT2의 프로모터 조절 하에 GUS유전자를 발현시킨 애기장대 형질전환체의 조직별 GUS 리포터 유전자 발현을 분석한 도이다.

도 3a는 hat2-1 돌연변이체 및 hat2-2 돌연변이체의 유전자 구조를 나타낸 도이고, 도 3b는 돌연변이체의 유전형을 분석한 도이며, 도 3c는 야생형과 돌연변이체에서 HAT2 유전자의 발현을 분석한 도이다.

도 4는 야생형 및 돌연변이체의 애기장대 종자의 지방산 조성을 비교 분석한 도이다.

도 5는 야생형과 HAT2 유전자 과발현 애기장대 형질전환체간의 종자 지방산 조성을 비교 분석한 도이다.

도 6은 애기장대 HAT2 유전자가 도입된 카멜리나 형질전환체의 제작도이다.

도 7은 HAT2 유전자 과발현 카멜리나 형질전환체의 종자에서 애기장대 HAT2의 발현을 분석한 것이다.

도 8은 야생형과 HAT2 유전자 과발현 카멜리나 형질전환체간의 종자 지방산 조성을 비교 분석한 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0032] 본 발명은 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진하는 물질을 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물을 제공한다.

[0033] 상기 HAT2 단백질은 모든 식물에서 발현되는 식물체의 전사조절인자로서, HD-Zip II 아과 (Homeodomain-leucine zipper II subfamily)에 속하는 HAT2 유전자에 의해 암호화되는 전사조절인자이다.

[0034] 본 발명에서 유전자의 발현 촉진은 유전자에 직접 또는 간접적으로 작용하여 유전자의 발현을 개선, 유도, 자극, 증가시키는 것을 의미한다.

[0035] 상기 물질은 HAT2 유전자의 발현을 촉진할 수 있는 모든 물질로서 물질의 타입이나 종류에 국한되지 않으며, 예를 들면 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 고분자 화합물, 천연물, 또는 화학적으로 합성된 화합물 등이 모두 사용될 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 물질은 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터일 수 있고, 필요에 따라 상기 벡터는 상기 유전자를 과발현하는 프로모터가 삽입된 것일 수 있다.

[0037] 상기 재조합 벡터는 식물 형질전환용인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. '재조합 벡터'는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 상기 적정 핵산 서열은 프로모터가 될 수 있으며, 그 외에도 추가적으로 인핸서, 전사종결자 및 폴리아데닐레이션 신호 등을 더 포함할 수 있다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 전사종결자 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0038] 상기 재조합 벡터는 상기 유전자의 염기서열이 삽입되어 식물 세포로 직접 도입될 수 있거나, 식물에 감염을 유발하는 미생물 내부로 도입될 수 있는 식물 발현 벡터일 수 있다. 본 발명의 벡터 시스템은 당업계의 공지된 다

양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 또는 진핵세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSK349, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예:  $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ 4B,  $\lambda$ -Charon,  $\lambda$   $\Delta$ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0039] 예를 들어 재조합 벡터는 아그로박테리움 투머 파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 이러한 조작에 사용될 수 있는 아그로박테리움의 스트레인(strain)은 다수가 있으며 본 업계에 공지되어있다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용될 수 있다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용될 수 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 상기 벡터는 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리하게 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 내성 유전자를 포함할 수 있다. 예를 들어 바스타 제초제, 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0041] 상기 프로모터는 35S CaMV, Glycinin, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. '프로모터'는 구조 유전자로부터 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 의미한다.

[0043] HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진하는 물질이 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자가 담지된 재조합 벡터인 경우의 구체적인 예를 들자면, 상기 유전자는 대상 식물 종의 유전자를 사용할 수 있다. 예를 들면 대상 식물이 애기장대인 경우, 애기장대 HAT2 단백질을 암호화하는 서열번호 1의 서열로 이루어진 유전자를 사용할 수 있다. 각 식물 종의 HAT2 유전자 서열은 NCBI genbank 등에 공지된 서열을 활용할 수 있다. 또한, 상기 유전자는 대상 식물 종과 다른 식물 종의 HAT2 유전자를 사용할 수 있다. 예를 들면, 대상 식물이 카멜리나인 경우, 애기장대 HAT2 단백질을 암호화하는 서열번호 1의 서열로 이루어진 유전자를 사용할 수 있다.

[0044] 또한, 상기 염기서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.

[0045] '서열 상동성의 %'는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제를 포함할 수 있다.

[0046] 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 HAT 유전자에 의해 암호화되는 HAT2 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 HAT2 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. '기능적 동등물'이란 아미노산 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. 본 발명에 있어서 '실질적으로 동질의 생리활성'이란 식물체의 종자 내 불포화지방산 비율을 조절하는 활성을 의미한다.

[0047] 식물에 존재하는 HAT2 유전자의 염기서열은 식물마다 차이가 있으나, 각 식물의 HAT2 유전자를 과발현 또는 억제시키면 식물체의 종자 내 불포화지방산 비율을 조절할 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 불포화지방산은 올레산, 리놀레산 또는 리놀렌산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 올레산은 18:1(CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>COOH)의 불포화 지방산이며, 올리브유, 동백유 등의 유지류의 주성분으로, 화장품, 의약품 첨가제 및 섬유 유연제 등으로 쓰이고 스테아르산을 대신하여 골제(滑劑)로 사용되는 경우가 있



다. 리놀레산은 18:2 ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ )의 불포화 지방산이며, 대두유, 옥수수유, 면실유 등 반건성유의 주성분이며, 동물에서 합성이 불가능한 필수 지방산이다. 리놀렌산은 18:3 ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ )의 불포화 지방산이며, 아마씨유(flexed-seed oil), 호두기름, 달맞이꽃, 블랙커런트씨유, 보리지 오일(borage oil) 또는 들깨와 같은 식물성 유지 등에 함유되어 있고, 혈중 콜레스테롤의 수치를 낮추는데 효과적이며, 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생체 내 합성에 꼭 필요한 필수 지방산이고, 철, 비누 등의 제조에도 사용된다.

- [0049] 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 조성물은 종자 내 전체 지방산 중 올레산 및 리놀레산의 함량은 증가시키고, 리놀렌산의 함량은 감소시킬 수 있다.
- [0050] 본 발명은 종자 1개 당 총 지방산의 함량에는 유의적 변화가 없이 종자 내 전체 지방산 중 올레산, 리놀레산 또는 리놀렌산을 포함한 특정 지방산의 비율만을 조절할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진하는 물질을 포함하고, 상기 물질은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 상기 유전자는 애기장대 유래의 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 각 식물 종의 HAT2 유전자일 수 있다. 각 식물 종의 HAT2 유전자 서열은 NCBI genbank 등에 공지된 서열을 활용할 수 있다.
- [0053] 또한 상기 조성물은 불포화지방산 비율이 조절된 종자의 제조에 이용할 수 있는 임의의 물질을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 조성물은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 미생물을 포함할 수 있다. 상기 미생물은 식물에 감염을 유발하는 것이라면 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 일 실시예에서 아그로박테리움 투머파시엔스를 이용할 수 있다. 본 발명의 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 방법은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있으며, 예를 들면 입자 충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation), 형질감염법(transfection), 리튬아세테이트법(lithium acetate method), 열충격법(heat shock) 및 냉동-해빙법(freezethaw method) 등이 있다.
- [0056] 본 발명에 따른 불포화지방산 비율이 조절된 종자는 애기장대 또는 유지식물의 종자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 유지식물은 씨나 열매에서 기름을 얻는 식물일 수 있으며, 예를 들면 카멜리나, 참깨, 유채, 해바라기, 아주까리, 땅콩, 콩, 코코야자, 기름야자 및 호호바로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0057] 본 발명에 따른 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료작물류일 수 있다.
- [0059] 본 발명은 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조 방법을 제공한다.
- [0060] HAT2 단백질을 암호화하는 유전자로는 대상 식물 종의 유전자를 사용할 수 있다. 예를 들면 대상 식물이 애기장대인 경우, 애기장대 HAT2 단백질을 암호화하는 서열번호 1의 서열로 이루어진 유전자를 사용할 수 있다. 각 식물 종의 HAT2 유전자 서열은 NCBI genbank 등에 공지된 서열을 활용할 수 있다. 또한, 상기 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자는 대상 식물 종과 다른 식물 종의 유전자를 사용할 수 있다. 예를 들면, 대상 식물이 카멜리나인 경우, 애기장대 HAT2 단백질을 암호화하는 서열번호 1의 서열로 이루어진 유전자를 사용할 수 있다.
- [0061] 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 방법은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 본 발명의 방법은 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, 아그로박테리움-매개 형질 감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 다양한 공지의 방법을 이용할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 방법에 의해 제조된 식물체는 불포화지방산 비율이 조절된 종자를 생성할 수 있다. 상기 종자는 종자



내 전체 지방산 중 올레산 및 리놀레산의 함량을 증가되고, 리놀렌산의 함량을 감소된 것이다.

- [0063] 본 발명은 종자 1개 당 총 지방산의 함량에는 유의적 변화가 없이 종자 내 전체 지방산 중 올레산, 리놀레산 또는 리놀렌산을 포함한 특정 지방산의 비율만을 조절할 수 있다.
- [0065] 본 발명은 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및 형질전환 식물체를 선발하는 단계; 를 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 생성용 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0066] HAT2 단백질을 암호화하는 유전자로는 대상 식물 종의 유전자를 사용할 수 있다. 예를 들면 대상 식물이 애기장대인 경우, 애기장대 HAT2 단백질을 암호화하는 서열번호 1의 서열로 이루어진 유전자를 사용할 수 있다. 각 식물 종의 HAT2 유전자 서열은 NCBI genbank 등에 공지된 서열을 활용할 수 있다.
- [0067] 상기 재조합 벡터를 전술한 범위 내의 것일 수 있으며, 전술한 범위 내의 방법으로 제작될 수 있다.
- [0068] 식물체를 형질전환하는 방법은 전술한 범위 내의 방법을 이용할 수 있다.
- [0069] 형질전환 식물체의 선발은 형질전환 배양물을 선택표지에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물체는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 상기 선택표지는 전술한 범위내의 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0070] 상기 형질전환 식물체는 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자가 과발현된 것이다.
- [0071] 본 발명의 일 실시예에서 상기 형질전환 식물체가 애기장대인 경우 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자가 과발현된 것일 수 있다. 상기 형질전환 식물체는 불포화지방산의 비율이 조절된 종자를 생성할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 종자는 올레산 및 리놀레산의 함량이 증가되고, 리놀렌산의 함량이 감소된 것이다.
- [0072] 이때 종자 1개 당 총 지방산의 함량에는 유의적 변화가 없이 종자 내 전체 지방산 중 올레산, 리놀레산 또는 리놀렌산을 포함한 특정 지방산의 비율만을 조절할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 상기 방법은 전술한 범위 외에 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.
- [0075] 본 발명은 HAT2 단백질을 암호화하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 종자를 배양하는 단계; 및 상기 종자를 배양하여 얻은 식물 중에 상기 감쇄 또는 결실된 유전자가 호모화된 돌연변이 식물체를 선발하는 단계; 를 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0076] 본 발명의 일 실시예에서 상기 형질전환 식물체가 애기장대인 경우 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다. 이는 해당 유전자에 T-DNA가 삽입됨으로써 유전자의 기능이 상실된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0077] 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 유전자가 감쇄 또는 결실된 돌연변이 식물체는 리놀렌산 함량이 증가되고, 올레산 및 리놀레산 함량이 감소된 종자를 생성할 수 있다.
- [0078] 이때 종자 1개 당 총 지방산의 함량에는 유의적 변화가 없이 종자 내 전체 지방산 중 올레산, 리놀레산 또는 리놀렌산을 포함한 특정 지방산의 비율만을 조절할 수 있다.
- [0079] 본 발명의 상기 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.
- [0081] 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 제조된 식물체를 제공한다. 상기 식물체는 불포화지방산 비율이 조절된 종자를 생성할 수 있다.
- [0082] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법에 따른 식물체가 생성하는 종자를 제공한다. 상기 종자는 불포화지방산 비율이 조절된 것이다. 본 발명의 일 실시예에 따라 HAT2 유전자가 과발현된 형질전환 식물체가 생성한 종자는 올레산 및 리놀레산 함량이 증가하고, 리놀렌산 함량이 감소된 것이다. 본 발명의 다른 실시예에 따라 HAT2 유전자가 감쇄 또는 결실된 돌연변이 식물체가 생성한 종자는 리놀렌산의 함량이 증가하고, 올레산 및 리놀레산 함량이 감소된 것이다.
- [0084] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0086] **실시예**

- [0087] **1. HAT2 단백질의 구조와 세포소기관의 위치 분석**
- [0088] HAT2 유전자가 암호화하고 있는 단백질의 전자조절인자 기능 및 위치를 확인하기 위하여 HAT2의 유전자 (At5g47370) 염기서열에서 번역된 HAT2 단백질의 아미노산 서열을 분석하였다.
- [0089] 그 결과 HAT2는 10-14 아미노산 서열에 전사조절인자 중 억제자 역할에 관여하는 EAR motif를 가지고 있었다. 127-186 아미노산서열은 homeobox 도메인으로 DNA와 결합하는데 관여 할 것으로 추정되었다. 194-215 아미노산은 leucine zipper 도메인으로 homo또는 hetero-dimer 형성에 관여하는 영역으로 추정되었다. HAT2는 상기에서 언급한 3개의 전사조절인자역할을 하는 도메인이 발견되었다 (도 1A). HAT2에 GFP유전자를 결합시킨 HAT2-GFP fusion 단백질을 CaMV 35S 프로모터 조절하에 애기장대 원형질체에 형질전환하여 발현시킨 결과 세포의 핵에서 HAT2:GFP 단백질이 녹색형광을 띄며 검출되었고 핵으로 위치하는 대조 RFP 단백질의 적색형광과 HAT2:GFP 단백질이 핵에서 서로 겹치게 발현되어 노란색을 보였다 (도 1B). 이 결과를 통해 HAT2 단백질이 전사조절인자이며 핵에 위치함을 알 수 있었다.
- [0091] **2. HAT2 유전자의 발현 분석**
- [0092] HAT2의 유전자 발현을 애기장대 식물의 다양한 조직에서 qRT-PCR 방법으로 분석 하였다. 애기장대의 로셋잎 (RL: rosette leaf), 카울린 잎 (CL: cauline leaf), 줄기(St:stem), 개화된 꽃 (OF:open flower), 미개화된꽃 (UF:unopened flower) 종자꼬투리 (Sq:silique), 뿌리 (R:root), 유묘 (Sd:seedling)으로 부터 total RNA를 분리한 후 HAT2의 전사체의 발현을 분석하였다.
- [0093] 그 결과 모든 조직에서 HAT2 유전자의 발현을 확인할 수 있었다 (도 2A). HAT2는 종자가 함유된 silique에서도 발현이 되기 때문에 종자발달단계에 따라 silique를 8단계로 나누어 HAT2의 발현을 분석한 결과 종자 초기 발달부터 발현을 보였으며 그 이후 발현이 감소 하다가 S4 단계부터 발현이 계속 증가하였고 종자 발달의 후기인 S8 단계에서 발현이 감소하였다(도 2B).
- [0094] HAT2의 프로모터 조절하에 GUS report유전자를 발현시킨 애기장대 형질전환체를 이용하여 HAT2의 발현을 분석한 결과 HAT2는 유묘에서 모든 조직에 발현되었고 종자와 종자안의 배에 강하게 발현됨을 확인하였다(도 2C). a, c, e, g, i, k는 대조구 식물이고, b, d, f, h, j, l은 형질전환체이다. 이 결과를 통해 HAT2 단백질은 모든 조직에서 발현되지만 종자에서도 강하게 발현되기 때문에 종자 형성에 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0096] **3. HAT2 기능 상실 돌연변이체 제작 및 검정**
- [0097] 3-1. HAT2 기능 상실 돌연변이체 제작 및 선발
- [0098] HAT2 유전자에 T-DNA가 삽입된 종자 hat2-1 (sail\_87\_E06)과 hat2-2 (salk\_055288C) 을 ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)로 부터 구입한 뒤 종자를 배양하여 얻은 애기장대 중 T-DNA 단편이 HAT2 유전자에 삽입되어 유전자의 기능이 완전히 상실된 hat2 돌연변이 식물체를 얻기 위해 hat2-1 경우 T-DNA 염기서열 특이 프라이머인 LB1 (서열번호 3)과 Hat2 유전자의 T-DNA 삽입위치를 가운데 두고 왼쪽에서 hat2-1LP 프라이머 (서열번호 4), 오른쪽 위치에서 hat2-1RP 프라이머 (서열번호 5)를 제작하였고, hat2-2 경우 T-DNA 염기서열 특이 프라이머인 LBb1.3 (서열번호 6)와 HAT2 유전자의 T-DNA 삽입위치를 가운데 두고 왼쪽에서 hat2-2 LP 프라이머(서열번호 7), 오른쪽 위치에서 hat2-2 RP 프라이머 (서열번호 8)를 제작하여 각각의 프라이머 세트를 이용하여 식물체 게놈 DNA를 대상으로 PCR 하여 호모화된 hat2-1과 hat2-2의 독립적인 돌연변이 식물체를 선발 하였다 (도 3A, 3B)
- [0099] 호모화된 hat2-1과 hat2-2 돌연변이 식물체의 종자에서 HAT2 유전자의 발현이 검출되는지 확인하고자 유전자의 시작부분인 N-terminal (N-ter) 부분 프라이머 HAT2F (서열번호 9)과 C-terminal (C-ter) 부분 HAT2-R프라이머 (서열번호 10)를 제작하고 이 두 프라이머 세트를 이용하여 RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 방법으로 유전자의 발현을 분석하였다.
- [0100] 그 결과 대조구 야생형(WT) 식물체 종자에서는 HAT2 유전자가 발현 되었으나 호모화된 hat2-1과 hat2-2 돌연변이체 식물의 종자에서는 HAT2 유전자가 발현 되지 않았다 (도 3C).
- [0102] 3-2. HAT2 기능 상실 돌연변이체의 종자 내 지방산 분석
- [0103] 상기 실시예 3-1에서 선발한 HAT2 호모 돌연변이체인 hat2-1과 hat2-2 식물체와 대조구 야생형(WT) 식물체로부터 수확한 종자의 지방산을 가스크로마토그래프 (Gas Chromatography:GC)분석 방법을 이용하여 종자 지방산 조성을

분석 하였다.

[0104] 그 결과, hat2-1과 hat2-2 돌연변이체 종자 지방산 조성을 야생형과 비교한 결과 조성 비율에 차이가 관찰 되었다. hat2-1과 hat2-2 돌연변이체 종자에서는 야생형에 비해 올레산(18:1)과 리놀레산(18:2) 지방산 비율이 약 1.2%와 1.7% 정도 약간 통계상 유의하게 감소하였다. 이에 반해 팔미트산(16:0), 스테아르산(18:0), 리놀렌산(18:3), 에이코세닉산(20:1) 지방산들은 유의수준으로 증가 하였다 (도 4).

#### [0106] 4. HAT2 과발현 형질전환체 제작 및 검정

##### [0107] 4-1. HAT2 과발현 형질전환체 제작 및 선발

[0108] HAT2 유전자를 식물에서 과발현 시킬 수 있는 식물형질전환 벡터를 제작하기 위해 애기장대 종자로부터 분리한 RNA로 부터 HAT2 유전자를 포함하는 HAT2\_F (서열번호 11)과 HAT2\_R (서열번호 12) 프라이머를 이용하여 RT-PCR 방법으로 HAT2 cDNA를 증폭하였다. 증폭한 cDNA를 pCR8 벡터에 클로닝 하여 pCR8-HAT2 엔트리 벡터를 제작 하였다. 제작한 pCR8-HAT2 엔트리 벡터 및 35S CaMV 프로모터를 함유하고 있는 식물발현벡터인 pEarleyGate101 (11.7kb)와 LR clonase 반응을 하여, 35S CaMV 프로모터 조절하에 HAT2 유전자가 과발현 되는 식물 재조합 발현 벡터 OX-HAT2 벡터를 제작하였다. 제작된 OX-HAT2 벡터를 아그로박테리움 GV3101 에 형질전환한 후, 아그로박테리움을 애기장대 식물 형질전환에 사용하였다. 그 후 OX-HAT2 발현 벡터가 식물체 게놈에 삽입되어 제초제 (BASTA)에 저항성을 보이는 형질전환된 T1 애기장대 식물체 27개체를 선발하였다.

##### [0110] 4-2. HAT2 과발현 형질전환체의 종자 내 지방산 분석

[0111] 상기 실시예 4-1에서 선발한 27개체의 T1 형질전환 식물체로부터 얻은 T2 종자의 지방산 조성을 분석하기 위하여 가스크로마토그래프(GC) 분석을 수행하였다.

[0112] 그 결과, 각각의 27개체의 OX-HAT2 형질전환체 종자 지방산은 비 형질전환체인 대조구 야생형(WT)의 종자 지방산의 조성에서 큰 차이를 보였다. 야생형 WT 종자에 비해 OX-HAT에서는 올레산(18:1)과 리놀레산(18:2)가 크게 증가 하였다. 또한 20:1 역시 증가하였다. 올레산(18:1) 경우 WT은 16.7%이나 OX-HAT2는 최대 26.0%로 9.3% 더 옥 증진되었다. 리놀레산(18:2) 경우는 WT은 30.5% 이나 OX-HAT2는 최대 34%로 3.5% 더욱 증진되었다. 이와 반대로 팔미트산(16:0), 스테아르산(18:0)과 리놀렌산(18:3) 지방산의 비율은 WT 보다 감소하였다. 그 중 리놀렌산(18:3) 경우 WT 은 19.2%이나 OX-HAT2는 최대 10.5%로 8.7% 더욱 감소하였다 (도 5).

#### [0114] 5. 애기장대 HAT2 발현을 유도하는 재조합 벡터로 형질전환된 카멜리나 식물체 분석

[0115] Glycinin 프로모터 조절 하에 애기장대 HAT2 (AtHAT2)를 과발현시킬 수 있는 벡터를 제작하였다. 벡터 제작 과정은 애기장대의 발달 종자에서 분리한 total RNA로부터 합성한 cDNA를 사용하여 PCR 방법으로 AtHAT2 cDNA 유전자를 증폭시키고 pEASY-Blunt3 (pBlunt3) 벡터에 서브클로닝 하였다. 이후 *EcoRI* 제한효소를 이용하여 pBlunt3 벡터에서 AtHAT2 cDNA를 잘라낸 후 종자특이적인 Glycinin 프로모터를 가진 pBinGlyRed3 (pBGR3) 벡터의 *EcoRI* 자리에 AtHAT2 cDNA 유전자를 클로닝하였다. 이같이 제작한 pBGR3\_HAT2 벡터를 아그로박테리움 GV3101 에 형질전환하여 카멜리나 식물에 floral dipping 방법으로 형질전환하였다(도 6). 종자특이 Glycinin 프로모터 조절하에 AtHAT2를 클로닝한 발현 벡터 (pBGR3\_AtHAT2)가 카멜리나의 유전체에 삽입되어 종자에서 DsRed3에 의해 형광을 나타내는 T1 식물체 종자를 녹색광 조사하에 적색 필터를 통해 육안으로 15개 종자를 선별하였다. 선별된 15개의 종자를 발아시켜 카멜리나 형질전환체 15개체를 얻었으며 AtHAT2가 형질전환된 카멜리나 식물체를 선별하기 위해 게놈 DNA PCR과 RT-PCR을 시행하였다. 카멜리나 잎에서 추출한 DNA를 pBinGlyRed3 벡터에 존재하는 Glycinin 프로모터에 결합하는 프라이머(서열번호 13)와 AtHAT2의 C-terminal 부분에 결합하는 프라이머(서열번호 14) 세트를 사용하여 게놈 DNA PCR을 하였다. 그 결과 야생형(WT), Gly\_HAT2-9, Gly\_HAT2-12를 제외한 나머지 카멜리나 개체들에 AtHAT2 유전자가 삽입되었음을 보였다(도 7A).

[0116] 이후 AtHAT2 유전자가 삽입되지 않은 두 개체(Gly\_HAT2-9, Gly\_HAT2-12)를 제외하고 미성숙한 종자에서 total RNA를 추출하여 cDNA로 합성한 후 형질전환된 AtHAT2 유전자의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 카멜리나 유전체에 삽입된 pBGR3\_AtHAT2 벡터로부터 합성되는 AtHAT2의 mRNA상에서 5' UTR 부분 프라이머(서열번호 15)와 C-terminal 부분 프라이머(서열번호 16)를 세트로 PCR을 수행하였다. RT-PCR 실험의 정확성을 위해 대조군 실험으로 카멜리나 ACTIN 유전자의 RT-PCR을 모든 샘플에 수행하였다. 그 결과 AtHAT2는 야생형(WT)에서는 발현되지 않지만 형질전환된 카멜리나의 종자에서 발현되는 것을 확인하였다(도 7B).

#### [0118] 6. HAT2 과발현된 형질전환 카멜리나의 종자 지방산 분석

[0119] T1 형질전환 식물체로부터 얻은 T2종자를 대상으로 가스크로마토 그래피(GC) 분석하였다. 종자의 지방산을 분석

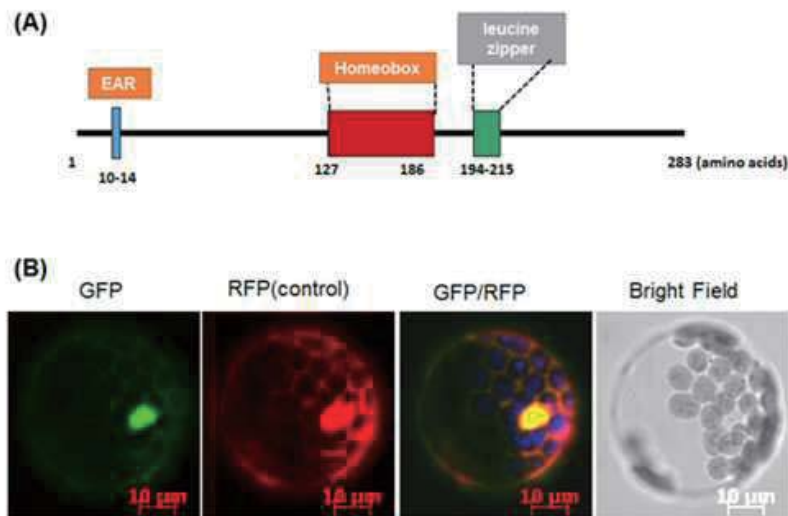
한 결과 13 계통의 각기 다른 Gly\_HAT2 형질전환체 종자 지방산은 비형질 전환체인 대조군 야생형(WT)의 종자 지방산의 조성에서 큰 차이를 보였다. 야생형 WT종자에 비해 Gly\_HAT2에서는 18:1와 18:2가 크게 증가하였다. 18:1의 경우 WT은 14.5%이나 Gly\_HAT2는 최대 21.3%로 함량이 6.8% 증가하였다. 18:2의 경우 WT은 15.1%이나 Gly\_HAT2는 최대 26.1%로 9%가 증가하였다. 이와 반대로 16:0, 18:0, 그리고 18:3 지방산의 비율은 WT 보다 감소하였다. 그 중 18:3의 경우 WT은 38.2%이나 Gly\_HAT2의 경우 최소 29.9%로 8.3% 감소하였다(도 8).

[0120]

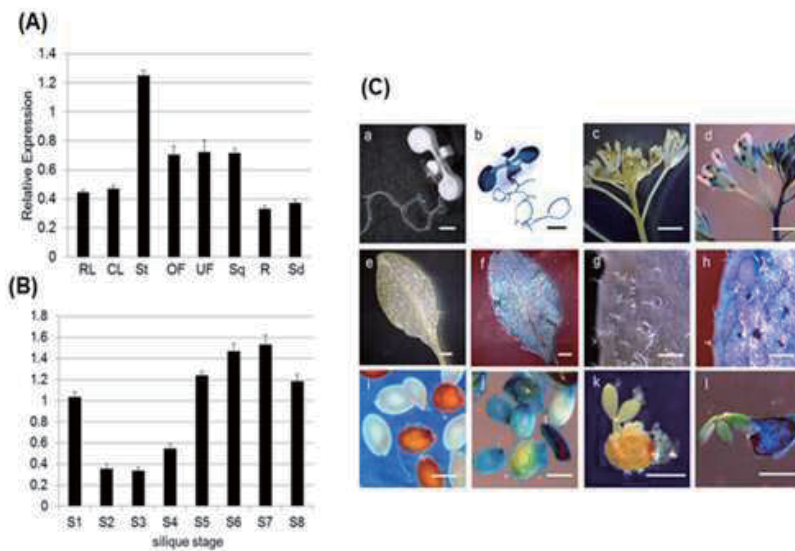
이 결과는 애기장대에서 선행한 OX-HAT2의 지방산 조성 변화와 동일한 경향을 나타내었다. 카멜리나 형질전환 과발현 실험을 통해 애기장대 HAT2 유전자의 과발현은 애기장대뿐만 아니라 다른 식물체에서도 종자 지방산의 조성을 변화시키며 특히 18:1과 18:2 지방산을 증진시키는데 사용할 수 있음을 보여주었다.

## 도면

### 도면1

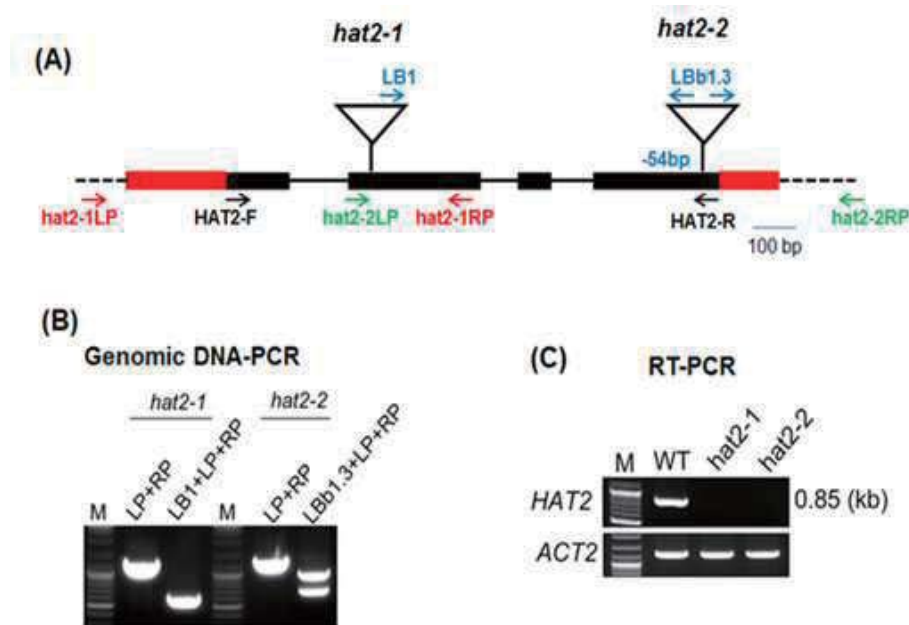


### 도면2

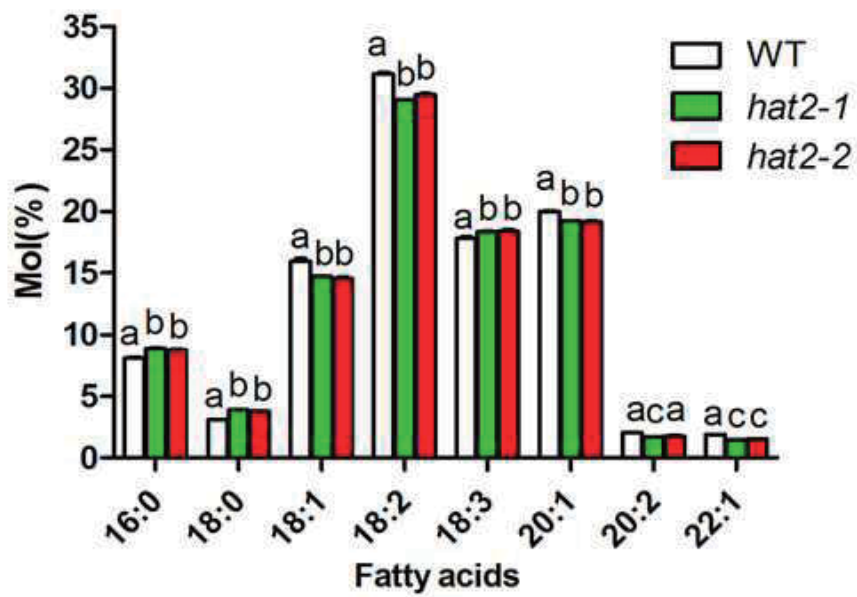




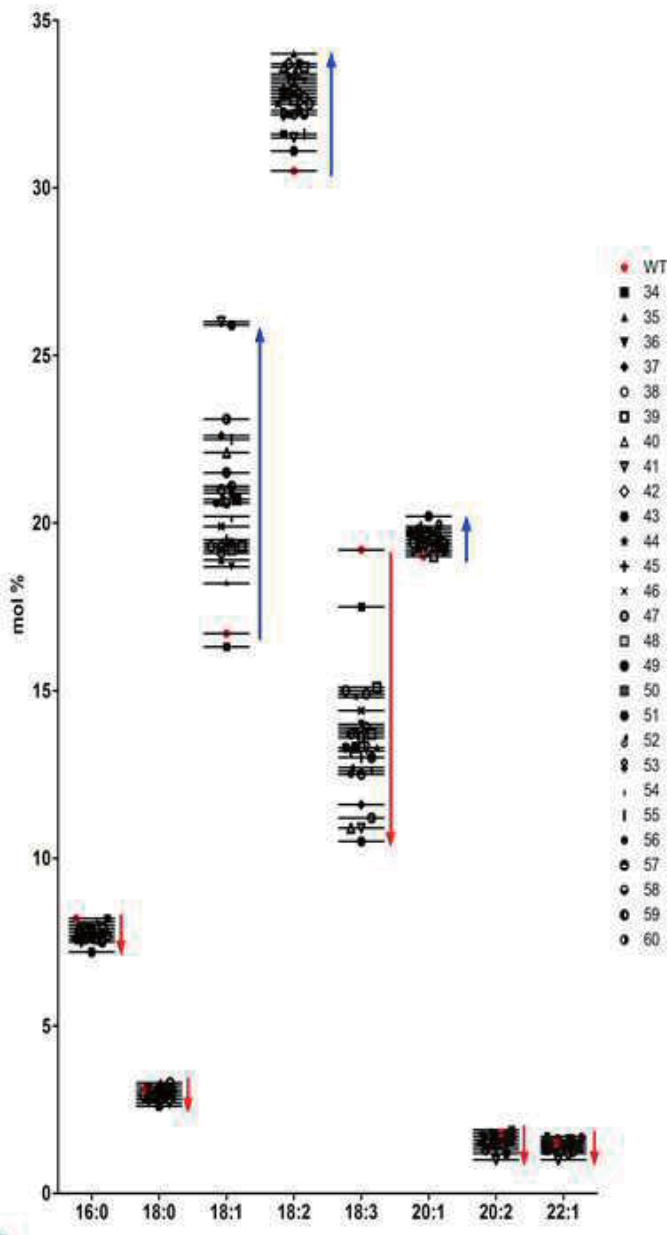
도면3



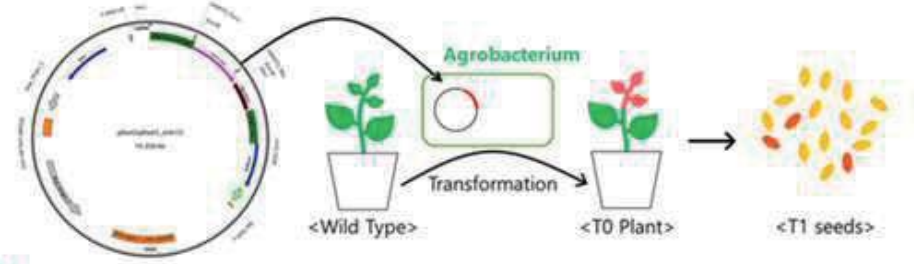
도면4



도면5

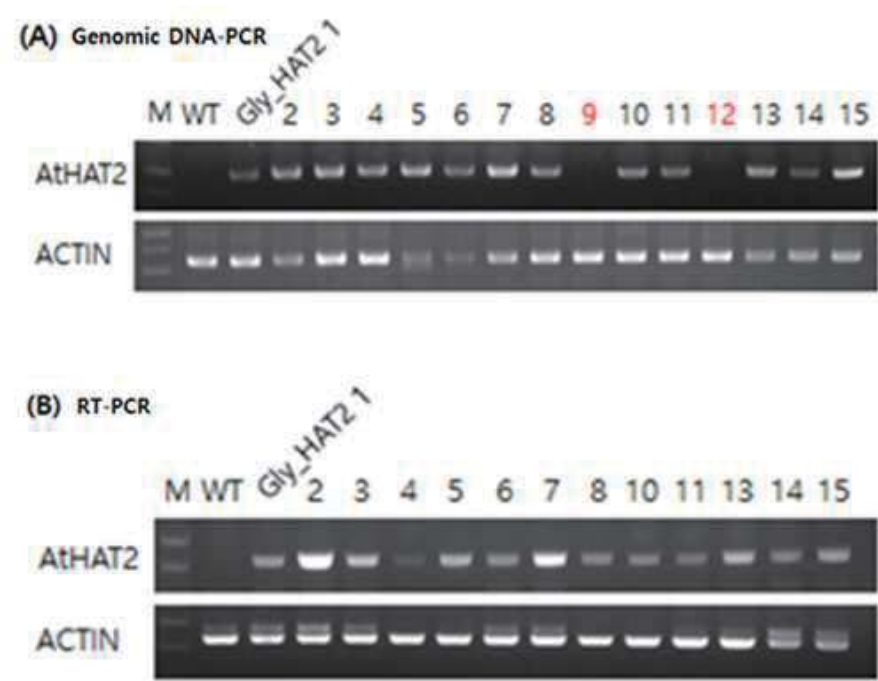


도면6

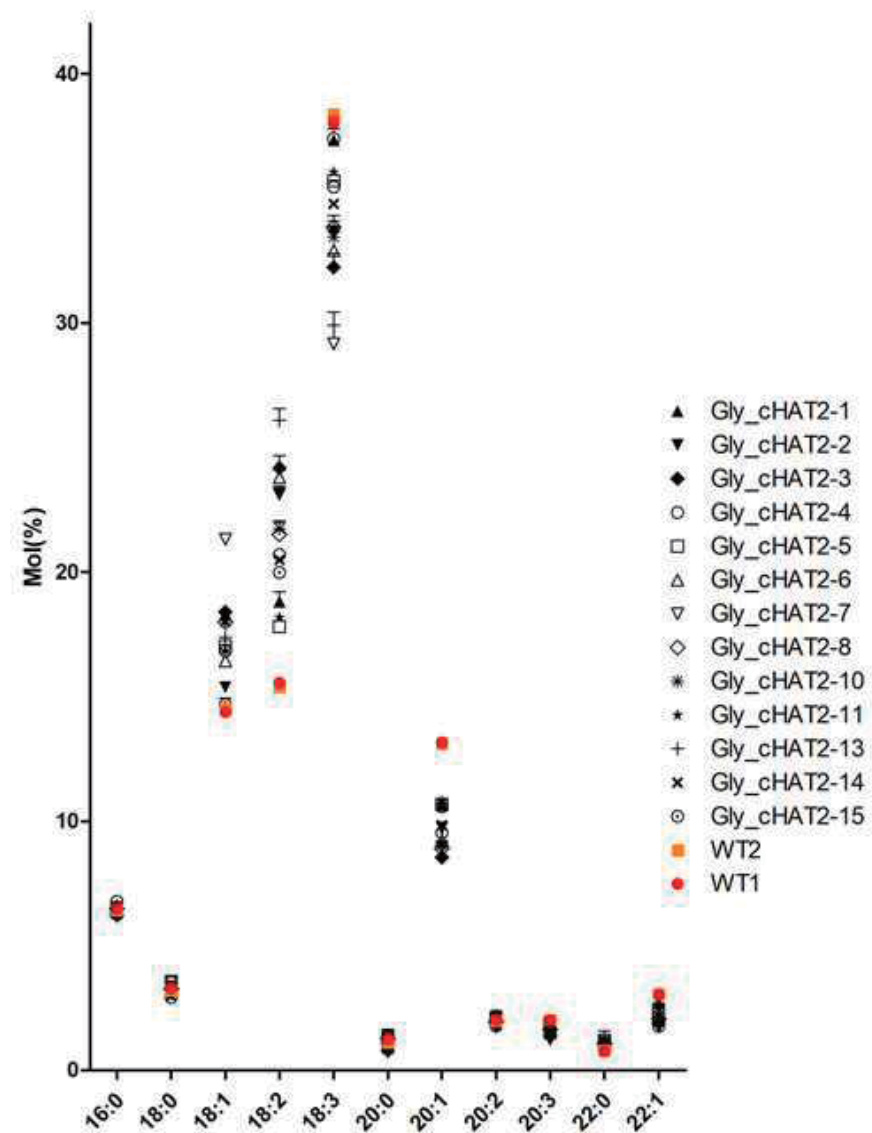




도면7



도면8



## 서열목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> Composition for modifying the ratio of unsaturated fatty acids in seeds and seeds prepared by the same
- <130> 19P12042
- <150> KR 10-2019-0109991
- <151> 2019-09-05
- <160> 16
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 852
- <212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atgatgatgg gcaagaaga tctaggtttg agcctaagct tagggttttc acaaaatcac	60
aatcctcttc agatgaatct gaatcctaac tcttcattat caaacaatct ccagagactc	120
ccatggaacc aaacattcga tctacatca gatcttcgca agatagacgt gaacagtttt	180
ccatcaacgg ttaactgcga ggaagacaca ggagtttcgt caccaaagcag tacgatctca	240
agcaccatta gcgggaagag aagtgcgaga gaaggaatct ccggaaccgg cgttggtctc	300
ggcgacgac acgacgagat cactccggat cgagggtact cacgtggaac ctgagatgaa	360
gaagaagacg ggggcgaaac gtcgaggaag aagctcaggt tatcaaaaga tcagtctgct	420
tttctcgaag agactttcaa agaacacaa acctctcaatc ccaaagagaa gctagctttg	480
gctaagaagc tgaacttgac ggcaagacaa gtggaagtgt ggttccaaaa cagaagagct	540
agaaccaagt taaagcaaac ggaggtagat tgcgaatact tgaaacgggtg cgtagagaag	600
ctaacggaag agaaccggag acttcagaaa gaggtatgg agcttcgaac tctcaagctg	660
tctccacaat tctacgttca gatgactcca ccaactacac tcatcatgtg tccttcgtgc	720
gagcgtgtgg gtggcccatc atcatcgaac catcaccaca atcacaggcc cgtttctatc	780
aatccgtggg ttgcttggtc tggtcagggt gctcatgggc tgaattttga agccttgctg	840
ccacgatcgt ga	852

<210> 2

<211> 283

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Met Met Gly Lys Glu Asp Leu Gly Leu Ser Leu Ser Leu Gly Phe	
1 5 10 15	
Ser Gln Asn His Asn Pro Leu Gln Met Asn Leu Asn Pro Asn Ser Ser	
20 25 30	
Leu Ser Asn Asn Leu Gln Arg Leu Pro Trp Asn Gln Thr Phe Asp Pro	
35 40 45	
Thr Ser Asp Leu Arg Lys Ile Asp Val Asn Ser Phe Pro Ser Thr Val	
50 55 60	
Asn Cys Glu Glu Asp Thr Gly Val Ser Ser Pro Asn Ser Thr Ile Ser	

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

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LB1

<400> 3  
gccttttcag aaatggataa atagccttgc ttcc 34

<210> 4  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> LP primer1  
<400> 4  
tggccatctt attgttttg g 21

<210> 5  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> RP primer1

<400> 5  
ctgttttgga accacacttc c 21

<210> 6  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> LBb1.3  
<400> 6  
attttgccga tttcggaac 19

<210> 7  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> LP Primer2  
<400> 7  
tttccatcaa cggttaactg c 21

<210> 8  
<211> 21  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> RP Primer2  
 <400> 8  
 cggaaaagca attgaagtca g 21  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> N-terminal primer  
 <400> 9  
 atgatgatgg gcaaagaaga 20  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> C-terminal primer  
 <400> 10  
 cgatcgtgga cgcaaggtt 20  
  
 <210> 11  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> F primer  
 <400> 11  
 aacatgatga tgggcaaaga ag 22  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> R primer  
 <400> 12  
 tcacgatcgt ggacgcaagg 20  
 <210> 13  
 <211> 20



<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer 1  
 <400> 13  
 tctccgcttc acaactcaaa 20

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer 2  
 <400> 14  
 tcacgatcgt ggacgcaagg 20

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer 3  
 <400> 15  
 aattcgattg gatcgccctt 20

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer 4  
 <400> 16  
 gattgtggtg atggttcgat 20

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진하는 물질을 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물로서,

상기 조절은 올레인산 및 리놀레산의 비율이 증가하고, 리놀렌산의 비율은 감소한 것인, 불포화지방산 비율이

조절된 종자 제조용 조성물.

**【변경후】**

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 촉진하는 물질을 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물로서,

상기 조절은 올레산 및 리놀레산의 비율이 증가하고, 리놀렌산의 비율은 감소한 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 조성물.

**【식권보정 2】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 청구항 8

**【변경전】**

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조 방법으로서,

상기 조절은 올레인산 및 리놀레산의 비율이 증가하고, 리놀렌산의 비율은 감소한 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조 방법.

**【변경후】**

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조 방법으로서,

상기 조절은 올레산 및 리놀레산의 비율이 증가하고, 리놀렌산의 비율은 감소한 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조 방법.

**【식권보정 3】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 청구항 10

**【변경전】**

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하는 단계;

상기 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및

형질전환 식물체를 선발하는 단계; 를 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 생성용 식물체의 제조방법으로서,

상기 조절은 올레인산 및 리놀레산의 비율이 증가하고, 리놀렌산의 비율은 감소한 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 생성용 식물체의 제조방법.

**【변경후】**

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하는 단계;

상기 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및

형질전환 식물체를 선발하는 단계; 를 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 생성용 식물체의 제조방법으로서,

상기 조절은 올레산 및 리놀레산의 비율이 증가하고, 리놀렌산의 비율은 감소한 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 생성용 식물체의 제조방법.

【직권보정 4】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 13

【변경전】

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현이 감쇄 또는 상기 유전자가 결실된 종자를 배양하는 단계; 및  
상기 종자를 배양하여 얻은 식물 중에 상기 감쇄 또는 결실된 유전자가 호모화된 돌연변이 식물체를 선발하는 단계; 를 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 식물체의 제조방법으로서,

상기 조절은 올레인산 및 리놀레산의 비율이 감소하고, 리놀렌산의 비율은 증가한 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 식물체의 제조방법.

【변경후】

HAT2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현이 감쇄 또는 상기 유전자가 결실된 종자를 배양하는 단계; 및  
상기 종자를 배양하여 얻은 식물 중에 상기 감쇄 또는 결실된 유전자가 호모화된 돌연변이 식물체를 선발하는 단계; 를 포함하는 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 식물체의 제조방법으로서,

상기 조절은 올레산 및 리놀레산의 비율이 감소하고, 리놀렌산의 비율은 증가한 것인, 불포화지방산 비율이 조절된 종자 제조용 식물체의 제조방법.