(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월30일
(11) 등록번호 10-2038481
(24) 등록일자 2019년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8247 (2013.01)
C12N 9/0071 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0055563
(22) 출원일자 2018년05월15일
심사청구일자 2018년05월15일
(56) 선행기술조사문헌
Hyun Uk Kim 등. BMC Genomics. Vol. 16, No. 230, 페이지 1-21 (2015.03.24.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
동아대학교산학협력단
부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
(72) 발명자
정영수
부산광역시 사하구 제석로 171, 202동 1203호 (당리동, 동원2차베네스트아파트)
김현욱
전라북도 완주군 이서면 출판로 25, 103동 1804호 (혁신도시 에코르 1단지 아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

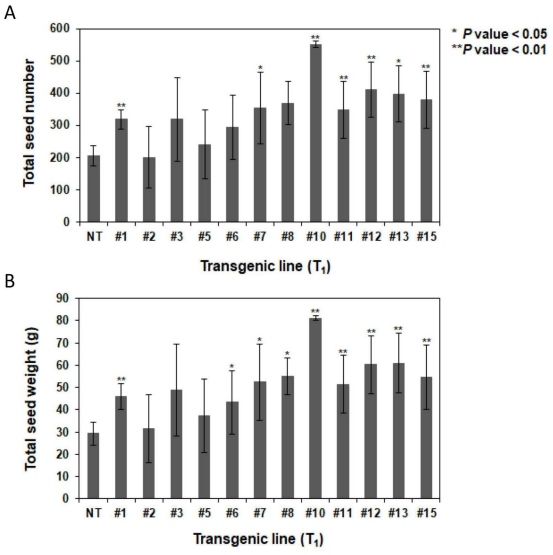
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **레스퀘렐라 유래 PfFAD3-1 유전자로 형질전환된 수확량이 증가된 콩 식물체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 레스퀘렐라 유래 *PfFAD3-1* 유전자를 이용한 수확량이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법 및 그에 따른 식물체에 관한 것으로, 상기 *PfFAD3-1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 콩 식물체에서는 수확량 및 α-리놀렌산 함량이 증가되므로, 농가 소득 증대에 긍정적인 영향을 줄 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
C12Y 114/19 (2013.01)
(72) 발명자
이경렬
전라북도 완주군 이서면 이서로 90-11, 101동 501호

전인화
전라북도 전주시 완산구 세내로 239, 105동 1902호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01366501
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21사업
연구과제명 기능성 콩형질전환체 생산
기 여 율 1/2
주관기관 동아대학교 산학협력단
연구기간 2018.02.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1545017093
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 농생명산업기술개발
연구과제명 돌연변이 유기에 의한 기능성 지방산 생산 들깨 자원 개발
기 여 율 1/2
주관기관 세종대학교 산학협력단
연구기간 2016.09.05 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래의 PfFAD3-1(*Physaria fendleri* fatty acid desaturase 3-1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환되어 종자 생산량이 증가된 콩 식물체.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래의 PfFAD3-1(*Physaria fendleri* fatty acid desaturase 3-1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 콩 식물세포를 형질전환시켜 PfFAD3-1 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 콩 식물체의 종자 생산량을 증가시키는 방법.

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래 PfFAD3-1(*Physaria fendleri* fatty acid desaturase 3-1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 콩 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 콩 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 종자 생산량이 증가된 콩 식물체의 제조 방법.

청구항 4

제3항의 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 종자 생산량이 증가된 콩 식물체.

청구항 5

제4항에 따른 콩 식물체의 형질전환된 종자.

청구항 6

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래 PfFAD3-1(*Physaria fendleri* fatty acid desaturase 3-1) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 콩 식물체의 종자 생산량 증가용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 레스퀘렐라 유래 *PfFAD3-1* 유전자로 형질전환된 수확량이 증가된 콩 식물체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세계 인구의 증가와 농업에 유용한 경작지의 감소는 농업의 효율성을 증가시키는 연구에 박차를 가하게 만들었다. 작물 및 원예농업 향상을 위한 전통적인 방식은 바람직한 특성을 가진 식물체를 동정하기 위하여 선택적 육종기법을 이용하였으나, 상기 선택적 육종기법은 노동집약적이고 양친으로부터 원하는 형질이 항상 전해지는 것이 아닌 이종의 유전적 요소를 가진 식물로 귀착된다는 단점이 있다. 식물유전공학은 유전물질(전형적으로 DNA 또는 RNA 형태)을 분리 및 조작하여 식물체 내로 도입할 수 있으며 이를 통해 경제적, 농업적, 원예적 형질을 가진 작물 또는 식물을 제공할 수 있다.

[0003] 특히, 경제적으로 중요한 형질은 증가된 수확량이다. 수확량은 보통 작물로부터 경제적 가치의 측정할 수 있는 산물로 정의된다. 이는 양 및/또는 질의 면에서 정의될 수 있다. 수확량은 몇가지 요인에 직접적으로 의존하는데, 예를 들면 기관의 수와 크기, 식물체 형상(예를 들면, 가지의 수), 종자 생산, 잎의 노화 등이 있으며 뿌리 발달, 양분 흡수, 스트레스 내성, 및 초기 활력 또한 수확량 결정에 중요한 요인일 수 있다. 상기 요인들의 최

적화는 작물의 수확량 증가에 기여할 수 있다. 많은 식물의 종자는 인간과 동물의 영양 보급에 중요하므로 종자 수확량이 특히 중요한 형질이다. 옥수수, 벼, 밀, 캐놀라 및 대두와 같은 작물의 경우 종자 자체를 직접적으로 소비하거나, 가공종자로 사육된 육류를 소비함으로써 전체 인간 칼로리 흡수량의 절반 이상을 차지한다.

[0004] 콩(*Glycine max*)은 밀, 옥수수, 벼 다음으로 전 세계에서 많이 생산되는 작물로, 해외 시장과의 무역이 활발해짐에 따라 국내 시장에서 경쟁력을 갖출 필요가 있게 되면서 수확량에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이러한 시장 상황을 고려해 볼 때, 유전공학적 기술을 이용하여 수확량이 증가된 경쟁력 있는 품종의 개발이 필요하다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1295524호에는 '벼 유래의 *dhar* 유전자의 수확량 및 환경 스트레스 조절자로서의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1555270호에는 '식물의 바이오매스 생산성 또는 종자 수확량을 증가시키는 애기장대 *At3g52740* 유전자 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 레스퀘렐라 유래 *PfFAD3-1* 유전자로 형질전환된 수확량이 증가된 콩 식물체 및 이의 제조방법에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 레스퀘렐라 유래 PfFAD3-1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 콩 식물체를 형질전환하여, 형질전환된 콩 식물체의 수확량 및 α-리놀렌산 함량이 증가되는 것을 확인하였고, 이를 통하여 *PfFAD3-1* 유전자가 상기와 같은 식물체의 수확량 및 α-리놀렌산 함량을 조절하는 기능이 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래의 PfFAD3-1(*Physaria fendleri* fatty acid desaturase 3-1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환되어 수확량이 증가된 콩 식물체를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래의 PfFAD3-1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 콩 식물세포를 형질전환시켜 PfFAD3-1 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 콩 식물체의 수확량을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래 PfFAD3-1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 콩 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 콩 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 수확량이 증가된 콩 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 수확량이 증가된 콩 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래 PfFAD3-1 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 콩 식물체의 수확량 증가용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 레스퀘렐라 유래 *PfFAD3-1* 유전자를 과발현시킨 형질전환 콩 식물체는 종자수, 종자량 및 α-리놀렌산 함량을 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서, 수확량이 증가된 식물체의 개발을 위해 *PfFAD3-1* 유전자는 매우 유용할 것으로 기대되며, 이를 이용하여 경제 작물 등의 수확량 증대에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 형질전환 벡터 pβ-*PfFAD3-1*의 모식도이다.

도 2는 pβ-*PfFAD3-1*로 형질전환된 콩 식물체의 생장 과정을 나타낸 사진이다.

도 3은 pβ-*PfFAD3-1*로 형질전환된 T_0 콩 식물체에서 삽입 유전자를 확인하기 위해 수행한 PCR 결과를 나타낸 것이다. WT; 광안콩(야생형), 1~18; 형질전환체.

도 4는 pβ-*PfFAD3-1*로 형질전환된 T_0 콩 식물체에서 유전자 발현을 확인하기 위해 수행한 RT-PCR 결과를 나타낸 것이다. NT; 광안콩(야생형), 1~18; 형질전환체.

도 5는 pβ-*PfFAD3-1*로 형질전환된 T_0 콩 식물체에서 삽입 유전자를 확인하기 위해 수행한 서던 블로팅(Southern blotting) 결과를 나타낸 것이다. 1~16; 형질전환체.

도 6은 pβ-*PfFAD3-1*로 형질전환된 T_0 콩 식물체에 존재하는 지방산의 종류와 각 지방산의 함량을 가스 크로마토그래피로 분석하여 상대적인 피크 값으로 나타낸 결과이다. #1~13, 15; 형질전환체. 16:0 ; 팔미트산, 18:0 ; 스테아린산, 18:1 ; 올레인산, 18:2 ; 리놀레산(linoleic acid), 18:3 ; 레놀렌산(linolenic acid).

도 7은 pβ-*PfFAD3-1*로 형질전환된 T_0 콩 식물체에 존재하는 α-리놀렌산(α-linolenic acid) 함량의 피크 값을 정량화하여 나타낸 그래프이다. 1~13, 15; 형질전환체.

도 8은 GMO 필드에서 재배된 pβ-*PfFAD3-1* T_1 형질전환 콩 식물체의 기장(A), 마디수(B) 및 협수(C)를 분석하여 나타낸 그래프이다. NT; 광안콩(야생형), #1~3, 5~8, 10~13, 15; 형질전환체.

도 9는 GMO 필드에서 재배된 pβ-*PfFAD3-1* T_1 형질전환 콩 식물체의 총 종자수(A) 및 종자량(B)을 분석하여 나타낸 그래프이다. NT; 광안콩(야생형), #1~3, 5~8, 10~13, 15; 형질전환체.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래의 PfFAD3-1(*Physaria fendleri* fatty acid desaturase 3-1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환되어 수확량이 증가된 콩 식물체를 제공한다.

[0015] 본 발명에 따른 PfFAD3-1 단백질의 범위는 레스퀘렐라로부터 분리된 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다.

[0016] 본 발명에 있어서, 용어 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 콩 식물체의 수확량 및 α-리놀렌산 함량을 증가시키는 활성을 의미한다. 본 발명은 또한 PfFAD3-1 단백질의 단편, 유도체 및 유사체(analogues)를 포함한다.

[0017] 본 발명에 있어서, 용어 "단편", "유도체" 및 "유사체"는 본 발명의 PfFAD3-1 폴리펩티드와 실질적으로 같은 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 폴리펩티드를 말한다. 본 발명의 단편, 유도체 및 유사체는 (i) 하나 이상의 보존적(conservative) 또는 비보존적 아미노산 잔기(바람직하게는 보존적 아미노산 잔기)가 치환된 폴리펩티드(상기 치환된 아미노산 잔기는 유전암호에 의해 암호화될 수도, 되지 않을 수도 있다) 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산 잔기에서 치환기(들)를 가지는 폴리펩티드, 또는 (iii) 또 다른 화합물(폴리펩티드의 반감기를 연장할 수 있는 화합물, 예를 들면 폴리에틸렌 글리콜)과 결합된 성숙 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드, 또는 (iv) 부가적인 아미노산 서열(예를 들면, 선도 서열, 분비 서열, 상기 폴리펩티드를 정제하는데 사용된 서열, 프로테이노젠(proteinogen) 서열 또는 융합 단백질)과 결합된 상기 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드일 수 있다. 본 발명에 정의된 상기 단편, 유도체 및 유사체는 당업자에 잘 알려져 있다.

[0018] 본 발명에 따른 콩 식물체는 수확량뿐만 아니라 α-리놀렌산의 함량도 증가될 수 있고, 상기 수확량은 총 종자수, 종자량 등과 같은 종자 생산량일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래의 PfFAD3-1(*Physaria fendleri* fatty acid desaturase 3-1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 콩 식물세포를 형질전환시켜 PfFAD3-1 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 콩 식물체의 수확량을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 경우에 숙주세포는 바람직하게는 콩과(*Fabaceae*) 식물세포일 수 있으며, 더 바람직하게는 콩(종자) 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 또한, 본 발명의 PfFAD3-1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터에서, 상기 *PfFAD3-1* 유전자는 콩 식물체의 수확량 및 α-리놀렌산 함량을 증가시키는 특징이 있으며, PfFAD3-1 단백질을 코딩하는 게놈 DNA, cDNA 및 합성 DNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함

할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명이 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열 번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)을 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0023] 본 발명에서 있어서, 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.

[0024] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현 또는 클로닝을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예를 들면, pLλ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*Escherichia coli*)이 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터(pLλ 프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 재조합 벡터에서, 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터 또는 히스톤 프로모터일 수 있으며, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명에 있어서, "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "항시성(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 항시성 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 항시성 프로모터는 선택 가능성을 제한한지 않는다.

[0027] 본 발명의 재조합 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefiaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비 완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0029] 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다.

[0030] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-

아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0031] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 원핵세포의 예로는, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0032] 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포(예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다.

[0033] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법(Hanahan, D., 1983 J. Mol. Biol. 166, 557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래 PfFAD3-1(*Physaria fendleri* fatty acid desaturase 3-1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 콩 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

[0035] 상기 형질전환된 콩 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 수확량이 증가된 콩 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0036] 상기 식물세포를 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같으며, 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0037] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 수확량이 증가된 콩 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명에 이용되는 식물은 대두, 녹두, 강낭콩, 완두, 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갓무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물일 수 있고, 더욱 바람직하게는, 콩과(*Fabaceae*) 식물일 수 있으며, 더 더욱 바람직하게는 콩(*Glycine max*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 레스퀘렐라 유래 PfFAD3-1(*Physaria fendleri* fatty acid desaturase 3-1) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 콩 식물체의 수확량 증가용 조성물을 제공한다.

[0040] 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 포함하며, 상기 유전자를 콩 식물체에 형질전환함으로써 콩 식물체의 수확량과 α-리놀렌산 함량을 증가시킬 수 있는 것이다.

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] **재료 및 방법**

[0043] **1. 콩 형질전환 벡터 제작**

[0044] 레스퀘렐라 유래 *PfFAD3-1* 유전자는 세종대학교 김현욱 교수로부터 제공받았다. 서브클로닝을 위한 cDNA 절편은 PCR에 의해 준비되었다. 증폭한 유전자를 최종 목적 벡터인 pB2GW7.0에 구축하기 위해서 Gateway LR Clonase™ Enzyme mix Kit(Invitrogen, 미국)를 사용하였고, DH5α(Invitrogen)를 컴피턴트 세포(competent cell)로 사용하여 형질전환하였다. 추가적으로 종자 특이적 발현 프로모터인 콩(*Glycine max*) 유래 β-conglycinin(콘글리시닌) 프로모터를 PfFAD3 발현을 위한 벡터의 프로모터(pβ)로 구축하였다. 구축된 pβ-PfFAD3-1 벡터(도 1)는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 EHA105에 형질전환하였다.

[0045] **2. 콩 형질전환체 및 T_1 종자 생산**

[0046] **2-1. 종자 소독 및 침지**

[0047] 종자는 광안콩을 사용하였고, 이 중 대략 100개의 종자는 멸균한 여과지(아드반텍, 한국)가 놓여진 페트리디쉬(SPL Life Sciences, 한국)에 담은 후, 데시케이터(desiccator)에서 강염산(12N HCl 5 mL)에 락스(12% 차아염소산나트륨 95 mL)를 혼합하여 발생시킨 염산가스로 16시간 동안 1차 소독하였다. 소독이 끝난 종자는 마이크로포어(micropore)로 봉해서 보관하였다. 접종 전날에 1차 소독한 종자를 50 mL 코니컬 튜브에 대략 50개씩 종자를 나눠 담은 후 1% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite) 45 mL과 Tween 20(삼전화학, 한국) 3~5방울을 넣어준 후 10분 동안 2차 소독을 실시하였고, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. 소독한 종자에 멸균수를 부어 20시간 동안 상온에서 침지시켰다.

[0048] **2-2. 형질전환을 위한 아그로박테리움 준비**

[0049] 콩 형질전환 실험에는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 EHA105에 PPT^{R}를 포함하는 pB2GW7.0-β-conglycinin:PfFAD3-1(pβ-PfFAD3-1) 벡터를 도입하여 사용하였다. 형질전환된 아그로박테리움은 고체 YEP 배지[스펙티노마이신 75 mg/L, 리팜피신 25 mg/L, 펩톤 10 g/L, NaCl 5 g/L, 효모 추출물 5 g/L, 1.5%(w/v) 아가 (pH 7.0)]에 28℃에서 배양하여 생성된 단일 콜로니를, 같은 항생제가 들어있는 액체 YEP 배지 10 mL에 넣고 OD_{600}이 0.6~0.8이 될 때까지 28℃에서 220 rpm으로 교반하며 배양하였다. 다 자란 배양균은 30% 글리세롤 10 mL을 넣고 섞은 뒤, 1.5 mL 튜브에 1 mL씩 분주하여 액체 질소에서 급속 냉각시킨 후에 -70℃에서 보관하였다. 접종 하루 전에 상기와 같은 항생제가 들어있는 액체 YEP 배지 200 mL에 -70℃에서 보관해 놓은 아그로박테리움 튜머파시엔스 스톡을 1 mL 넣고 OD_{600}이 0.6~0.8이 될 때까지 28℃에서 220 rpm으로 배양기에서 교반하였다.

[0050] 접종 당일에 액체 YEP 배지 200 mL를 50 mL씩 2개의 센트튜브에 나눠서 20℃, 3,270 x*g*에서 10분 동안 원심분리하였다. 각각의 튜브에 있는 아그로박테리움 튜머파시엔스 펠렛을 액체 CCM(co-cultivation medium; B5 염 0.32 g/L, BA 1.67 mg/L, MES 20 mM, GA3 0.25 mg/L, 아세토시린콘 0.2 mM, L-Cysteine 3.3 mM, 소듐 티오설페이트 1.0 mM, DTT 1.0 mM, 수크로스 3%, pH 5.4) 15 mL을 넣어 재현탁시켰다.

[0051] **2-3. 아그로박테리움 접종과 공배양**

[0052] 침지해 놓은 콩 종자의 양 떡잎 사이로 외과용 메스를 넣어 하배축까지 수직으로 자르고 종피를 제거하였다. 배축을 떡잎 밑 약 1 cm되는 곳에서 자른 후 배축(embryonic axis)이 붙어있는 한쪽만을 사용한다. 배축의 1/3만 남기고 제거한 후 외과용 메스(#11 blade)에 15 mL CCM/아그로박테리움 튜머파시엔스 농축액을 묻힌 다음 7-8회 정도 상처를 내었다. 대략 50개의 콩 절편체를 15 mL CCM/아그로박테리움 튜머파시엔스 농축액에 넣고, 20초 동안 초음파 분해 처리(sonication)를 하였고, 클린벤치 안에서 데시케이터와 다이어프램 펌프(GAST사)를 이용해 진공 30초(500 mm.Hg) 처리를 한 뒤 30분 동안 접종시켰다. 접종이 끝난 절편체는 멸균한 여과지 위에 올려 놓고 물기를 제거하였고, 페트리디쉬에 굳힌 고체 CCM 35 mL(액체 CCM과 동일, 아가 0.7%)에 멸균된 여과지를 한 장 깔고 7개의 절편체를 올려두었으며, 이때 향축(adaxial)이 아래로 향하도록 하였다. 페트리디쉬는 마이크로포어로 봉한 뒤 25℃, 18시간 광주기 조건으로 5일 동안 공배양하였다.

[0053] **2-4. 접종 균 세척 및 신초 유도**

[0054] 상기 5일 동안 공배양한 절편체의 배축을 1-2 cm 남기고 제거하였다. 절편체에서 아그로박테리움 튜머파시엔스를 제균하기 위해서 대략 50개씩 50 mL 튜브에 담아 액체 SIM(shoot induction medium, 신초 유도 배지; B5 염 3.2 g/L, MES 3 mM, 수크로스 3%)에서 10분 동안 2회 세척하였다. 세척된 절편체는 멸균한 여과지 위에 올려 놓고 물기를 제거한 후, 선발항생제가 없는 고체 SIM-① 50 mL(B5 염 3.2 g/L, BA 1.67 mg/L, MES 3 mM, 아가 0.8%, 수크로스 3%, 세포탁심 250 mg/L, 밴코마이신 50 mg/L, 티카르실린 100 mg/L, pH 5.6)에 한 플레이트 당 절편체 6개체씩 치상하였으며, 배축이 배지에 잠길 정도로 고착시켜 향축이 위로 향하도록 하였다. 각각의 플레이트를 마이크로포어로 봉한 뒤 25℃, 18시간 광주기 조건에서 배양하였다.

[0055] 2주 후, 신초가 자란 절편체를 선발항생제 PPT가 들어있는 SIM-② 50 mL (SIM-①과 동일, DL-포스피노트리신 10 mg/L 첨가, pH 5.6)에 5개체씩 치상하였고 신초를 제외한 나머지 부분은 제거한 후, 각각의 플레이트를 마이크로포어로 봉한 뒤 25℃, 18시간 광주기 조건에서 배양하였다.

[0056] **2-5. 신초 신장**

[0057] 선발항생제 PPT가 들어있는 SIM-②에서 2주간 배양 후 갈변한 신초는 외과용 메스(#15 blade)로 제거하고, 신초 패드는 신초가 떨어지지 않을 정도만 얇게 남기고 깎아주었다. 각 절편체는 페트리디쉬에 굳힌 선발항생제 PPT가 들어있는 SEM 55 mL(shoot elongation medium, 신초 신장 배지; MS salt 4.4 g/L, MES 3 mM, GA3 0.5 mg/L, 아스파라진 50 mg/L, 피로글루탐산 100 mg/L, IAA 0.1 mg/L, 지아틴 1 mg/L, 수크로스 3%, 아가 0.8%, 세포탁심 250 mg/L, 밴코마이신 50 mg/L, 티카르실린 100 mg/L, DL-포스피노트리신 5 mg/L, pH 5.6)에 5개씩 치상하였다. 갈변한 신초 및 신초 패드는 2주마다 새로운 SEM 배지로 계대배양하면서 제거함으로써 배지가 잘 흡수되도록 하였고, 신초가 페트리디쉬 뚜껑까지 자라면 두 개의 페트리디쉬를 겹쳐 세워 8 cm 가량 자라도록 하였다. 각각의 플레이트를 마이크로포어로 봉한 뒤 25℃, 18시간 광주기 조건에서 배양하였다.

[0058] **2-6. 뿌리 형성, 순환 과정 및 PPT 잎 페인팅(leaf painting)**

[0059] 선발항생제 PPT가 들어있는 SEM에서 신장된 신초가 8 cm 이상일 때, 외과용 메스(#11 blade)로 신초를 패드로부터 잘라내고 잘린 신초 끝을 비스듬하고 매끄럽게 자른 후 신초의 잘린 부위를 1 mg/mL IBA(indole butyric acid)에 3분간 담가뒀다가 빼내어 유리시험관에 굳힌 고체 RM 30 mL(rooting medium, 뿌리 유도 배지; MS 염 4.4 g/L, MES 3 mM, 수크로스 3%, 아가 0.8%, 세포탁심 50 mg/L, 밴코마이신 50 mg/L, 티카르실린 50 mg/L, 아스파라진 25 mg/L, 피로글루탐산 25 mg/L, pH 5.6)에 옮겨 넣었다. 뿌리가 충분히 자라게 되면 3차 증류수로 RM 배지를 씻어내고 상토(바이오 프러그 2호, 흥농종묘)와 버미큘라이트를 2:1로 섞어 넣은 작은 포트에 심어서 물을 50 mL 넣은 후, 뿌리가 자란 식물체를 심어서 마젠타 박스(magenta box) 안에 넣어 순화시켰다. 7일 정도 경과 후 잎 표면에 100 mg/L DL-포스피노트리신(phosphinothricin)으로 잎 페인팅(leaf painting)을 하였다. 각 식물체는 일주일에 한번 30 mL씩 물을 주었고 25℃, 18시간 광주기 조건에서 성장시켰다.

[0060] **2-7. T_1 종자 생산**

[0061] 형질전환 식물체가 작은 포트 위로 15 cm 이상 자라고 잎이 9장 이상 되면 더 큰 포트에 옮겨 심고 플라스틱 덮개에 약 10개 정도의 구멍을 만들어 씌워서 온실에서 성장시켰으며, 형질전환 식물체가 플라스틱 덮개 윗면까지 자랐을 때 플라스틱 덮개를 제거하였다. 각 형질전환 식물체는 일주일 중 3회에 걸쳐 500 mL씩 물을 주었고 25℃, 18시간 광주기 조건에서 성장시켰으며, 그 결과 최종적으로 각 형질전환 식물체들로부터 T_1 종자를 수확하였다.

[0062] **3. 유전자 도입 분석**

[0063] **3-1. PCR 및 서던 블로팅 분석**

[0064] 형질전환 식물체에 벡터 pβ-PfFAD3-1이 정확히 삽입되었는지 확인하기 위해서 PCR 및 서던 블로팅 분석을 실시하였다. 꽃눈이 생긴 직후의 형질전환 식물체의 어린잎을 1 g 정도 정량하고 액체 질소로 냉각시켰으며, 냉각한 잎을 막자사발로 곱게 갈아준 후 CTAB 방법을 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 도입 유전자인 *PfFAD3*, 선별 유전자인 *Bar* 및 β-conglycinin 프로모터 서열을 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0065] 서던 블로팅(Southern blotting)을 분석하기 위해, 각 형질전환 식물체의 게놈 DNA를 계통별로 약 10 ㎍ 게놈 DNA를 *Hind*Ⅲ로 밤새 효소절단하였다. 절단한 DNA를 1 % 아가로스 겔에 전기영동하였다. 분리된 DNA를 모세관 현상을 이용하여 나일론 막(Hybond-N^+, Amersham, 영국)으로 트랜스퍼하였다. 혼성화, 세척 및 검출은 DIG(digoxigenin)-라벨된 DNA 프로브와 화학 발광(chemiluminescent) 시스템(Roche, 독일)을 이용하여 수행하였다. DIG-라벨된 DNA 프로브는 *Bar* 프라이머(서열번호 9 및 서열번호 10)를 이용하여 PCR 증폭에 의해 준비되었다. 각 프라이머의 염기서열 정보는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0066] 프라이머 정보

프라이머 명칭	염기서열 (5'→3') (서열번호)
PfFAD3_F	ATGGTGGTTGCTATGGACAAACGT (3)
PfFAD3_R	GTCAGAAGCATAAACGTAGAGATC (4)
Bar_F	ATGAGCCCAGAACGACGCCCGGCC (5)
Bar_R	GGGTCATCAGATTTCGGTGACGGG (6)
β-conglycinin_F	ATTTGCCGCTATTAATTAATTTGG (7)
β-conglycinin_R	GTTAGTATATCTTAAATTCTTTAA (8)
DBar_F	AACTTCCGTACCGAGCCGCA (9)
DBar_R	TCGTAGGCGTTGCGTGCCTT (10)
Tub_F	TGAGCAGTTCACGGCCATGCT (11)
Tib_R	CTCGGCAGTGGCATCCTGGT (12)

[0067] **3-2. RT-PCR**

[0068] *PfFAD3* 및 *Bar* 유전자의 발현을 확인하기 위하여 광안콩과 각각 형질전환체의 RNA를 계통별로 분리하였다. RT-PCR은 Maxime RT-PCR PreMix(iNtRON, 한국)를 이용하여 수행하였고, 상기 PCR 프라이머와 같은 프라이머로 증폭하였다. RNA 발현정도를 일정하게 정량화하기 위해 튜블린(Tubulin)을 이용하였으며, 튜블린 증폭을 위한 프라이머는 표 1에 개시되어 있다.

[0069] **4. α-리놀렌산 함량 분석**

[0070] **4-1 지방산 추출과 지방산 유도체화**

[0071] 지방산 분석을 위해 먼저 광안콩과 레스퀘렐라 유래 *PfFAD3-1* 유전자가 삽입된 콩 종자를 Planetary Mono Mill pulverisette6(FRITSCH, 독일)을 이용하여 각각 분쇄하고, 상기 분쇄된 콩 분말 50~100 mg에서 지방산 추출을 수행하였다. 유리 튜브에 분쇄된 콩 분말, 5% 황산(sulfuric acid)(v/v)이 포함된 메탄올 0.5 mL, 톨루엔(toluene) 0.5 mL 및 내부표준시료로 사용된 펜타데카논산(pentadecanoic acid)(Sigma, 미국) 50 ㎍을 첨가하여 85℃에서 2시간 동안 반응시킴으로써 지방산 추출과 지방산 유도체화를 동시에 수행하였다. 1.5 mL의 0.9% 염화나트륨(NaCl)(w/v)을 첨가하여 수용성 성분인 글리세롤과 메탄올을 분리시켰고, 1 mL의 n-헥산(hexane)을 첨가하여 지방산의 유도체인 지방산 메틸에스테르(fatty acid methyl esters, FAMEs)를 추출하였다. 상기 추출 과정을 2번 반복한 후 얻어진 FAMEs은 질소가스로 n-헥산을 증발시켜 농축시킨 후 다시 200 ㎕의 n-헥산으로 녹여 기체 크로마토그래피(gas chromatograph) 분석을 위해 유리 바이알(vial)에 담았다.

[0072] **4-2 가스크로마토그래프 분석**

[0073] 콩의 지방산 조성과 함량은 가스 크로마토그래피(GC-2010 plus, Shimadzu, 일본)을 이용하여 분석하였다. 분석 조건은 주입장치(injector) 250℃, 검출장치(detector) 250℃이었으며, 검출장치는 불꽃이온화검출기(flame

ionization detector, FID)를 사용하였고 컬럼(column)은 HP-FFAP(30 m x 0.25 μm x 0.25 mm, Agilent, 미국)을 사용하였다. 오븐의 초기 온도는 190℃이고, 230℃까지 분당 5℃의 속도로 온도를 상승시키다가 230℃에서 3.5 분간 유지하였다. 각각의 지방산은 내부표준시료의 피크 면적을 비교하여 분석하였으며 α-리놀렌산의 함량은 각각의 지방산이 차지하는 몰(mole) 수를 계산한 후 그 백분율을 계산하여 구하였다.

[0074] **5. GMO 필드에서의 농업형질 조사**

[0075] 야생형인 광안콩과 형질전환체 콩 종자(T_1 세대)들을 GMO 필드(군위, 경북대학교)에 심었고, 20일 동안 재배한 후에 PPT로 잎 페인팅을 통해 선발하였으며 농업형질인 T_1 식물체의 기장(cm), 마디수(개), 협수(개), 총 종자수(개) 및 종자량(g)을 조사하였다.

[0076] **실시예 1: 형질전환체 벡터와 형질전환체 생산**

[0077] *PfFAD3-1* 유전자와 pB2GW7.0 벡터를 이용하여 형질전환용 벡터를 제작하였다(도 1). 형질전환체는 도 2와 같이 식물의 재분화 과정을 거쳐 18개체의 형질전환체를 생산하였다.

[0078] **실시예 2: 형질전환체의 유전자 도입 확인을 위한 PCR 분석**

[0079] 상기에서 전술한 방법에 따라 PfFAD3-1 T_0 형질전환체에서 DNA를 분리하여 PCR을 수행한 결과, 대부분의 형질전환 콩 식물체에서 도입 유전자 *PfFAD3-1*, 선별 유전자 *Bar* 및 β-conglycinin 프로모터가 도입된 것을 확인하였고(도 3), RT-PCR을 수행한 결과 대부분의 형질전환 콩 식물체에서 *PfFAD3-1* 및 *Bar* 유전자가 발현된 것을 확인하였다(도 4). T_0 형질전환체에서 카피수를 확인하기 위해 서던 블로팅을 수행한 결과, 라인 6, 8, 11 및 12에서 한 개의 카피 수를 보였다(도 5).

[0080] **실시예 3. 콩 형질전환체의 α-리놀렌산 함량 분석**

[0081] 콩 형질전환체의 α-리놀렌산 함량을 조사하기 위해 가스크로마토그래피를 실시하여 야생형 광안콩(NT)과 T_0 형질전환체 라인의 피크 값을 측정하였다(도 6). 형질전환체에 존재하는 각각의 지방산은 내부표준시료의 피크 면적을 비교하여 분석하였으며, α-리놀렌산 함량은 각각의 지방산이 차지하는 몰(mole) 수를 계산한 후 그 백분율 계산하여 구하였다.

[0082] 따라서, α-리놀렌산 함량의 피크 값을 정량화하여 비교한 결과, 광안콩과 비교하였을 때 라인 1, 2, 3, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 15에서 α-리놀렌산 함량이 각각 25%, 52%, 360%, 421%, 422%, 480%, 316%, 414%, 72%, 42% 증가하였고(도 7), 특히, 라인 3, 6, 8, 10, 11, 12 개체에서 α-리놀렌산 함량이 야생형 광안콩에 비해 현저하게 증가하였음을 확인하였다.

[0083] **실시예 4. 콩 형질전환체의 농업형질 조사**

[0084] 콩 형질전환체의 수확량을 조사하기 위해 GMO 필드에서 재배된 야생형 광안콩과 형질전환체의 농업형질을 조사하였다. 각 식물체의 초장(도 8A), 마디수(도 8B), 협수(도 8C), 총 종자수(도 9A) 및 종자량(도 9B)을 조사하여 비교분석하였다.

[0085] 그 결과, 식물체 초장(height)은 형질전환체 라인 1, 6, 11, 12, 13, 15에서; 식물체의 마디(nod) 수는 대부분의 형질전환체 라인에서; 식물체의 협(pod) 수는 형질전환체 라인 1, 7, 10, 11, 12, 13, 15에서 대조군(광안콩)에 비해 유의성 있는($P<0.05$, $P<0.01$) 증가를 보였다.

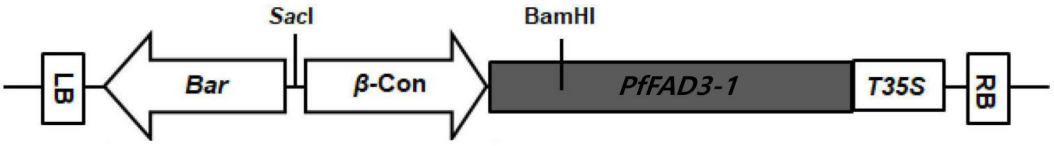
[0086] 또한, 형질전환체에서의 총 종자수는 형질전환체 라인 1, 7, 10, 11, 12, 13, 15에서; 총 종자량은 형질전환체 라인 2와 3을 제외한 모든 라인에서 대조군에 비해 유의성 있는($P<0.05$, $P<0.01$) 증가를 확인하였다.

[0087] 상기 결과를 통해, *PfFAD3-1* 유전자가 도입된 콩 형질전환체에서는 야생형 광안콩에 비해 α-리놀렌산 함량이

증가할 뿐만 아니라 수확량도 증가한다는 것을 알 수 있었다.

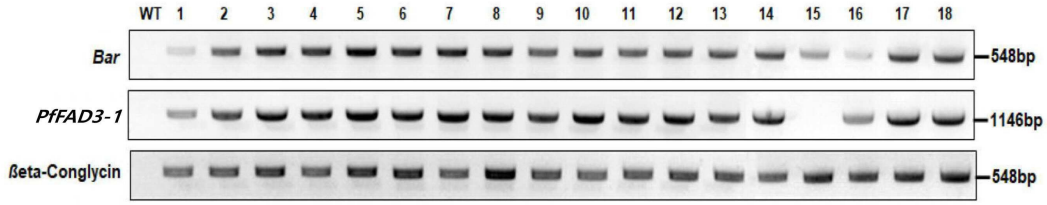
도면

도면1

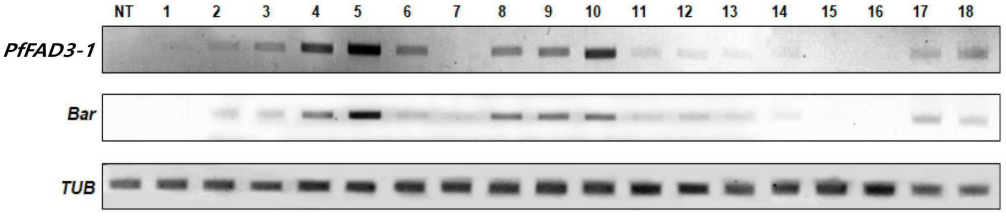


도면2

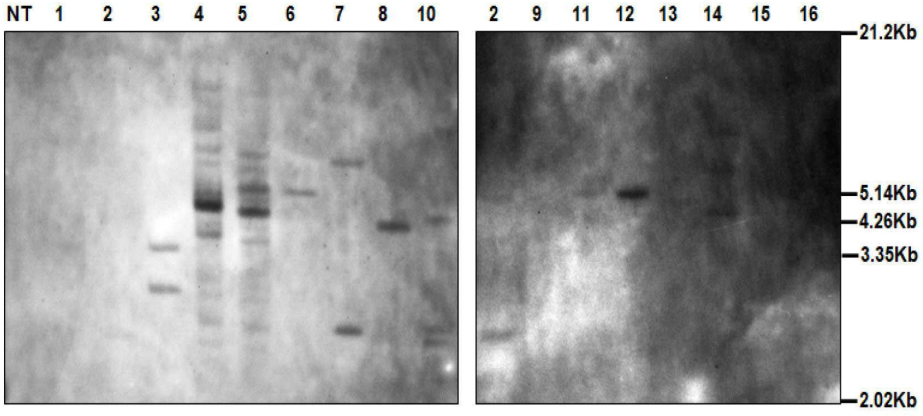
도면3



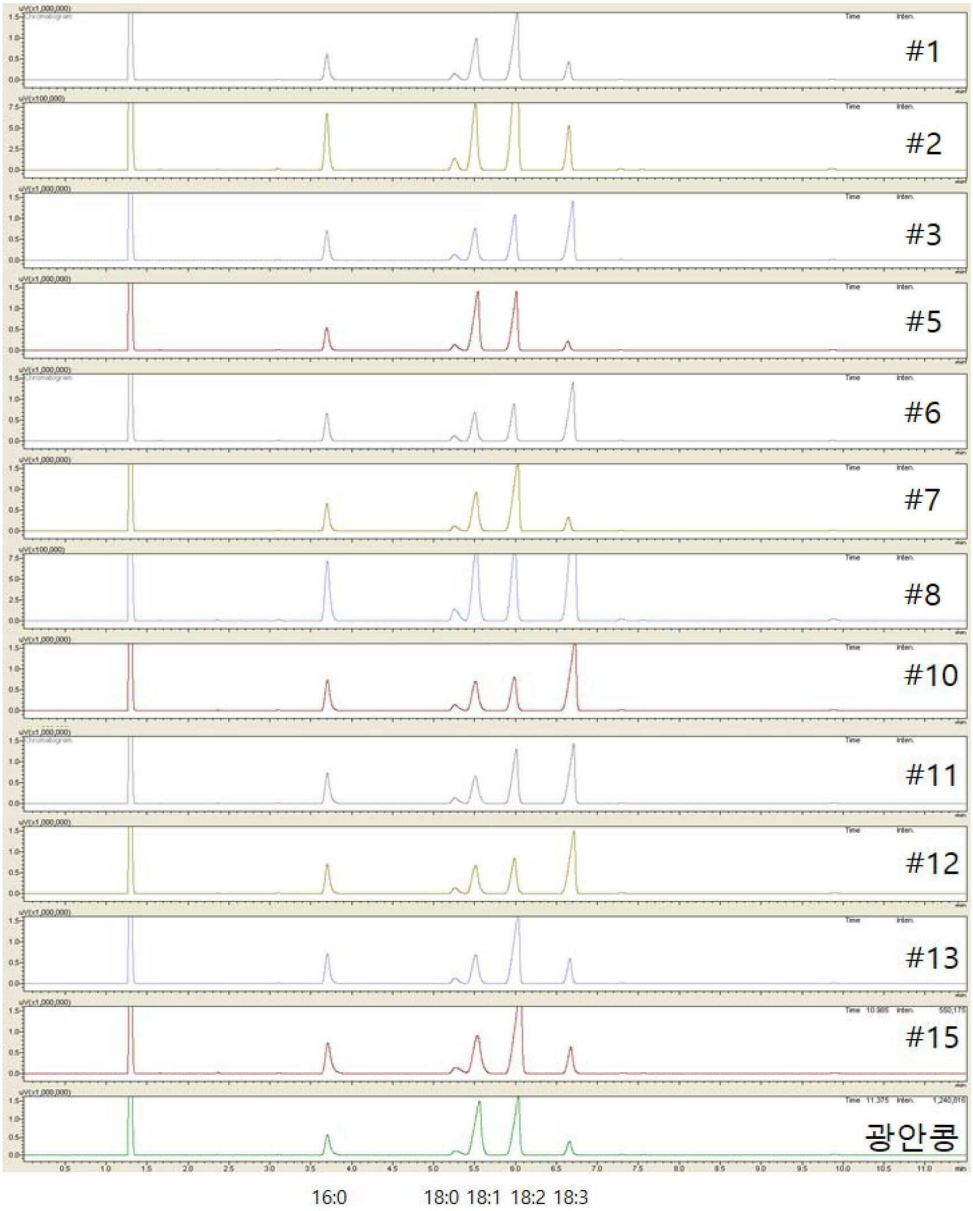
도면4



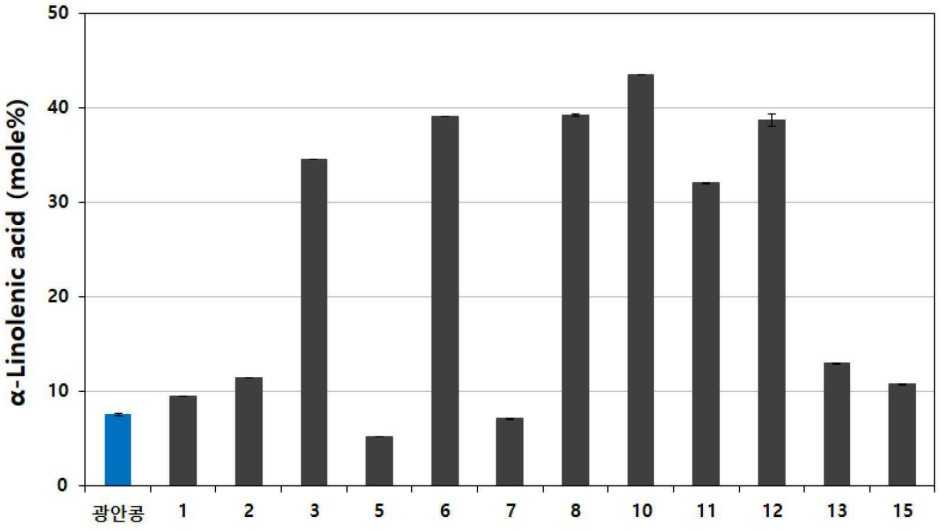
도면5


NT 1 2 3 4 5 6 7 8 10
2 9 11 12 13 14 15 16
21.2Kb
5.14Kb
4.26Kb
3.35Kb
2.02Kb

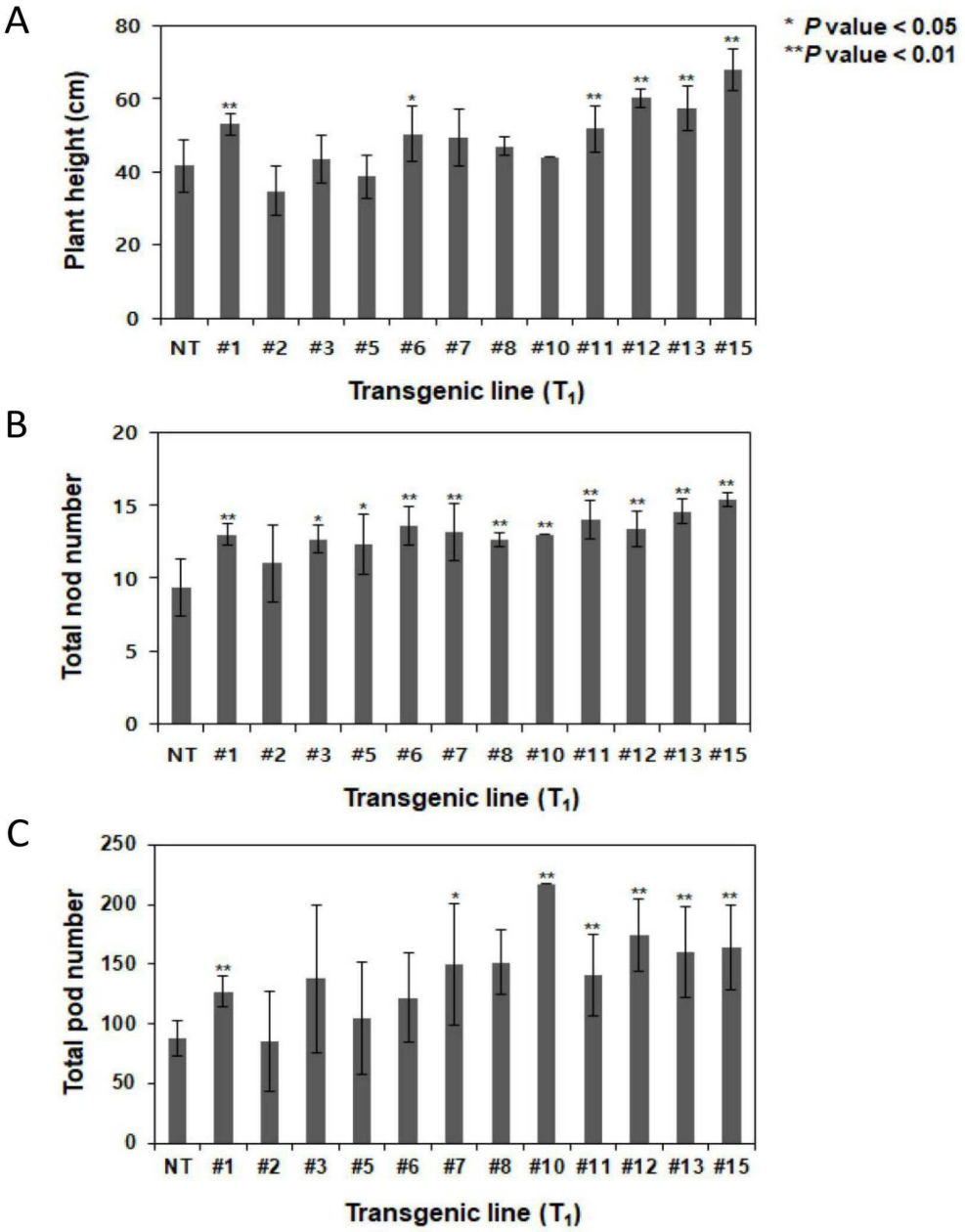
도면6


#1
#2
#3
#5
#6
#7
#8
#10
#11
#12
#13
#15
광안콩
16:0
18:0 18:1 18:2 18:3

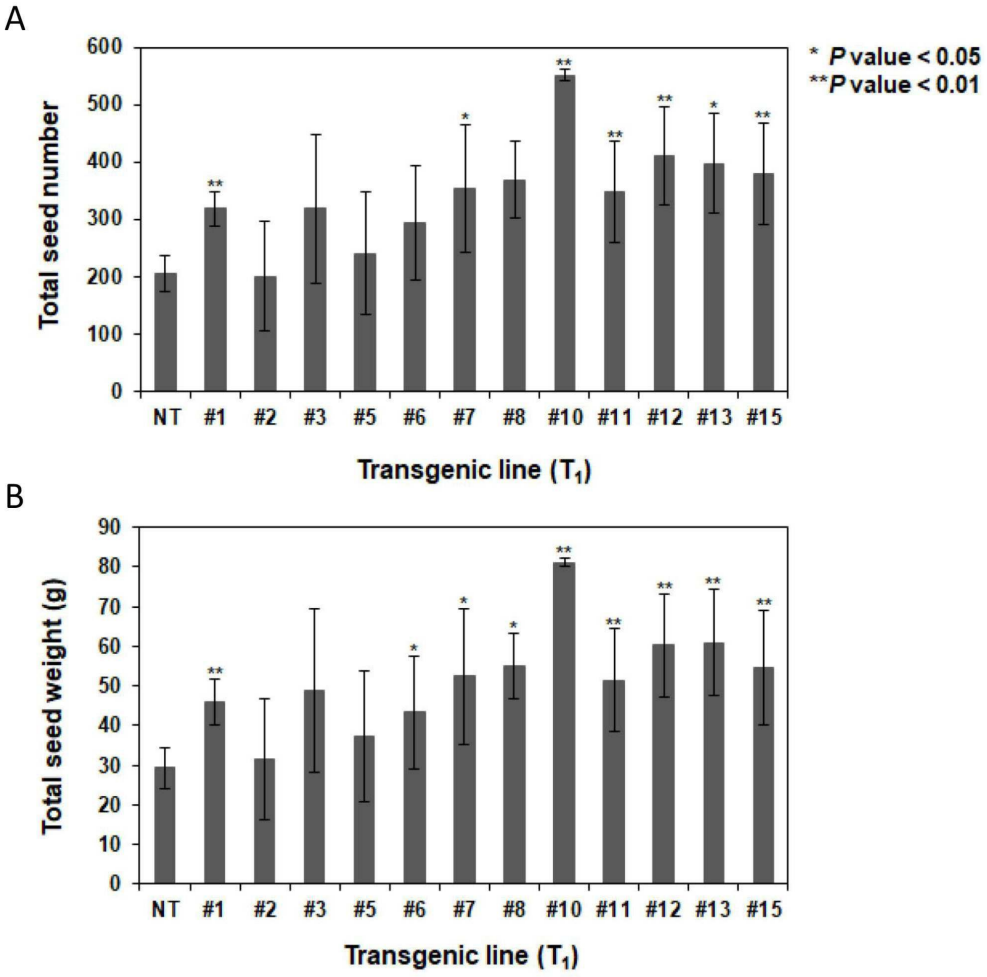
도면7



도면8


A
B
C
* P value < 0.05
** P value < 0.01
Plant height (cm)
Total nod number
Total pod number
NT #1 #2 #3 #5 #6 #7 #8 #10 #11 #12 #13 #15
Transgenic line (T1)

도면9



서 열 목 록

<110> Dong-A University Research Foundation For Industry-Academy Cooperation

INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION OF SEJONG UNIVERSITY

REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)

<120> Soybean plant with increased yield transformed with PfFAD3-1 gene from lesquerella and production method thereof

<130> PN17468

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1164

<212> DNA

<213> Physaria fendleri

<400> 1

atggtggttg ctatggacaa acgtagcaat gtgaagggag atccaggagg cgcaggagac 60

ccgaagaaag aagaaaggtt tgatccgagc gctcagccgc cgtttaagat cggggatata 120

agagcggcaa taccaaagca ctgttgggtt aaaagtcctt tgaaatcaat gagttacgtc 180

gtcagagaca ttctcgccgt cgcatttctg gccatcgccg ccgtctattt tgacagctgg 240

atcctttggc ctctttattg ggttgcccaa ggtacccttt tctgggccat cttcgtcctc 300

ggccacgact gtggacatgg gagtttctcg gacattcctc tgctgaatag tgtggttggt 360

cacattcttc attccttcat tctcgttcct taccatggtt ggagaataag ccaccggacg 420

caccaccaga accatggcca tgttgaaaac gacgagtcat gggtcccgtt gccagaaaag 480

gtgtacaaga acttgcccca cagtactcgg atgctaagat ataccgtccc tctccccatg 540

cttgcttatc ctctctatct ctgttacaga agtcctggaa aagaaggatc acattttaac 600

ccatacagta gtttatttgc tccaagcgag agaaagctta ttgcaacttc aactacttgt 660

tggtccatca tgtttgtcac acttattgct ctatcattta tcttcggacc aatctctgtt 720

cttaaagtct acggtgttcc ttacatcatc tttgtgatgt ggttggacgc tgtcacatat 780

ttacatcacc atggtcacga tgagaagttg ccttggtaca gaggcaagga atggagttat 840

ttacgtggag gattaacaac tatagataga gattatggaa tttttaacaa catccatcac 900

gacattggaa cacacgtgat ccaccatctc ttcccacaaa tccctcacta tcacttggtc 960

gaggccacga aagcagctaa acatgtgtta ggaagatact acagagaacc aaagacgtca 1020

ggagcaatac cgatccactt ggtggagagt ttggtctcaa gtattaagaa agatcattac 1080

gtcagtgaca gtggtgatat tgtcttctac gagacagatc cagatctcta cgtttatgct 1140

tctgacaaat ctaaaatcaa ttaa 1164

<210> 2

<211> 387

<212> PRT

<213> Physaria fendleri

<400> 2

Met Val Val Ala Met Asp Lys Arg Ser Asn Val Lys Gly Asp Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ala Gly Asp Pro Lys Lys Glu Glu Arg Phe Asp Pro Ser Ala Gln

20 25 30

Pro Pro Phe Lys Ile Gly Asp Ile Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys

```
          35                  40                  45
Trp Val Lys Ser Pro Leu Lys Ser Met Ser Tyr Val Val Arg Asp Ile
      50                  55                  60
Leu Ala Val Ala Phe Leu Ala Ile Ala Ala Val Tyr Phe Asp Ser Trp
 65                  70                  75                  80

Ile Leu Trp Pro Leu Tyr Trp Val Ala Gln Gly Thr Leu Phe Trp Ala
                 85                  90                  95
Ile Phe Val Leu Gly His Asp Cys Gly His Gly Ser Phe Ser Asp Ile
            100                 105                 110
Pro Leu Leu Asn Ser Val Val Gly His Ile Leu His Ser Phe Ile Leu
        115                 120                 125
Val Pro Tyr His Gly Trp Arg Ile Ser His Arg Thr His His Gln Asn
    130                 135                 140
His Gly His Val Glu Asn Asp Glu Ser Trp Val Pro Leu Pro Glu Lys

145                 150                 155                 160
Val Tyr Lys Asn Leu Pro His Ser Thr Arg Met Leu Arg Tyr Thr Val
                165                 170                 175
Pro Leu Pro Met Leu Ala Tyr Pro Leu Tyr Leu Cys Tyr Arg Ser Pro
            180                 185                 190
Gly Lys Glu Gly Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Ser Leu Phe Ala Pro
        195                 200                 205
Ser Glu Arg Lys Leu Ile Ala Thr Ser Thr Thr Cys Trp Ser Ile Met
    210                 215                 220

Phe Val Thr Leu Ile Ala Leu Ser Phe Ile Phe Gly Pro Ile Ser Val
225                 230                 235                 240
Leu Lys Val Tyr Gly Val Pro Tyr Ile Ile Phe Val Met Trp Leu Asp
                245                 250                 255
Ala Val Thr Tyr Leu His His His Gly His Asp Glu Lys Leu Pro Trp
            260                 265                 270
Tyr Arg Gly Lys Glu Trp Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Ile
        275                 280                 285
```

Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Phe Asn Asn Ile His His Asp Ile Gly Thr

290 295 300

His Val Ile His His Leu Phe Pro Gln Ile Pro His Tyr His Leu Val
305 310 315 320

Glu Ala Thr Lys Ala Ala Lys His Val Leu Gly Arg Tyr Tyr Arg Glu
325 330 335

Pro Lys Thr Ser Gly Ala Ile Pro Ile His Leu Val Glu Ser Leu Val
340 345 350

Ser Ser Ile Lys Lys Asp His Tyr Val Ser Asp Ser Gly Asp Ile Val
355 360 365

Phe Tyr Glu Thr Asp Pro Asp Leu Tyr Val Tyr Ala Ser Asp Lys Ser
370 375 380

Lys Ile Asn
385

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 3
atggtggttg ctatggacaa acgt 24

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 4
gtcagaagca taaacgtaga gatc 24

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

atgagcccag aacgacgccc ggcc 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gggtcatcag atttcggtga cggg 24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

atttgccgct attaattaat ttgg 24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gttagtatat cttaaattct ttaa 24

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

aacttccgta ccgagccgca 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

tcgtaggcgt tgcgtgcctt 20

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

tgagcagttc acggccatgc t 21

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

ctcggcagtg gcatcctggt 20