



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월28일
(11) 등록번호 10-2149256
(24) 등록일자 2020년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8216 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0055003
(22) 출원일자 2019년05월10일
심사청구일자 2019년05월10일
(56) 선행기술조사문헌
Ting Yuan 등. Molecular Plant. Vol. 4, No. 2,
페이지 300-309 (2011.03.)*
Genbank Accession number JN564609
(2012.03.11.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
박창진
서울특별시 광진구 아차산로70길 62, 308동 1203호(광장동, 광장현대3단지아파트)
김영아
서울특별시 광진구 동일로26길 8, 301호(화양동, 무지개하우스)
문혜란
서울특별시 광진구 능동로27나길 4, 301호(군자동)
(74) 대리인
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **벼의 흰잎마름병 저항성 증진용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 벼의 특정 유전자 부위의 서열 교정으로 간결하고, 효율적이며, 번식능과 같은 타 식물학적 특성의 변성을 주지 않는 우수한 효과를 갖는 벼의 흰잎마름병 저항성 증진용 조성물, 증진방법 및 증진된 벼에 관한 것이다.

대표도 - 도1a

TATGAGGCTCCAGCTCTCCAAATGGCAACAACACACTGAGTGGTCATACGTGTCAAT 600
TATGAGGCTCCAGCTCTCCAAATGGCAACAACACACTGAGTGGTCATACGTGTCAAT 600
TGCCCTCAGTTATGCATTCAATGACCAATATTCAAGTAGTGGAGAAGGGACAGAT 660
TGCCCTCAGTTATGCATTCAATGACCAATATTCAAGTAGTGGAGAAGGGACAGAT 660
CTAGAGGTAGAAAAAGAAATTCATATAAATGATATACAGAGTAAAAAGAAATACAA 720
CTAGAGGTAGAAAAAGAAATTCATATAAATGATATACAGAGTAAAAAGAAATACAA 720
GCACAAGAAAAAGCAAAAGTTAGATATGCATCTCCCTACTGTACAACAACAAAG 780
GCACAAGAAAAAGCAAAAGTTAGATATGCATCTCCCTACTGTACAACAACAAAG 780
TGGAGGGTCTCCAACTATATAACAAGTGGCCATGGCCAGGCCAAACCAACATGCAAT 840
TGGAGGGTCTCCAACTATATAACAAGTGGCCATGGCCAGGCCAAACCAACATGCAAT 840
TGTAGTGCACCTAAGCCTTCTCTCTAGCTAGCATCTTGTGTCAAGGAAGTGGAAAG 900
TGTAGTGCACCTAAGCCTTCTCTCTAGCTAGCATCTTGTGTCAAGGAAGTGGAAAG 900
GATTTCTGGCTAGTTTCTAGCTGGTGTCTCCTCTCCTCTCCTAACTTCTCACTGATTA 960
GATTTCTGGCTAGTTTCTAGCTGGTGTCTCCTCTCCTCTCCTAACTTCTCACTGATTA 960
ACACCTTAGAGTTAGTTAATAACCTTCAACCAAGTACCAATG 1003
ACACCTTAGAGTTAGTTAATAACCTTCAACCAAGTACCAATG 1003

(52) CPC특허분류

C12N 15/111 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/8281 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345294336

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 Autophagic Cell Death 연구를 통한 식물 면역 반응 증진

기여율 1/1

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 서열로 이루어진 sgRNA 전사주형 유전자 서열; 및 Cas9 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는 발현벡터;를 포함하는 벼의 흰잎마름병 저항성 증진용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 벼는 자포니카, 인디카 및 이들의 교잡종으로 이루어진 품종 군에서 선택된 적어도 하나인 조성물.

청구항 3

서열번호 1의 서열로 이루어진 sgRNA 전사주형 유전자 서열; 및 Cas9 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는 발현벡터;로 벼를 형질전환(transformation)하는 단계를 포함하는 벼의 흰잎마름병 저항성 증진 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 벼는 자포니카, 인디카 및 이들의 교잡종으로 이루어진 품종 군에서 선택된 적어도 하나인 방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 형질전환은 아그로박테리움-매개 형질전환법, 폴리에틸렌글리콜-매개 프로토플라스트 형질전환법, 유전자총법, 전극 형질전환법, 진공 침윤 형질전환법 및 탄화규소 섬유-매개 형질전환법으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 수행되는 방법.

청구항 6

적어도 2개의 xa13 대립유전자(allele) 서열 내에 서로 독립적으로, 서열번호 1의 서열의 17, 18번째 염기 사이에 A, T, G 또는 C가 삽입된 서열을 포함하는, 흰잎마름병 저항성이 증진된 벼.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 xa13 대립유전자 서열은 엑손 영역의 서열인 벼.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 대립유전자는 호모, 헤테로 또는 키메라의 접합성(zygosity)인 벼.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 벼는 자포니카, 인디카 및 이들의 교잡종으로 이루어진 품종 군에서 선택된 하나인

벼.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벼의 특정 유전자 부위의 서열 교정으로 간결하고, 효율적이며, 번식능과 같은 타 식물학적 특성에는 영향을 주지 않는 우수한 효과를 갖는 벼의 흰잎마름병 저항성 증진용 조성물, 증진방법 및 증진된 벼에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 벼(오리자 사티바 엘., *Oryza sativa* L.)는 세상에서 가장 중요한 알곡작물 중 하나로, 다른 어떠한 작물보다 더 많은 사람들에게 직접 영양분을 제공한다. 잔토모나스 오리제 피브이, 오리제(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)에 의해 야기되는 세균성 마름병은 전세계적으로 심각한 생산성 손실을 초래하는 일반적이고 파괴적인 벼 질병이다. Xoo에 대한 벼의 저항성을 강화하는 것은 벼의 세균성 마름병을 관리하기 위한 경제적이고 효율적인 접근으로 알려진다.

[0004] Xoo의 병원력은 식물의 전사 활성인자를 흉내 내는 전사 활성인자 유사 이펙터(transcription activator-like (TAL) effectors, 탈이펙터)라고 불리는 특정 병원성 인자군에 좌우된다. 탈이펙터는 숙주 핵을 표적으로 하고, 식물 유전자의 특정 프로모터 부위와 결합해서 그들의 발현을 활성화시켜서 식물의 전체 전사체를 재프로그래밍(reprogramming)한다. 잔토모나스 스트레인의 계통은 통상적으로 아시아 Xoo, 아프리카 Xoo, 및 북미 Xoo 사이의 매우 가변적인 수의 탈이펙터를 보유한다. 탈이펙터에 의해 표적이 된 벼 유전자는 숙주의 질병에 대한 감수성 유전자로 확인되고, 벼와 Xoo의 상호작용 동안 주요 감수성 인자로 작용한다. 감수성 유전자의 프로모터 영역에 배치된 소위 탈이펙터 결합 성분(EBEs)의 DNA 다형성은 질병이 진행되지 않도록 한다. 벼 Os8N3(OsSWEET11으로도 공지됨)은 당 운반체의 SWEET(Sugar Will Eventually be Exported Transporters)군에 속하고, 탈이펙터에 의해 유도되는 감수성 유전자 중 하나에 해당한다. Os8N3의 발현은 탈이펙터 PthXo1을 암호화하는 pthXo1을 갖는 Xoo 스트레인에 의해 유도된다. Xoo 스트레인 PX099로부터의 PthXo1은 Os8N3의 프로모터 영역에 배치된 탈이펙터 EBEs의 인식을 통해 Os8N3을 직접 활성화시킨다. 열성 저항성 유전자 xa13은 감수성 유전자 Os8N3의 천연 대립형질 시리즈로서 발생한다. 명확하게 증명되지는 않았지만, xa13/Os8N3은 Xoo가 증식되고 확산되는 물관으로부터 독성 구리를 제거하고, Xoo에 영양분이 쉽게 전달되도록 하여 병을 일으킬 정도로 성장과 병원성을 갖게 한다.

[0005] 게놈 편집 기술은 체내 DNA 서열의 정확한 변이를 가능하게 하고, 작물 개량의 새로운 혁명을 가능하게 한다. 크리스퍼(clustered regularly interspaced shot palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR-연관 단백질-9(Cas9) 시스템은 게놈 편집을 혁신하고, 이의 특이성, 간편성 및 융통성 때문에 폭넓게 대중화되었다. 이는 유기체의 표적화된 게놈 편집이 단일 가이드 RNA(sgRNA)라 불리는 맞춤형 작은 비암호화 RNA에 의해 인도되도록 한다. 탈이펙터에 의해 표적화된 감수성 유전자가 확인되면, 그 감수성 유전자의 표적 돌연변이를 만들어내기 위해 CRISPR/Cas9-매개 게놈 편집 전략이 사용될 수 있다. 이는 또한 지난 수십년동안 연구된 병 저항성에 관여하는 음성 조절 인자에 적용될 수 있다. 그러나, 현재까지는 CRISPR/Cas9 접근을 사용해서 병 저항성을 개선하는 사례는 오직 몇 가지만이 보고되었다. 기존에, xa13/Os8N3에 대한 유전자 침묵 시스템(gene silencing system) 및 프로모터 돌연변이를 사용한 이의 녹다운(knockdown) 벼에 대한 연구들은 Xoo에 대한 개선된 저항성은 보이거나 꽃가루가 비정상적으로 발달하는 치명적인 단점이 있음이 보고되었다. 이에 반하여 돌연변이 생성을 통한 유전자의 녹아웃(knockout) 연구는 아직 xa13/Os8N3에 적용된 예가 없다.

[0006] 본 연구에서는 자포니카 벼 품종인 키타케(Kitaacke)의 xa13/Os8N3의 CRISPR/Cas9-표적 돌연변이 생성이 보고된다. 편집된 xa13/Os8N3을 갖는 동형접합 돌연변이 라인은 정상적인 꽃가루 발달과 함께 Xoo에 대해 상당히 개선된 저항성을 나타내었다. T1 세대의 분리에 의해 전이된 DNA(T-DNA)을 보유하지 않는 저항성 돌연변이 라인을 선택하는 것이 가능하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 1955075호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 벼의 특정 유전자 부위의 서열 교정으로 간결하고, 효율적이며, 번식능과 같은 타 식물학적 특성의 변성을 주지 않는 우수한 효과를 갖는 벼의 흰잎마름병 저항성 증진용 조성물, 증진방법 및 증진된 벼를 제공함에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 1. 서열번호 1의 서열로 이루어진 sgRNA 전사주형 유전자 서열; 및 Cas9 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는 발현벡터;를 포함하는 벼의 흰잎마름병 저항성 증진용 조성물.
- [0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 벼는 자포니카, 인디카 및 이들의 교잡종으로 이루어진 품종 군에서 선택된 적어도 하나인 조성물.
- [0013] 3. 서열번호 1의 서열로 이루어진 sgRNA 전사주형 유전자 서열; 및 Cas9 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는 발현벡터;로 벼를 형질전환(transformation)하는 단계를 포함하는 벼의 흰잎마름병 저항성 증진 방법.
- [0014] 4. 위 3에 있어서, 상기 벼는 자포니카, 인디카 및 이들의 교잡종으로 이루어진 품종 군에서 선택된 적어도 하나인 방법.
- [0015] 5. 위 3에 있어서, 상기 형질전환은 아그로박테리움-매개 형질전환법, 폴리에틸렌글리콜-매개 프로토플라스트 형질전환법, 유전자총법, 전극 형질전환법, 진공 침윤 형질전환법 및 탄화규소 섬유-매개 형질전환법으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 수행되는 방법.
- [0016] 6. 적어도 2개의 xa13 대립유전자(allele) 서열 내에 서로 독립적으로, 서열번호 1의 서열의 17, 18번째 염기 사이에 A, T, G 또는 C가 삽입된 서열을 포함하는, 흰잎마름병 저항성이 증진된 벼.
- [0017] 7. 위 6에 있어서, 상기 xa13 대립유전자 서열은 엑손 영역의 서열인 벼.
- [0018] 8. 위 6에 있어서, 상기 대립유전자는 호모, 헤테로 또는 키메라의 접합성인 벼.
- [0019] 9. 위 6에 있어서, 상기 벼는 자포니카, 인디카 및 이들의 교잡종으로 이루어진 품종 군에서 선택된 하나인 벼.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 벼의 흰잎마름병 저항성 증진용 조성물, 증진방법은 벼의 특정 유전자 부위의 서열 교정으로 간결하고, 효율적이며, 번식능과 같은 타 식물학적 특성의 변성을 주지 않는 우수한 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1. xa13/Os8N3은 벼 품종 키타케(Kitaake)에서 Xoo 스트레인 PX099에 대한 감수성 유전자이다.
 - 1a. 니폰바레(Nipponbare) 및 키타케(Kitaake)로부터의 PthXo1 EBE(밑줄)를 보유하는 프로모터는 서로 100% 동일성을 나타내었다. 추정 TATA 박스는 파선으로 도시된다. 전사 시작 사이트는 +1로 기재된 수직 화살표로 표시된다. 번역 개시 ATG 코돈은 'M'으로 도시된다.
 - 1b. xa13/Os8N3의 발현은 키타케(Kitaake)에서 Xoo 스트레인 PX099로 접종 후 증가된다. 벼의 연장 인자 1a (rEF1a)가 내부 대조군으로 사용되었다.
 - 1c. 키타케(Kitaake)는 PX099와 접종 후 긴 수침상 병변을 가진 감수성 표현형을 나타내었다. 병변은 접종 후 12일(DAI)에 사진 촬영되었고, 화살표는 병변의 끝을 지시하였다.
- 도 2. 벼의 xa13/Os8N3 유전자의 CRISPR/Cas9-매개 표적화 돌연변이 생성의 도식도
 - 2a. xa13/Os8N3 유전자의 구성도 및 xa13m 표적 서열
 벼의 xa13/Os8N3는 검은색 직사각형으로 표시된 5개의 엑손 및 하얀색 직사각형으로 표시된 비번역 영역 부분을

보유한다. 검은색 파선으로 지시된 확대된 영역은 xa13/Os8N3의 첫 번째 엑손의 암호화 서열 및 위치를 도시한다. 20 bp sgRNA 표적 서열(xa13m) 및 모티프 인접 프로토타입(protospacer adjacent motif, PAM) 서열은 각각 빨간색 및 밑줄 친 소문자로 도시된다. 수직 화살표는 예상되는 절단 사이트를 지시한다. 밑줄 친 대문자 ATG는 번역 개시 코돈을 지시한다.

2b. OsU6a 프로모터의 조절 하에 xa13m-sgRNA를 갖는 재조합 OsU6a::xa13m-sgRNA/pHAtC 벡터의 T-DNA 영역. Cas9의 발현은 꽃양배추모자이크바이러스 35S(CaMV35S) 프로모터에 의해 촉진되고; xa13m-sgRNA의 발현은 OsU6a 프로모터에 의해 촉진되며; 하이그로마이신(HPT)의 발현은 노팔린 신테아제(nopal in synthase, NOS) 프로모터에 의해 촉진된다; NLS: 유인원바이러스 40(SW40) 대형 T 항원의 핵이행신호; nos-t: 유전자 종결부위; LB 및 RB: 각각 왼쪽 및 오른쪽 가장자리. PCR에 사용되는 프라이머는 검은색 화살표로 지시된다.

도 3. xa13 유전자를 표적으로 하는 sgRNA를 갖는 Cas9 전이 유전자를 갖는 형질전환 벼의 생성. Cas9에 대한 특정 프라이머, Cas9_RT_F 및 Cas9_RT_R(도 2b 참조)을 사용해서 독립적으로 형질전환된 식물 및 이들의 자손의 유전형질분석(genotyping)이 수행되었다(OsU6a xa13m/키트 T₀, T₁, T₂ 및 T₃ 세대). 게놈 DNA는 Kit(키타케, Kitaake) 및 OsU6a xa13m/Kit T₀ (a), T₁ (b), T₂ (c) 및 T₃ (d)에서 추출되었다. 'X'는 PCR 음성을 지시한다.

도 4. xa13/Os8N3의 양쪽 대립형질에서의 CRISPR/Cas9-매개 돌연변이 생성은 Xoo에 개선된 저항성을 부여하였다.

4a. xa13/Os8N3 돌연변이 벼 라인(T₁)의 세균성 마름병 저항성 표현형. Xoo와 12DAI의 벼. 왼쪽에서 오른쪽으로 키타케(Kitaake, Kit), 유비퀴틴 프로모터로 촉진된 Xa21을 갖는 형질전환 라인(XA21, 7A-8), 및 OsU6a::xa13m-sgRNA/pHAtC 구조물을 갖는 형질전환 라인(OsU6a xa13m/Kit, T₁). 화살표는 병변의 끝을 지시하였다. WT: 야생형; HO: 동형접합; Bi: 이대립형질; He: 이형접합.

4b. 키타케(Kitaake), XA21 및 OsU6a xa13m/Kit T₁의 12 DAI에 측정된 병변 길이. 그래프의 오차 막대는 각각의 식물의 적어도 세 개의 잎에 대한 표준 오차를 나타낸다. 글자는 투키'스 에이치에스디 시험(Tukey's HSD test)에 의한 P < 0.050에서의 현저한 차이를 지시한다.

도 5. xa13/Os8N3의 양쪽 대립형질에서의 동형접합 돌연변이는 Xoo에 대해 개선된 저항성을 나타내었다. xa13을 표적으로 하는 형질전환 키타케(Kitaake)(OsU6a xa13m/Kit T₂)는 Xoo에 대해 개선된 저항성을 나타내었다.

5a. 돌연변이 벼 라인과 Xoo의 12 DAI 접종결과. 왼쪽부터 오른쪽으로 키타케(Kitaake, Kit), 유비퀴틴 프로모터로 촉진된 Xa21 를 갖는 형질전환 라인(XA21, 7A-8), 및 OsU6a::xa13m-sgRNA/pHAtc 구조물을 갖는 형질전환 라인(OsU6a xa13m/Kit, T₂). 화살표는 병변의 끝을 지시하였다. He: 이형접합; WT: 야생형; Ch: 키메라; Ho: 동형접합.

5b. 키타케(Kitaake), XA21 및 OsU6a xa13m/Kit T₂의 12 DAI에 측정된 병변 길이. 그래프의 오차 막대는 각각의 식물의 적어도 세 개의 잎에 대한 표준 오차를 나타낸다. 글자는 투키'스 에이치에스디 시험(Tukey's HSD test)에 의한 P < 0.050에서의 현저한 차이를 지시한다.

5c. 0 및 12 DAI에 키타케(Kitaake), XA21 및 OsU6a xa13m/Kit T₂의 접종된 잎 당 CFU의 수로 측정된 박테리아 개체군. 오차 막대는 적어도 세 번의 기술적인 반복 실험으로부터의 표준 편차를 나타낸다. 글자는 투키'스 에이치에스디 시험(Tukey's HSD test)에 의한 P < 0.050에서의 현저한 차이를 지시한다.

도 6. 동형접합 xa13/Os8N3 돌연변이의 꽃가루 생존도.

6a. 키타케(Kitaake), 동형접합 돌연변이 꽃가루(T₃, 3A-6-1-1) 및 동형접합 돌연변이 꽃가루(T₃, 4A-1-7-1)의 꽃가루 생존도 시험의 대표 이미지. 생존 가능한 꽃가루 입자는 어둡게 염색되고(회색 화살표), 생존 가능하지 않는 꽃가루 입자는 밝은 노란색으로 염색된다(흰색 화살표). 기준자, 100 μm.

6b. 키타케(Kitaake), 동형접합 돌연변이(T₃, 3A-6-1-1) 및 동형접합 돌연변이(T₃, 4A-1-7-1) 라인의 꽃가루 생존도의 통계 분석. 꽃가루 생존도 비율은 세 개의 현미경 이미지에서 계산된 총 꽃가루에 대비하여 계산되었다.

도 7. 자포니카 벼 품종 키타케(Kitaake) 및 인디카 벼품종 93-11로부터의 OsU6a 프로모터의 서열 비교.

도 8. 키타케(Kitaake) 및 두 개의 동형접합 xa13/Os8N3 돌연변이 라인, 3A-6-1 (A) 및 4A-1-7 (B)의 T₃ 자손의 자라는 형태 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0026] 벼의 흰잎마름병이란, 세균의 일종인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*에 의해 일어나는 병의 일종으로서, 잎에 흰무늬를 형성하여 말라버리는 증상을 갖는데, 본 발명은 상기 세균과 관련된 유전자인 xa13 유전자 간 상호작용을 배경으로, xa13의 유전자 서열을 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 간단히 교정함으로써 벼의 흰잎마름병에 대한 저항성을 현저히 증대시키는 것에 관련된 것으로, 종래 기술과는 달리, 벼의 흰잎마름병에 대한 저항성 외 다른 특성에 대한 변화를 일체 유발하지 않는다는 매우 큰 장점을 갖는다.
- [0028] 본 발명은 서열번호 1의 서열로 이루어진 sgRNA 전사주형 유전자 서열; 및 Cas9 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는 발현벡터;를 포함하는 벼의 흰잎마름병 저항성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0029] 상기 Cas9 단백질은 CRISPR associated protein 9을 의미하는 것일 수 있으나, Cas9과 동일/유사한 교정부위 및 기능을 갖는 Cas9 변종(variants) 또한 포함하는 개념으로 해석할 수 있음은 당업계 통상의 실시자에 쉽게 이해되는 것이며, 구체적으로는, Cas12a (Cpf1), Cas14a, eSpCas9, HypaCas9 또는 FokI-Fused dCas9 단백질 등이 상기 변종에 해당될 수 있다.
- [0030] 서열번호 1의 서열로 이루어진 sgRNA 전사주형 유전자는 본 발명의 CRISPR/Cas9 시스템에 의한 벼 유전자의 교정에 있어, 특정 교정 부위를 타겟팅하고, 그 효율을 현저히 상승시키며, 후술할 실시예에서 확인할 수 있듯, 흰잎마름병에 대한 저항성 증진 외 벼의 일반적인 특성, 예를 들면, 꽃가루 생존도(pollen viability)와 같은 특성을 변화시키지 아니하며 교정할 수 있는 주된 발명 구성요소이다.
- [0031] 본 발명의 서열번호 1의 서열로 이루어진 sgRNA 전사주형 유전자는 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 증가물, 예를 들어, 본 발명의 서열번호 1의 서열로 이루어진 sgRNA 전사주형 유전자의 일부 서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변이되었지만, 본 발명의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 sgRNA 전사주형 유전자로부터 전사된 sgRNA 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다.
- [0032] 본 발명의 발현벡터는 벼 내에서 Cas9 단백질 및 sgRNA가 발현될 수 있도록 프로모터 등의 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미하는 것으로서, 숙주 세포 또는 미생물의 게놈내로 통합되어 있는 형태일 수도 있다.
- [0033] 본 발명의 발현벡터는 기본 골격으로서 pHAtC, pYLCRISPR/Cas9Pubi, pYLCRISPR/Cas9P35s, pUB-Cas9, pCAMBIA1300DM_OsU6_AarI_Cas9, pCAMBIA1300-OsU3(AarI)-Cas9, Binary vector pUB-Cas9-@GL1, Binary vector pUB-Cas9-@BAR, pYLsgRNA-OsU3, pYLsgRNA-OsU6c, pYLsgRNA-OsU6b 및 pYLsgRNA-OsU6a로 이루어진 군에서 선택된 하나의 벡터 골격을 사용할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 아니하고, 본 발명의 sgRNA 및 Cas9 단백질을 성공적으로 발현하여 CRISPR/Cas9 시스템에 의한 벼의 유전자 교정을 가능케 하는 벡터 골격이라면 당업계에 주지된 벡터 골격 어떠한 것이든 특별히 제한되지 아니한다.
- [0034] 본 발명의 발현벡터로서 당업계에 주지된 벡터 골격을 사용하는 경우, 상기 벡터 골격에 존재하는 프로모터는 벼 내에서 형질전환이 가능하도록 프로모터가 변이 또는 치환된 형태일 수 있고, 이는 당업계에 주지된 프로모터로서 벼의 형질전환에 사용가능한 프로모터일 수 있다. 구체적인 예를 들면, U6b, U6c, U3, UBI10, PolIII, PolIII, YAO 및 CaMV35S로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 프로모터일 수 있고, 보다 구체적으로는, OsU6a와 같은 단자엽 식물의 형질전환에 적합한 형태의 프로모터로 벡터 골격 내 프로모터가 치환된 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 조성물은 상기 발현벡터 외 CRISPR/Cas9 유전자 교정 시스템의 효율을 높이기 위한 보조물질 등을 특별한 제한없이 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 흰잎마름병의 저항성 증진용 조성물로서, 증진 대상은 벼(rice plant)이다. 상기 벼의 품종에 있어, xa13 유전자를 가지어 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 병원균과 상호작용할 수 있는 품종이라면 특별한 제한은 없으나, 구체적으로 예를 들자면, 자포니카, 인디카 및 이들의 교잡종으로 이루어진 품종 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.

- [0038] 본 발명은 서열번호 1의 서열로 이루어진 sgRNA 전사주형 유전자 서열; 및 Cas9 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는 발현벡터;로 벼를 형질전환(transformation)하는 단계를 포함하는 벼의 흰잎마름병 저항성 증진 방법을 제공한다.
- [0039] 상기 형질전환에 있어서, 당업계에 주지된 형질전환 방법으로서 벼의 유전자의 형질전환이 가능한 방법이라면 특별히 제한되지는 아니하나, 구체적인 예를 들자면, 아그로박테리움-매개 형질전환법, 폴리에틸렌글리콜 (Polyethylene glycol; PEG)-매개 프로토플라스트 형질전환법, 유전자총법, 전극(electrode) 형질전환법, 진공 침윤(Vacuum infiltration) 형질전환법 및 탄화규소 섬유-매개 형질전환법으로 이루어진 군에서 선택된 하나에 의해 수행되는 것일 수 있고, 벼의 특성과 형질전환율을 고려할 때 아그로박테리움법을 사용함이 바람직할 수 있다.
- [0040] 상기 발현벡터 및 벼에 관한 구체적인 내용은 상술한 바와 같다.
- [0042] 본 발명은 적어도 2개의 xa13 대립유전자(allele) 서열 내에 서로 독립적으로, 서열번호 1의 서열의 17, 18번째 염기 사이에 A, T, G 또는 C가 삽입된 서열을 포함하는, 흰잎마름병 저항성이 증진된 벼를 제공한다.
- [0043] 본 발명의 벼는 xa13 대립유전자 서열 내의 특정 위치에 1개의 뉴클레오티드가 삽입되어, 해당 부위의 유전자 서열의 frame shift가 발생된 형태일 수 있는데, 이는 해당 영역 유전자가 갖는 기능적 측면의 변이 내지는 비발현 등의 돌연변이(mutation)를 야기하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 벼는 xa13 대립유전자 서열 내의 특정 위치에 1개의 뉴클레오티드가 삽입된 형태의 서열을 포함하는 것으로서, 상기 특정위치 및 상기 특정 개수의 뉴클레오티드 삽입 조건을 부합함에 따라, 상기 특정 조건을 부합하지 않는 경우 대비, 흰잎마름병에 대한 저항성 증진 외 벼의 일반적인 특성, 예를 들면, 꽃가루 생존도 (pollen viability)와 같은 특성의 차이가 발현되지 않는 주된 요인일 수 있다.
- [0045] 상기 xa13 대립유전자 서열은 엑손 영역의 서열일 수 있는데, 이는 reading frame 내의 frame shift로 인해, 발현되는 단백질의 구조를 변화시키거나, 단백질이 발현이 되지 않거나, 전사 또는 번역이 되지 않도록 하여 벼의 흰잎마름병에 대한 저항성을 갖는 것일 수 있다.
- [0046] 상기 xa13/Os8N3 대립유전자는 유전자 편집을 통한 돌연변이 과정의 결과로 호모(동형), 헤테로(이형) 또는 키메라의 접합성(zygosity)을 가질 수 있다. 구체적으로, 호모의 경우는 게놈 편집에 의해 xa13/Os8N3 유전자에 삽입/결손된 뉴클레오티드(A, T, G, C 중 선택된 하나)의 종류가 동일하여 동일하게 돌연변이 된 대립유전자 xa13/Os8N3가 접합된 경우(2n)이고, 헤테로는 하나의 대립 유전자에만 뉴클레오티드가 삽입/결손이 발생하여 서로 상이한 대립유전자(예로 돌연변이된 xa13/Os8N3과 돌연변이가 되지 않은 xa13/Os8N3)가 접합된 경우(2n)이며, 키메라는 삽입된 뉴클레오티드의 종류가 서로 동일 또는 상이한 대립유전자가 2개 이상이고, 총 대립유전자의 수가 3개 이상인 돌연변이 접합성(2n+1, 3n, 4n 등)을 갖는 경우를 의미한다.
- [0047] 상기 벼의 품종에 있어, xa13 유전자를 가지어 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 병원균과 상호작용할 수 있는 품종이라면 특별한 제한은 없으나, 구체적으로 예를 들자면, 자포니카, 인디카 및 이들의 교잡종으로 이루어진 품종 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0049] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.
- [0051] **실험방법**
- [0052] **1. 식물 및 병원균 재료**
- [0053] 벼 품종 키타케(Kitaake)(오리자 사티바 엘.에스에스피. 자포니카, *Oryza sativa* L. ssp. Japonica)는 파멜라 로날드 교수(캘리포니아 데이비스 대학교, 미국)에 의해 친절하게 제공되었다. 본 연구에서 벼는 한국 세종대학교 온실 시설에서 보관하였다. 본 연구에서는 Xoo 스트레인 PX099를 사용하였다. PX099는 7.5 mg/L의 세파렉신을 보유하는 펩톤 스쿠로즈 한천 배지(PSA: 펩톤 10.0 g/L, 스쿠로즈 1.0 g/L, L-글루탐산 1.0 g/L 및 한천 16.0 g/L)에서 28° C로 배양하였다.
- [0055] **2. 벡터 생성**
- [0056] sgRNA를 발현하기 위해 OsU6a 프로모터를 갖는 OsU6a::pHAtC를 구성하는데 게이트웨이™ 목적 벡터(destination vector), pHAtC 바이너리 벡터(binary vector)를 사용하였다. OsU6a 프로모터를 보유하는 472-bp DNA 절편을 프라이머, EcoRI_OsU6a_F (서열번호 6, 5′ -GGAAATCTTTTTTTCCTGTAGTTTTCCAC-3′) 및 XhoI_OsU6a_R (서열번호

7, 5'-GCTCGAGACACCTGCCTCCAATCCGGCAGCCAAGCCAGCACCC-3')를 사용해서 키타케(Kitaake)의 게놈 DNA로부터 증폭시켰다. PCR 생성물을 제조자의 지시에 따라 pGEM[®]-T 이지 벡터로 넣어주었고(프로메가, 미국), 생어(Sanger) 서열분석을 통해 삽입물을 확인하였다. OsU6a 프로모터는 EcoRI + XhoI을 사용해서 pGEM[®]-T 이지 벡터로부터 잘라내었고, pHAt로 넣어주어 OsU6a::pHAtC를 제작하였다.

[0058] **3. sgRNA 발현 벡터의 복제**

[0059] xa13/Os8N3를 위한 sgRNA(xa13m-sgRNA)를 발현하는 OsU6a::xa13m-sgRNA/pHAtC 벡터를 이전에 기재된 방법에 따라 생성하였다. 요약하면, 키타케(Kitaake)의 xa13/Os8N3 편집을 위한 표적 서열(xa13m)를 CRISPR-RGEN 툴스 웹사이트를 통해 설계하였다(<http://rgenome.ibs.re.kr>). xa13/Os8N3를 위한 sgRNA 주형(xa13m)을 두 가지 프라이머, 5'-GATTGCTGTCCATGGCTAACCCGG-3'(서열번호 8) 및 5'-AAACCCGGTTAGCCATGGACAAGC-3'(서열번호 9)을 사용해서 이중가닥으로 만들고, AarI 효소로 잘린 OsU6a::pHAtC에 넣어주었다. sgRNA의 발현 벡터, OsU6a::xa13m-sgRNA/pHAtC의 제조 및 이의 인접부위 서열(flanking sequences)을 생어 서열분석을 통해 확인하였다.

[0061] **4. 벼 형질전환**

[0062] 벼 형질전환을 이전에 기재된 바와 같이 시행하였다. 키타케(Kitaake) 종자 유래 캘러스 조직을 감염시키기 위해 근두암종균(Agrobacterium tumefaciens) 스트레인 LBA4404를 사용하였다. OsU6a::xa13m-sgRNA/pHAtC 구조물을 갖는 형질전환체를 하이그로마이신을 사용해서 선별하였다. xa13m-sgRNA (OsU6a xa13m/Kit)를 과발현하는 형질전환 키타케(Kitaake) 식물을 Cas9-특정 프라이머, Cas9_RT_F (서열번호 10, 5'-CGAGCTGACCAAGGTGAAGT-3') 및 Cas9_RT_R (서열번호 11, 5'-CGTTGATAAGCTTGC GGCTC-3')을 사용하여 PCR을 통해 확인하였다.

[0064] **5. 발현**

[0065] 외부에서 도입한 Cas9 및 sgxa13 유전자의 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석을 위해, 전체 RNA를 TRIzol 시약(인비트로젠, 미국)을 사용해서 OsU6a xa13m/Kit 식물의 완전히 확장된 잎으로부터 추출하였다. 첫 번째 가닥인 cDNA는 정량화된 RNA(5 µg의 총 RNA)를 사용해서 합성하였다. Cas9의 발현을 Cas9_RT_F 및 Cas9_RT_R을 사용하여 RT-PCR를 통해 확인하였다. 한편, rEF1a cDNA 절편은 특정 프라이머, rEF1a1048F (서열번호 12, 5'-ACTGCCACACCTCCACATTG-3') 및 rEF1a1552R (서열번호 13, 5'-CAACAGTCGAAGGGCAATAATAAGTC-3')을 사용해서 대조군으로써 증폭시켰다.

[0066] **6. 돌연변이 형질전환 식물의 식별**

[0067] 벼의 게놈 DNA를 키타케(Kitaake) 잎 및 형질전환 OsU6a xa13m/Kit 식물로부터 추출하였다. 모든 형질전환 하이그로마이신-내성 T₀ 식물은 Cas9-특정 프라이머, Cas9_RT_F 및 Cas9_RT_R를 사용하여 PCR를 통해 분석하였다. 이후에, xa13 표적 사이트를 가로지르는 DNA 절편을 xa13-특정 프라이머, xa13_cas9 60-79_F (서열번호 14, 5'-TCTGGCTAGTTTCTAGCTGG-3') 및 xa13_cas9 뉴클레아제_R (서열번호 15, 5'-TGCATGAGCTGAAGCTAGGG-3')를 사용해서 모든 PCR-양성 식물의 게놈 DNA로부터 증폭시켰다. 이후에 프라이머 xa13_cas9 60-79_F를 사용해서 PCR 증폭절편(amplicons)을 직접 서열분석하였다. 이대립형질 이형접합 돌연변이의 증착된 피크를 보유하는 서열 크로마토그램은 디제너레이트 시퀀스 디코딩 방법(Degenerate Sequence Decoding method)을 사용해서 해독하였다(<http://skl.scau.edu.cn/dsdecode/>).

[0070] **7. Xoo 접종 및 박테리아 개체군의 측정**

[0071] Xoo 접종을 위해서 키타케(Kitaake), XA21 및 형질전환 OsU6a xa13m/Kit 식물을 달리 지시하지 않는 한 8주 단계에 도달할 때까지 정상적으로 온실에서 길렀다. 시저스 딥 방법(scissors dip method)을 사용해서 벼에 접종을 시키기 위해 PX099를 사용하였다. 병변 길이 측정을 위해서, 적어도 세 개의 접종된 잎을 측정하여 접종 후 12 일(DAI)의 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 대표 잎은 12 DAI에 사진 촬영되었다. 접종된 잎의 0 및 12 DAI로부터 Xoo 집락을 계산하기 위해, 병변 및 병변을 보이지 않는 조직을 포함하는 상부 잎 조직 20 cm를 뺀 박테리아를 수득하기 위해 10 ml 물에 다시 담겼다. 추출물은 적당히 희석하여 7.5 mg/l 세파렉신을 함유하는 PSA 플레이트 위에 도말하였다. 이 배지를 이틀 동안 28°C에서 배양한 후 집락 형성 단위(CFU)를 계산하였다. 투키'스 에이치에스디 시험(Tukey's HSD test)을 사용하여 통계 분석을 실시하였다.

[0073] **8. 꽃가루 생존도 시험**

[0074] 꽃가루 생존도를 이전에 기재된 바에 따라 평가하였다(춘 외, 2007). 개화 전, 키타케(Kitaake) 및 형질전환 OsU6a xa13m/Kit 식물의 6개의 꽃밥을 제거하고, 미세분말로 부숴다. 꽃가루 입자를 10 μ l I₂-KI 용액(1% I₂, 3% KI)으로 염색하고, 1 μ l의 염색된 꽃가루 입자를 취한 후 광학 현미경을 이용하여 생식력 있는 혹은 불임의 꽃가루를 관찰하였다. 어둡게 염색된 꽃가루 입자는 생식력이 있는 생존 가능한 것으로 간주되고, 꽃가루 생존도 비율은 5개의 현미경 이미지에서 계산된 전체 꽃가루에 대비해서 계산하였다. 종자 생존도는 전체 개수 당 종자로 설정되는 소수(spikelets)의 비율에 해당한다. 투키'스 에이치에스디 시험(Tukey's HSD test)을 사용하여 통계 분석을 실시하였다.

[0076] **실험결과**

[0077] **1. 키타케(Kitaake) 벼 품종의 xa13/Os8N3**

[0078] 원래 xa13/Os8N3은 벼 품종 니폰바레(Nipponbare)로부터 감수성 유전자로 분리된 후, PX099의 탈이펙터 PthXo1가 그 유전자의 프로모터에 있는 EBE에 결합되고 활성화시킴이 실험적으로 결정되었다(로머 외, 2010). 본 연구에서는 우선 벼 품종 키타케(Kitaake)도 혹은 xa13/Os8N3 프로모터 영역에서 EBE 서열을 보유하는지를 알아보기 위해서 조사되었다. 키타케(Kitaake) 데이터베이스를 사용해서, ATG 시작 코돈 대비 -1,000 bp 내지 -1 bp의 범위에 있는 xa13/Os8N3 유전자의 프로모터 서열이 분석되었다(도 1a). 추정 TATA 박스(TATAAA)는 전사 시작 사이트(+1) -32 상류에 위치한다. PthXo1 EBE (서열번호 16, TGCATCTCCCCCTACTGTACACCAC)를 보유하는 프로모터 영역은 전사 시작 사이트의 -80 bp 내지 -56 bp 상류 범위에 있고, 니폰바레(Nipponbare)와 100% 동일성을 나타낸다(양 외, 2006). 스트레인 PX099와 접종 후, 키타케(Kitaake)는 접종 후 이틀째(DAI)에 xa13/Os8N3의 강한 유도(도 1b), 및 12DAI에 긴 수침상 병변(약 13-14cm)(도 1c)을 나타내었다. 이러한 결과는 키타케(Kitaake)가 기능성이 있는 감수성 유전자 xa13/Os8N3를 보유하고, 이의 발현이 탈이펙터 PthXo1를 보유하는 PX099로부터 유도되는 것을 시사한다.

[0080] **2. xa13/Os8N3 편집을 위한 CRISPR/Cas9 설계**

[0081] 외떡잎식물에서는, 벼의 U3 소핵 RNA 프로모터(OsU3)가 일반적으로 sgRNA를 발현하기 위해 사용된다. 최근에는, OsU3, OsU6a, OsU6b 및 OsU6c를 포함하는 다른 소핵 RNA 프로모터에 의해 추진되는 sgRNA로 표적화된 돌연변이의 효율이 인디카 벼품종 93-11에서 비교되었다. OsU6a는 다른 프로모터보다 게놈 편집을 추진하는데 조금 더 효율적이었다. 또한 U6 프로모터가 이중 U6 프로모터보다 표적 식물 기능이 많이 유래하는 것으로 보고되고 있다. 그러므로, 자포니카 벼 품종 키타케(Kitaake)에서 분리된 OsU6a 프로모터를 사용하기로 결심하였다. 키타케(Kitaake)로부터 증폭된 OsU6a 프로모터는 인디카 벼 품종 93-11로부터의 것과 비교해서 다섯 개의 단일-뉴클레오티드 치환체 및 하나의 5-bp 결실을 보유한다. CRISPR/Cas9 벡터, pHAtC에서 애기장대(Arabidopsis) U6 프로모터는 키타케(Kitaake) OsU6a 프로모터로 교체되고, 수득된 OsU6a::pHAtC가 벼의 CRISPR/Cas9-매개 표적 돌연변이생성을 위해 사용되었다.

[0082] xa13/Os8N3 유전자를 표적으로 하는 CRISPR/Cas9를 설계하기 위해, xa13m의 첫 번째 엑손에서 20-bp 뉴클레오티드 서열(xa13m)이 표적 사이트로 선택되었다(도 2a). xa13m 표적 서열 및 모티브 인접 프로토스페이스(protospacer adjacent motif, PAM) 서열이 각각 빨간색 및 밑줄 친 소문자로 표시된다. 유전자의 암호화 영역에서 예상되는 Cas9 절단 사이트(수직 화살표)는 ATG 개시 코돈으로부터 31bp 하류였다. 이후에 OsU6a 프로모터의 조절 하에 xa13/Os8N3 유전자를 표적으로 하는 xa13m-sgRNA를 갖는 재조합 바이너리 플라스미드(recombinant binary plasmid), OsU6a::xa13m-sgRNA/pHAtC는 OsU6a::pHAtC를 기반으로 생성되었다(도 2b).

[0084] **3. xa13/Os8N3의 CRISPR/Cas9-매개 표적화 돌연변이 생성**

[0085] 중앙균 매개 형질전환을 사용해서 키타케(Kitaake)가 OsU6a::xa13m-sgRNA/pHAtC로 형질전환된 후 네 개의 독립적인 형질전환 키타케(Kitaake) 라인(OsU6a xa13m/Kit, T₀)이 생성되었다. 추정 형질전환 라인은 Cas9-특정 프라이머, Cas9_RT_F 및 Cas9_RT-R(도 2b), 및 Cas9-특정 400 bp 증폭 절편(amplicons)(도 3a)에 생성된 모든 것을 사용해서 증합효소 연쇄 반응(PCR) 기반 선별에 적용되었다. xa13/Os8N3의 CRISPR/Cas9-표적화 돌연변이 생성을 추가로 조사하기 위해서, 모든 PCR-양성 형질전환 식물로부터 수득된 표적 보유 증폭 절편(amplicons)을 직접 서열분석하고, 디제너레이트 시퀀스 디코딩 방법(Degenerate Sequence Decoding method)을 통해 암호를 해독함으로써 분석되었다. 벼는 각각의 유전자를 두 개씩 갖는 이배체이고, 염색체 쌍의 각각의 염색체에 하나가 배치된다. 그러므로, CRISPR/Cas9는 게놈에 삽입되어 기능하기 시작할 때 표적 유전자 xa13/Os8N3 중 하나

또는 두 개가 절단되고 돌연변이화될 수 있어서, 다섯 개의 가능한 유전자형의 형질전환 라인: 동형접합자, 이대립형질, 이형접합체, 키메라 및 야생형(WT)을 생성한다. 네 가지 T₀ 형질전환 라인 중 라인 4A/B에서만 1-bp 삽입(+A)의 하나의 동형접합 돌연변이가 있었고, 다른 라인에서는 표적 서열 변화가 검출될 수 없었다(표 1의 T₀).

[0087] **4. xa13/Os8N3 돌연변이 및 Xoo에 대한 개선된 저항성의 유전**

[0088] OsU6a::xa13m-sgRNA/pHAtC에 의한 xa13/Os8N3의 CRISPR/Cas9 표적화 돌연변이 생성이 다음 세대에 전달되는지 여부 및 과정을 결정하기 위해, 모든 OsU6a xa13m/Kit T₀ 형질전환 식물이 자가 수분되고, 일부 T₁ 형질전환 식물의 표적화 xa13/Os8N3 이 직접 서열분석되고, 분석되었다(도 3b, 표 1). 동형접합 돌연변이 T₀ 라인(4A/B)은 동형접합 돌연변이 T₁ 자손(4A-1, 4B-1 및 4B-2)을 생성하였고, 추가로 다른 돌연변이 생성은 나타내지 않았다. WT 1A/B 및 2A 라인의 서열분석된 T₁ 자손에서는 돌연변이 생성이 관찰되지 않았다. 그러나 새로운 표적화 서열 변화가 WT 3A 라인의 T₁ 자손에서 검출되었다. 이전에, 서열분석 결과는 T₀ 3A 라인에서 표적화 xa13/Os8N3의 추정 WT 유전자형을 지시하는 반면, WT 3A 라인의 다섯 가지 서열분석된 T₁ 자손 중 세 가지(3A-2, 3A-4 및 3A-6)는 1-bp 삽입을 나타내었다(표 1): 3A-2는 동형접합이었고; 3A-4는 이대립형질이었으며; 3A-6은 이형접합을 나타내었다.

[0089] 돌연변이 라인의 세균성 마름병 저항성 표현형을 특징짓기 위해서, 다른 종류의 대립형질 돌연변이 생성을 갖는 T₁ 라인(OsU6a xa13m/Kit 1A/B, 2A, 3A 및 4A/4B의 자손)이 8주 단계에서 PX099와 접종되었다(도 4a). 키타케(Kitaake) 및 Xa21를 갖는 형질전환 키타케(Kitaake)(XA21)는 유비쿼터 프로모터로 촉진되고, PX099의 각각 감수성 및 저항성 대조군으로 사용되었다. 예상되는 바와 같이, XA21 식물은 고저항성이고 짧은 병변을 나타내는 반면, 키타케(Kitaake) 식물의 접종된 잎은 세균성 마름병에서 통상적인 긴 수침상 병변을 발달시켰다. 동형접합(OsU6a xa13m/Kit 3A-2, 4A-1, 4B-1 및 4B-2) 및 이대립형질(3A-4) xa13/Os8N3 돌연변이 식물은 이형접합(3A-6) 돌연변이 및 키타케(Kitaake) 대조군 식물과 비교해서 강한 저항성 표현형을 나타내었다(표 1에서 T₁ 및 도 4a). 투키'스 에이치에스디 시험(Tukey's HSD test)을 사용해서 병변 길이의 정량화 및 의미 분석을 통해 차이점이 추가로 평가되었다(도 4b). 저항성 표현형을 나타내는 동형접합 및 이대립형질 돌연변이 식물은 XA21 식물과 비교해서 병변 길이에서 상당한 차이점이 나타나지는 않았다. 이러한 결과는 동형접합 및 이대립형질 돌연변이 라인이 키타케(Kitaake) 및 이형접합 돌연변이 식물과 상당히 다르고, xa13/Os8N3의 두 가지 대립형질 모두에서 CRISPR/Cas9-매개 돌연변이 생성이 PX099에 대해 강한 저항성을 부여함을 지시하였다.

[0090] 다음 세대로의 표적화 돌연변이의 유전을 추가적으로 조사하기 위해, 몇 개의 OsU6a xa13m/Kit T₂ 식물의 표현형이 분석되고 PX099로 접종되었다. 새로운 대립형질 돌연변이가 WT 1A-5의 T₂ 자손에서 검출되었다. 1A/1B 라인의 서열분석된 모든 T₀ 및 T₁ 세대는 WT xa13/Os8N3를 가지고 있지만, 1A 라인의 T₂ 자손(1A-5-6)은 이형접합 1-bp 삽입(+T) 돌연변이를 나타내었다(표 1). 이형접합 돌연변이 3A-6(+T)는 표적 사이트에서 검출된 세 가지의 뚜렷한 대립형질을 갖는 키메라 3A-6-1을 생산하며, 추가적으로 다른 돌연변이를 나타내었다(+A). 동형접합 T₀ 돌연변이 식물(4A/B)로부터 유래한 모든 T₁ 식물 및 동형접합 T₁ 돌연변이 식물(4A-1 및 4B-2)로부터 유래한 T₂ 식물은 동일한 돌연변이를 위한 동형접합이었다(표 1). 모든 동형접합 돌연변이 라인(4A-1-6, 4A-1-7, 4B-2-3 및 4B-2-5) 및 키메라(3A-6-1)는 이형접합 돌연변이(1A-5-6) 및 키타케(Kitaake) 식물과 비교해서 상당히 짧은 병변 길이(도 5a 및 b) 및 낮은 박테리아 개체수를 나타내었다(도 5c). 이러한 결과는 동형접합 돌연변이 라인의 돌연변이 및 PX099에 대한 개선된 저항성이 다음 세대로 안정적으로 전달된 것을 지시한다.

[0092] **5. xa13/Os8N3 녹아웃 돌연변이(knockout mutants)의 주요 작물학적 특징의 무변화**

[0093] xa13/Os8N3 유전자의 돌연변이가 작물학적 특징에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위해, 두 가지의 독립적인 동형접합 돌연변이 라인(T₃)이 이의 식물 길이, 지엽의 길이/너비, 생산적인 원추꽃차례의 개수 및 원추꽃차례의 길이를 측정하여 분석되었다(표 2). 투키'스 에이치에스디 시험(Tukey's HSD test)은 본 연구의 온실 조건하에서 돌연변이 라인이 키타케(Kitaake)와 상기 조사된 작물학적 특징면에서 상당한 차이점을 나타내지는 않는 것을 지시하였다.

[0094] 이전에, xa13/Os8N3 녹다운(knockdown) 형질전환 식물은 비정상적인 꽃가루 발달을 나타내었다. xa13/Os8N3 녹아웃(knockout) 돌연변이가 꽃가루 발달에 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위해, 이들의 꽃가루

생존도가 녹말의 존재 여부에 근거하여 평가되었다. 키타케(Kitaake) 및 두 가지의 독립적인 동형접합 T₃ 돌연변이 라인(3A-6-1-1 및 4A-1-7-1)의 꽃가루 입자는 아이오딘-아이오딘화칼륨(I₂-KI)으로 염색되었다(도 6a). 어둡게 염색된 꽃가루 입자(검은색)는 생존 가능한 것으로 간주되고, 열게 염색된 것(노란색)은 생존 가능하지 않은 것으로 간주되었다. 동형접합 돌연변이(3A-6-1-1 및 4A-1-7-1)는 본 연구의 온실 조건에서 키타케(Kitaake)와 유사한 꽃가루 생존도를 나타내었다(도 6b).

[0096] 6. 전이유전자가 없는 돌연변이 벼 라인의 선별

[0097] OsU6a::xa13m-sgRNA/pHAtC 구조물의 T-DNA가 없는 xa13/Os8N3의 돌연변이가 존재하는 벼를 선별하기 위해, OsU6a xa13m/Kit T₀, T₁ 및 T₂ 식물의 PCR 및 표현형 분석이 수행되었다. 31가지의 분리 T₁ 식물이 분석되었고, 이 중 6가지(19.35%)가 T-DNA로부터 Cas9-특정 증폭 절편을 생성하지 않았다(도 3b). 유사하게, PCR 분석도 9가지 T₁ 식물(1A-1, 1A-2, 1A-5, 1B-1, 1B-9, 3A-6, 4A-1, 4B-2 및 4B-6)에서 유래된 분리 T₂ 식물 65가지 중 11가지(16.92%)에서 T-DNA를 검출하는데 실패하였다(도 3c). 특히, 4A-1 식물은 소기의 xa13/Os8N3 유전자 부위에 변이가 존재하는 Cas9가 없는 동형접합 돌연변이였다(도 3b 및 도 4). T₁ 돌연변이 식물 4A-1에서 유래된 7가지 T₂ 식물 중 어느 것도 Cas9-특정 증폭 절편을 생성하지 않았다(도 3c). 상기 7개 중 2개(4A-1-6 및 4A-1-7)는 1-bp 삽입(+A)을 보유하고, PX099에 대한 상당히 개선된 저항성을 나타냈으며(도 5), 이는 이의 부모(4A-1)에서도 관찰되었다(도 4). Cas9-특정 증폭 절편을 생성하지 않는 T₃ 식물(4A-1-7-1)은 T₂ 돌연변이 식물 4A-1-7에서 관찰된 것과 동일한 xa13/Os8N3 변이를 보유하고(도 3d). 이러한 결과는 소기의 유전자 변이를 보유하고 T-DNA가 없는 돌연변이 식물이 T₁, T₂ 및 T₃ 세대에서 유전분리를 통해 획득될 수 있다는 것을 확인케 한다.

표 1

[0099]

	Line	Target sequence	Editing	Transgene	Zygosity	Phenotype
	Kitaake	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	No transgene	WT	S
T ₀	1A/B	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	2A	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
	3A	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	4A/B	tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1	Transgenic	Homo	Not available
		tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1			
T ₁	1A-1	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	1A-5	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	1B-1	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	1B-9	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	2A-2	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	3A-2	tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1	No transgene	Homo	R
		tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1			
	3A-3	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	No transgene	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	3A-4	tttCTGTCCATGGCTAACCCCGGcggtcacc	+1	Transgenic	Bi-allele	R
		tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1			
	3A-5	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	Not available
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	3A-6	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	Hetero	S
		tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1			
	4A-1	tttCTGTCCATGGCTAACACGGcggtcacc	+1	No transgene	Homo	R
		tttCTGTCCATGGCTAACACGGcggtcacc	+1			

	4B-1	tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1	Transgenic	Homo	R
		tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1			
	4B-2	tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1	Transgenic	Homo	R
		tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1			
T ₂	1A-5-5	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	1A-5-6	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	Hetero	S
		tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1			
	1B-1-9	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	1B-9-2	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	3A-6-1	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	Chimera	R
		tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1			
		tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1			
	3A-6-3	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	S
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	4A-1-6	tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1	No transgene	Homo	R
		tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1			
	4A-1-7	tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1	No transgene	Homo	R
		tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1			
	4B-2-3	tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1	Transgenic	Homo	R
		tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1			
	4B-2-5	tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1	No transgene	Homo	R
		tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1			
T ₃	1A-5-5-1	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	Not available
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	1A-5-5-3	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	Not available
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	1A-5-5-4	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	Not available
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	1A-5-5-5	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	Not available
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	1A-5-5-6	tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT	Transgenic	WT	Not available
		tttCTGTCCATGGCTAACC—CGGcggtcacc	WT			
	3A-6-1-1	tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1	Transgenic	Homo	Not available
		tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1			
	3A-6-1-2	tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1	Transgenic	Homo	Not available
		tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1			
	3A-6-1-3	tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1	Transgenic	Homo	Not available
		tttCTGTCCATGGCTAACCTCGGcggtcacc	+1			
	4A-1-7-1	tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1	No transgene	Homo	Not available
		tttCTGTCCATGGCTAACCACGGcggtcacc	+1			

[0100]

OsU6a xa13m/Kit 형질전환 식물의 T₀, T₁, T₂, 및 T₃의 CRISPR/Cas9-매개 표적 돌연변이 생성의 전달 및 분리. OsU6a xa13m/Kit 형질전환 식물의 xa13/Os8N3 유전자의 회복된 돌연변이 대립형질이 키타케(Kitaake) 염기서열 아래에 도시된다. 표적 사이트에서의 뉴클레오티드 서열은 검은색 대문자 및 검은색 대시 기호로 도시된다. PAM 모티프는 밑줄로 표시된다. 빨간색 대문자는 삽입된 뉴클레오티드를 지시한다. 돌연변이의 유전자형은 각각의 서열의 오른쪽에 지시된다. WT는 키타케(Kitaake) 식물의 xa13/Os8N3 유전자와 동일한 뉴클레오티드 서열을 지시한다. "+"는 지시된 수만큼의 뉴클레오티드의 삽입을 나타낸다. 전이유전자 아님: Cas9에 대해 PCR 음성; 형질전환: Cas9에 대해 PCR 양성; S: PX099에 대해 감수성; R: PX099에 대해 저항성; Not available: 접종 데이터 입수가 불가능함.

표 2

[0101]

	Plant height (cm)	Flag leaf length (cm)	Flag leaf width (mm)	No. of productive panicles	Panicle length (cm)
Kitaake	69.8±4.1 ^a	27.8±4.9 ^a	11.7±0.9 ^a	3.0±0.0 ^a	11.1±2.1 ^a
Progeny of 3A-6-1	65.6±6.4 ^a	26.9±4.0 ^a	12.7±0.5 ^a	3.0±0.0 ^a	12.1±1.4 ^a
Progeny of 4A-1-7	65.7±7.9 ^a	29.1±4.8 ^a	12.0±0.4 ^a	2.5±1.1 ^a	12.0±2.2 ^a

[0102]

T₃ 돌연변이 라인의 작물학적 특징의 분석으로서, 각각의 돌연변이 라인의 세 개 이상의 동형접합 돌연변이로부 터의 결과가 기재되고, 평균±SE로 표시된다. 동일한 문자(^a)로 표시된 수치는 크게 다르지 않는다(P < 0.050, 투키's 에이치에스디 시험, Tukey's HSD test).

도면

도면1a

```

TATGAGAGCTCCAGCTCTCCAATGGCAACAGACACACTGAGTGGTCATACGTGT CATAT 600
TATGAGAGCTCCAGCTCTCCAATGGCAACAGACACACTGAGTGGTCATACGTGT CATAT 600

TGCCCTCAGTTATGCATT CATATGACCA CATATT CAGAGTAGTGGAGAGGGGACA GAT 660
TGCCCTCAGTTATGCATT CATATGACCA CATATT CAGAGTAGTGGAGAGGGGACA GAT 660

CTAGAGGTAGAAAAAGAAAATTCATATAAATGATATATCAGAGTGAAAAAGAAATATCAA 720
CTAGAGGTAGAAAAAGAAAATTCATATAAATGATATATCAGAGTGAAAAAGAAATATCAA 720

GCACAAGAAAAAAGCAAAAGGTTAGATATGCATCTCCCCTACTGTACCAACCAAAAG 780
GCACAAGAAAAAAGCAAAAGGTTAGATATGCATCTCCCCTACTGTACCAACCAAAAG 780

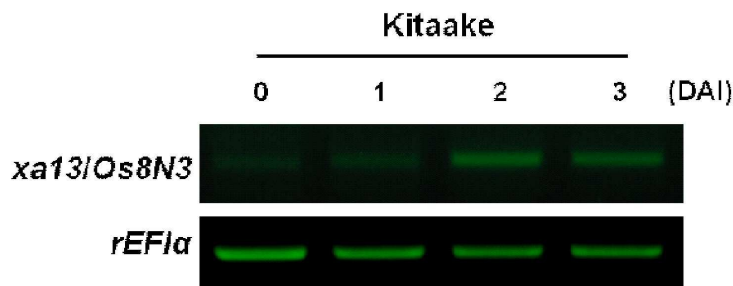
TGGAGGGTCTCCA ACTATATAAACA CTGAGCCATGGCCAAGGCCAAACCA CATGCA GT 840
TGGAGGGTCTCCA ACTATATAAACA CTGAGCCATGGCCAAGGCCAAACCA CATGCA GT 840

TGTAGTAGCACTTAAGCCTTCTCTCTAGCTAGCATCTCTTGTGT CAGGAAGTTGGAAGG 900
TGTAGTAGCACTTAAGCCTTCTCTCTAGCTAGCATCTCTTGTGT CAGGAAGTTGGAAGG 900

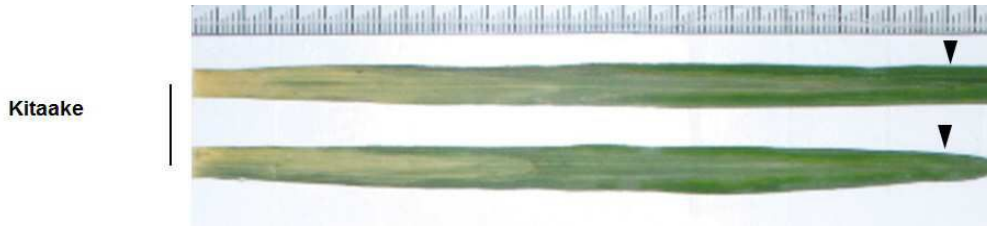
GATTTCTGGCTAGTTTCTAGCTGGTGTCTCCTCTCCTCTTCTAACCTTCTCACTGATTA 960
GATTTCTGGCTAGTTTCTAGCTGGTGTCTCCTCTCCTCTTCTAACCTTCTCACTGATTA 960

ACACCTTAGAGTTAGTTAATAACCTT CATCACCAGTAGCAATG 1003
ACACCTTAGAGTTAGTTAATAACCTT CATCACCAGTAGCAATG 1003
    
```

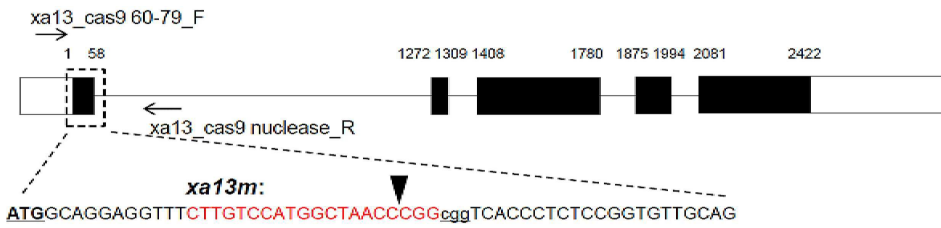
도면1b



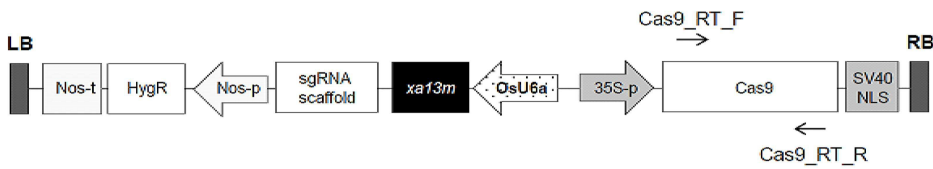
도면1c



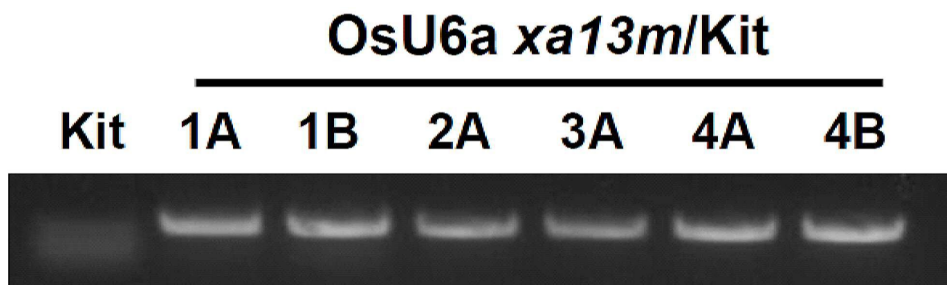
도면2a



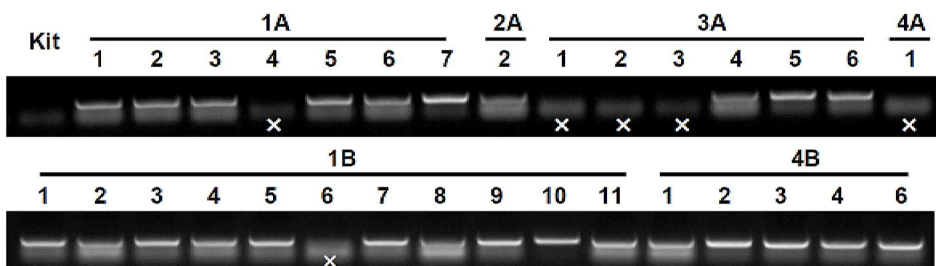
도면2b



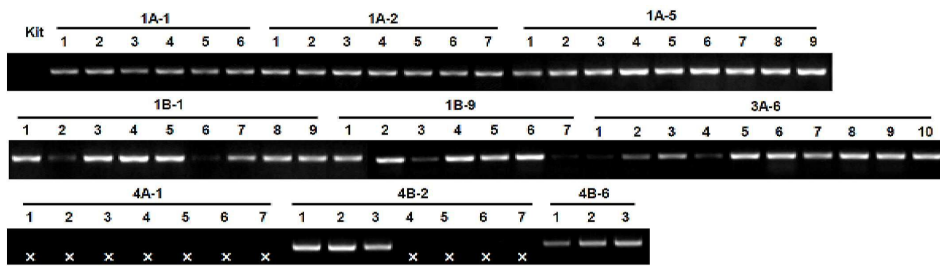
도면3a



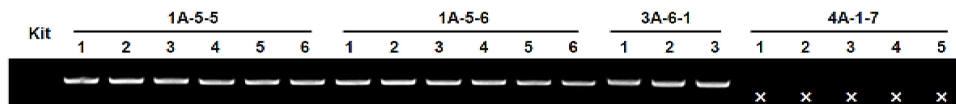
도면3b



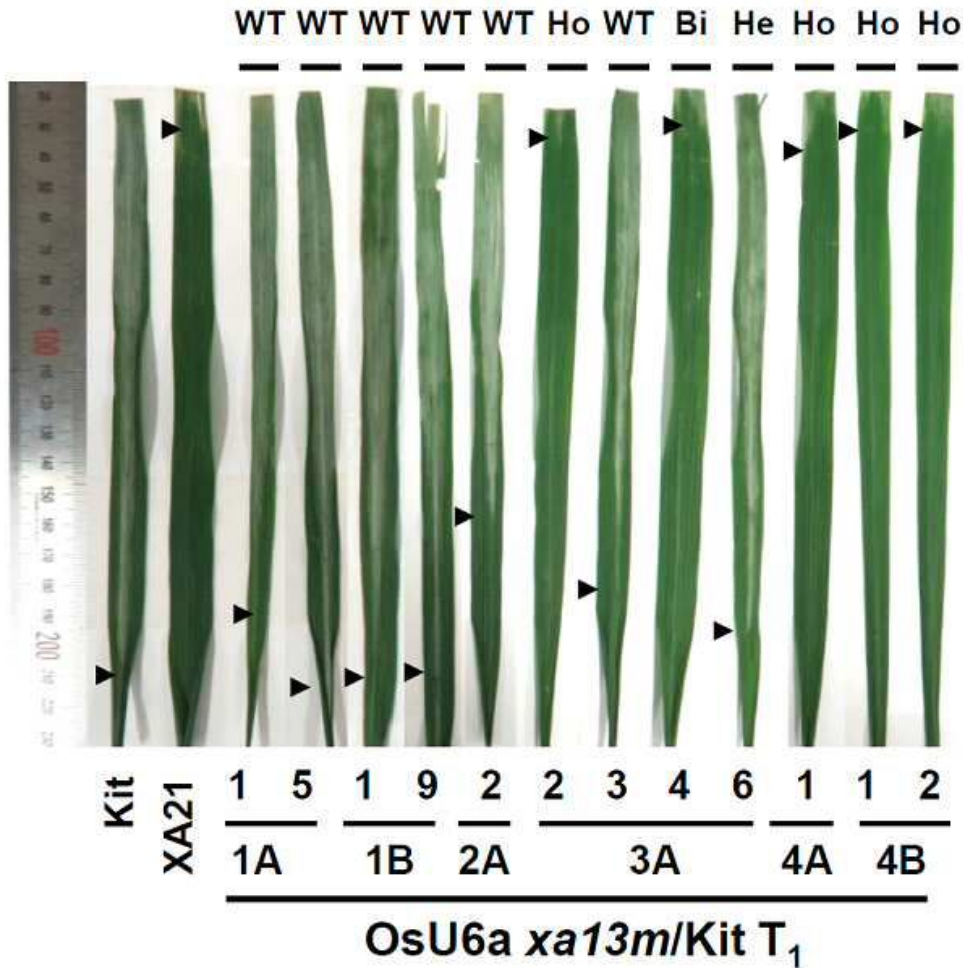
도면3c



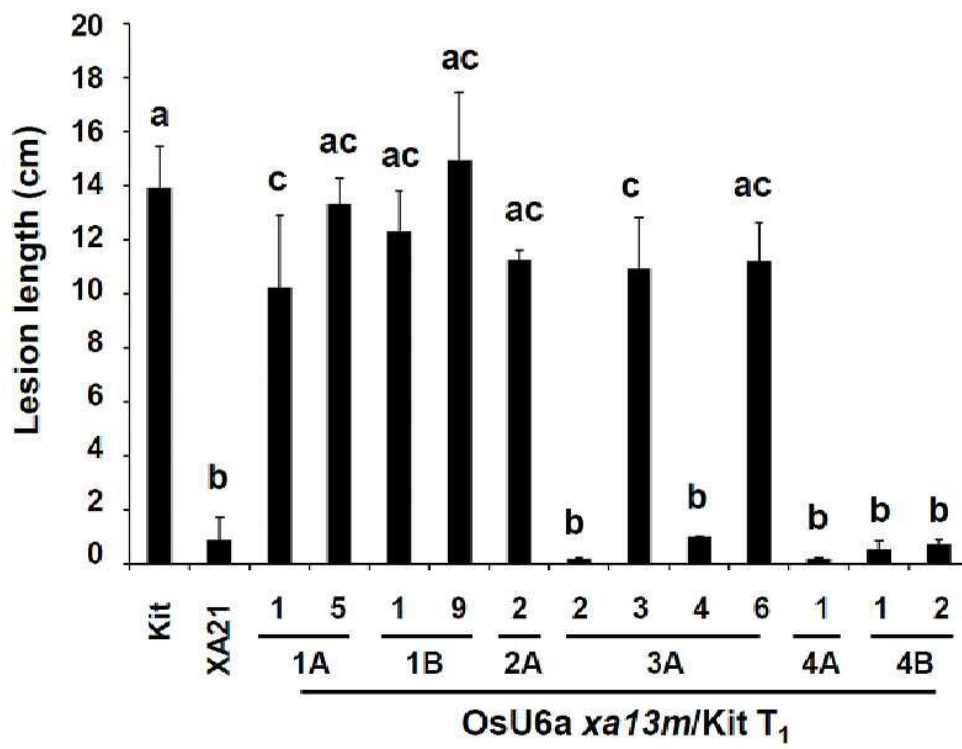
도면3d



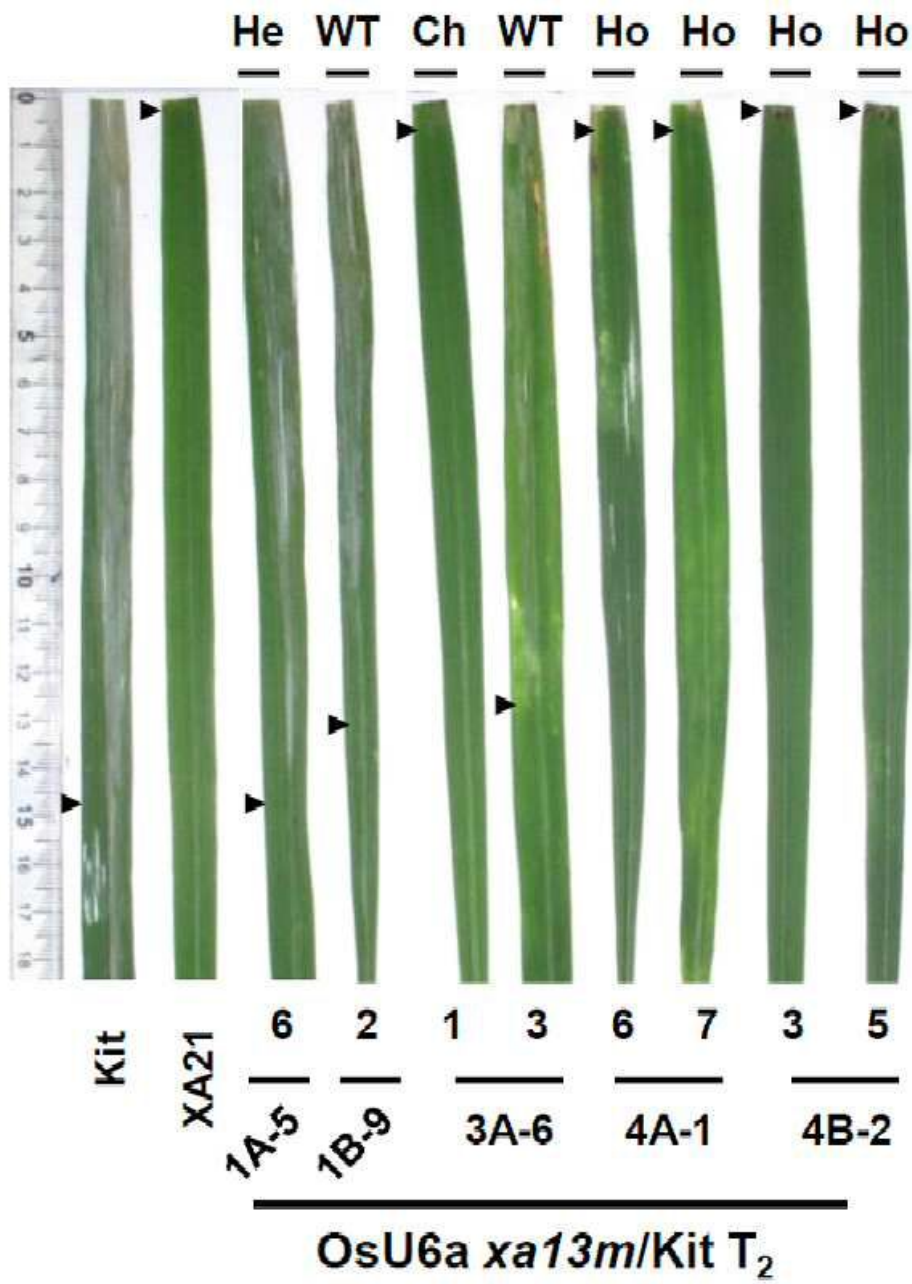
도면4a



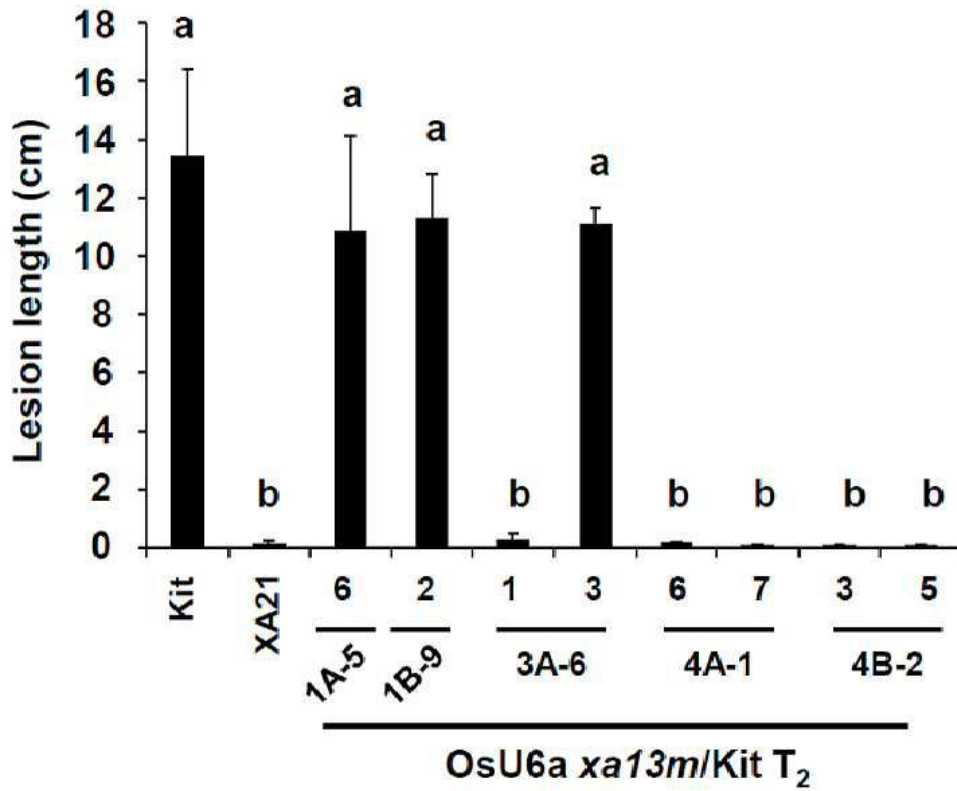
도면4b



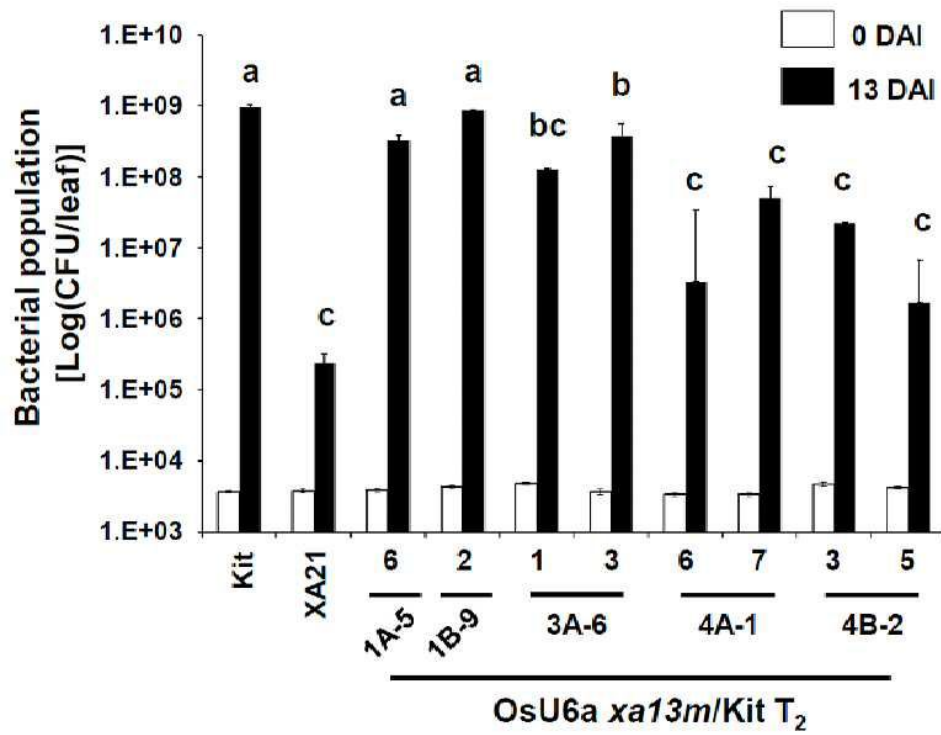
도면5a



도면5b

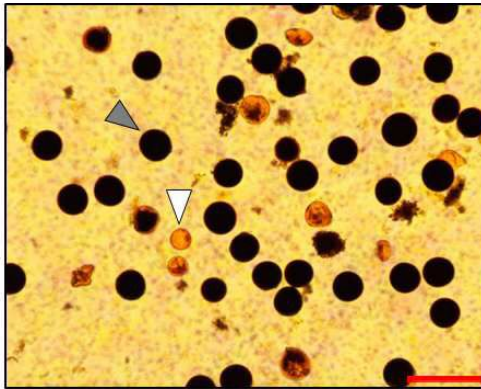


도면5c

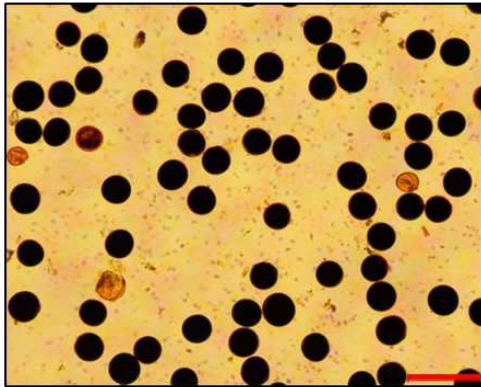


도면6a

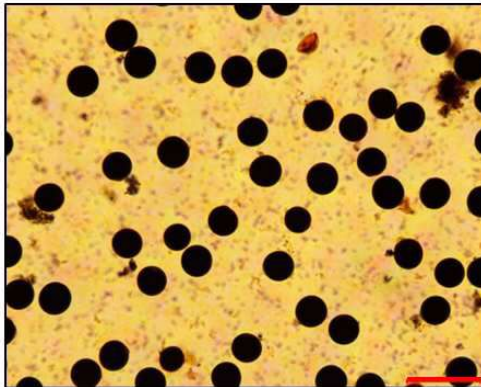
Kitaake



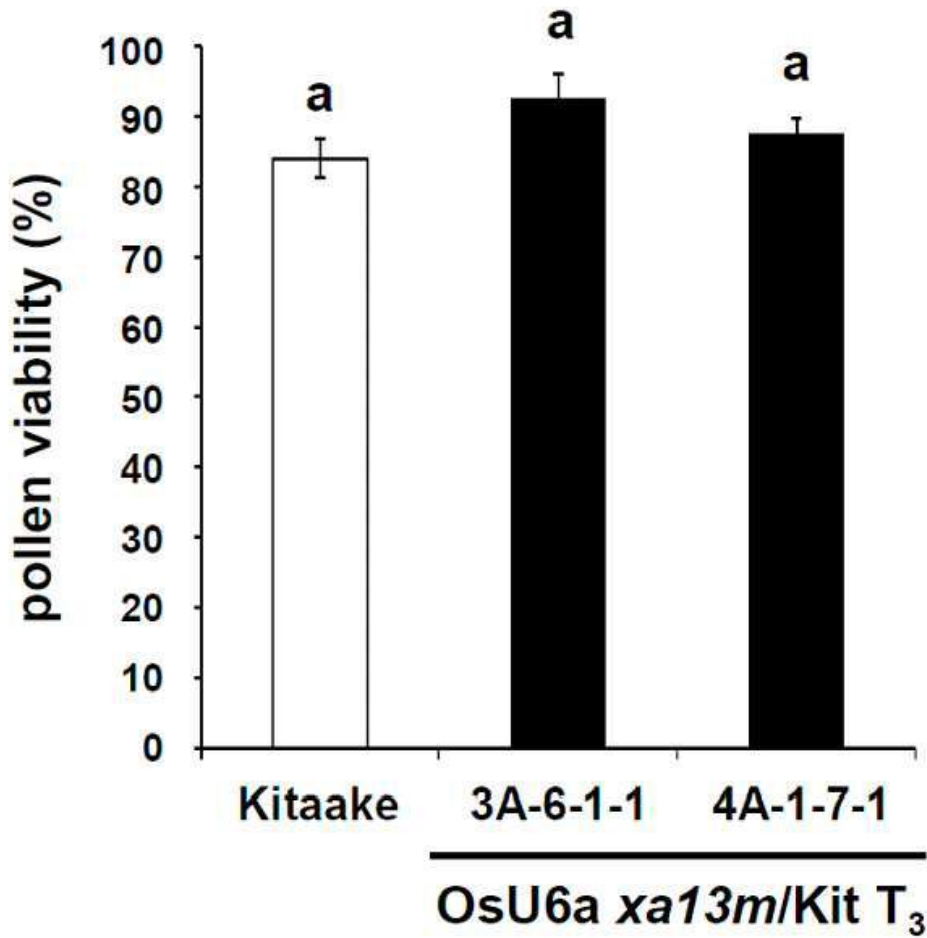
Homo:
3A-6-1-1



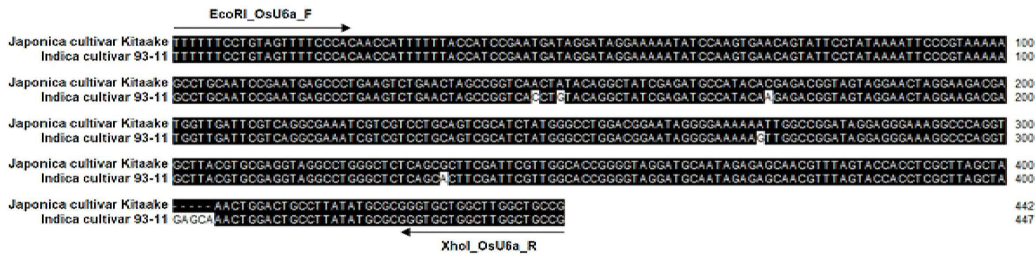
Homo:
4A-1-7-1



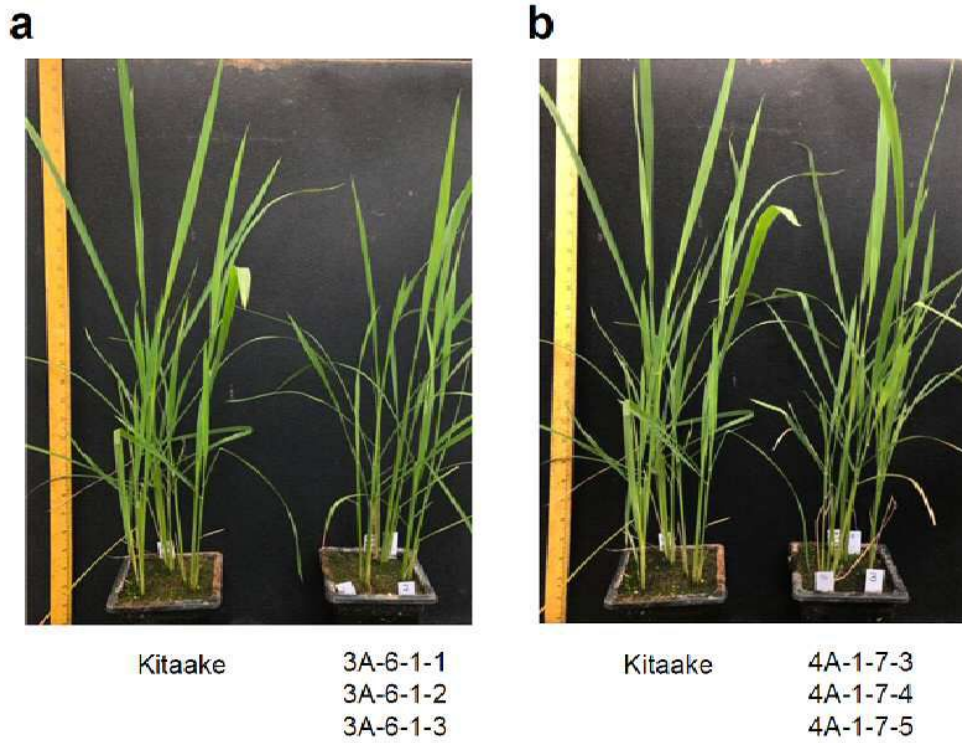
도면6b



도면7



도면8



서열 목록

<110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION

<120> Composition for enhancing resistance to Xanthomonas oryzae pv.
 oryzae in rice plant

<130> 19P03009

<160> 16

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sgRNA transcription template sequence

<400> 1

cttgtccatg gctaaccggg

20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1 base inserted sequence
 <400> 2
 cttgtccatg gctaaccacg g 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1 base inserted sequence
 <400> 3
 cttgtccatg gctaacctcg g 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1 base inserted sequence
 <400> 4
 cttgtccatg gctaaccgcg g 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1 base inserted sequence
 <400> 5
 cttgtccatg gtaaccccg g 21
 <210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EcoRI_0sU6a_F primer sequence
 <400> 6
 ggaattcttt tttcctgtag ttttccac 29
 <210> 7
 <211> 43
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> XhoI_OsU6a_R primer sequence

<400> 7
 gctcgagaca cctgcctcca atccggcagc caagccagca ccc 43

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence for inserting sgRNA transcription template

<400> 8
 gattgcttgt ccatggctaa cccgg 25

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence for inserting sgRNA transcription template

<400> 9
 aaaccgggt tagccatgga caagc 25

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cas9 specific primer

<400> 10
 cgagctgacc aaggtgaagt 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cas9 specific primer

<400> 11
 cgttgataag cttgcggtc 20

<210> 12

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rEF1a1048F primer sequence

 <400> 12
 actgccacac ctcccacatt g 21
 <210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rEF1a1048F primer sequence
 <400> 13
 caacagtcga agggcaataa taagtc 26
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> xa13_cas9 60-79_F primer sequence
 <400> 14
 tctggctagt ttctagctgg 20

 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> xa13_cas9 nuclease_R primer sequence
 <400> 15
 tgcattgagct gaagctaggg 20
 <210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PthXo1 EBE sequence
 <400> 16

tgcatctccc cctactgtac accac

25