



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0103433
(43) 공개일자 2018년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/8237 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0030375
(22) 출원일자 2017년03월10일
심사청구일자 2017년03월10일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이상열
경상남도 진주시 진주대로 829번길 21 삼환나우빌
101동 1801호
가네스 엠. 나우카르
경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

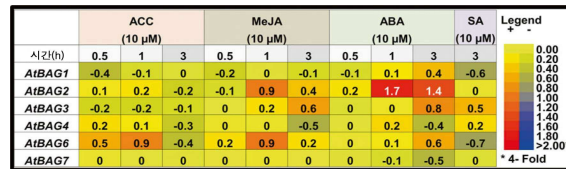
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 아라비돕시스 식물체 내에서 스트레스에 응답하여 발현되는 아라비돕시스 BAG 유전자

(57) 요약

본 발명은 아라비돕시스 식물체 내에서 생물학적 또는 비생물학적 외부 스트레스에 응답하여 발현되는 아라비돕시스 BAG(BCL-2 athanogene) 유전자에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 본 발명은 3개의 α 헬릭스를 지니고 110~130개의 아미노산 잔기로 구성된 BAG 도메인을 지니고, 열 충격 단백질 70(Hsp70) 또는 열 충격 단백질 70의 유사단백질(Hsc70)의 ATPase 도메인과 상호 작용하는 공동-샤페론 기능을 지닌 아라비돕시스 BAG 단백질을 코딩화하는 아라비돕시스 BAG 유전자의 아라비돕시스 식물체 내에서의 스트레스에 대한 발현 프로파일에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/8273 (2013.01)

강창호

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교

(72) 발명자

박정훈

대구광역시 동구 신암로16길 33 신천가람타운 104
동 809호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-0749

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 (3차년도) 식물 소포체스트레스 관련 인자의 탐색 및 기능연구

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-0094

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 시스템합성농생명공학사업단

연구사업명 차세대바이오그린사업

연구과제명 (1차년도) 시스템합성생물학기법이용 바이오소재 생산 시스템 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.02 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

3개의 α 헬릭스를 지니고 110~130개의 아미노산 잔기로 구성된 BAG 도메인을 지니고, 열 충격 단백질 70(Hsp70) 또는 열 충격 단백질 70의 유사단백질(Hsc70)의 ATPase 도메인과 상호 작용하는 공동-샤페론 기능을 지닌 아라비도시스 BAG(BCL-2 athanogene) 단백질을 코드화시킨 아라비도시스 BAG 유전자에 있어서,

상기 아라비도시스 BAG 유전자는 AtBAG1(서열번호: 1), AtBAG2(서열번호: 2), AtBAG3(서열번호: 3), AtBAG4(서열번호: 4), AtBAG5(서열번호: 5), AtBAG6(서열번호: 6) 및 AtBAG7(서열번호: 7) 유전자로 분류되고, 각각의 AtBAG 유전자는 아라비도시스 식물체 내에서 병원체 또는 비생물학적 스트레스에 응답하여 BAG 유전자 업스트림 프로모터 영역 내의 스트레스 응답 조절요소를 통해 아라비도시스 BAG 단백질을 다양한 양상으로 발현시킴을 특징으로 하는 아라비도시스 BAG 유전자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 AtBAG1 유전자는 DRE 모티프(서열번호: 8), MYC 모티프(서열번호: 9), MYB1 모티프(서열번호: 10), MYB 코어(서열번호: 11) 및 HSE 모티프(서열번호: 12)를 지니고, 아라비도시스 식물체 내에서 추위에 응답하여 슈트에서 미량 유도되며 열과 염분 스트레스에 응답하여 슈트 및 뿌리 모두에서 약간 감소됨을 특징으로 하는 아라비도시스 BAG 유전자.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 AtBAG2 유전자는 ABRE 모티프(서열번호: 13), DRE 모티프(서열번호: 8), MYC 모티프(서열번호: 9) 및 MYB 코어(서열번호: 11)를 지니고, 아라비도시스 식물체 내에서 앱시스산(ABA)에 응답하여 유도되고 염분에 응답하여 뿌리에서 유도되나 추위 및 열에 응답하여 슈트 및 뿌리 모두에서 감소됨을 특징으로 하는 아라비도시스 BAG 유전자.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 AtBAG3 유전자는 TCA 조절요소(서열번호: 14), MYC 모티프(서열번호: 9), MYB 코어(서열번호: 11), MYB1 모티프(서열번호: 10)를 지니고, 아라비도시스 식물체 내에서 앱시스산(ABA) 및 살리실산(SA)에 응답하여 미량 유도되고 염분에 응답하여 유도되며 추위에 응답하여 슈트 및 뿌리에서 감소됨을 특징으로 하는 아라비도시스 BAG 유전자.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 AtBAG4 유전자는 DRE 모티프(서열번호: 8), MYB 코어(서열번호: 11), MYB1 모티프(서열번호: 10), MYC 모티프(서열번호: 9)를 지니고, 아라비도시스 식물체 내에서 추위에 응답하여 뿌리에서 감소되며 염분 및 열에 응답하여 뿌리에서 유도됨을 특징으로 하는 아라비도시스 BAG 유전자.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 AtBAG5 유전자는 DRE 모티프(서열번호: 8), HSE 모티프(서열번호: 15)를 지니고, 아라비도시스 식물체 내에서 열에 응답하여 슈트 및 뿌리에서 유도되고 추위에 응답하여 감소함을 특징으로 하는 아라비도시스 BAG 유전자.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 AtBAG6 유전자는 TGACG 모티프(서열번호: 16), HSE 모티프(서열번호: 17)를 지니고, 아라비돕시스 식물체 내에서 살리실산(SA)에 응답하여 과량 유도되고 메틸 자스몬산(MeJA)에 응답하여 소량 유도되며 열에 응답하여 슈트 및 뿌리에서 유도됨을 특징으로 하는 아라비돕시스 BAG 유전자.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 AtBAG7 유전자는 ERE 모티프(서열번호: 18), TGACG 모티프(서열번호: 16)를 지니고, 아라비돕시스 식물체 내에서 1-아미노시클로프로판-1-카르복실산(ACC) 및 메틸 자스몬산(MeJA)에 응답하여 미량 유도됨을 특징으로 하는 아라비돕시스 BAG 유전자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아라비돕시스 식물체 내에서 생물학적 또는 비생물학적 외부 스트레스에 응답하여 발현되는 아라비돕시스 BAG(BCL-2 athanogene) 유전자에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 본 발명은 3개의 α 헬릭스를 지니고 110~130개의 아미노산 잔기로 구성된 BAG 도메인을 지니고, 열 충격 단백질 70(Hsp70) 또는 열 충격 단백질 70의 유사단백질(Hsc70)의 ATPase 도메인과 상호 작용하는 공동-샤페론 기능을 지닌 아라비돕시스 BAG 단백질을 코드화하는 아라비돕시스 BAG 유전자의 아라비돕시스 식물체 내에서의 스트레스에 대한 발현 프로파일에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 모든 진핵세포는 세포예정사(PCD)로 알려진 유전적으로 조절된 자체 파괴 메커니즘을 지니고 있으며 이는 정상적인 발달 및 스트레스 반응에 반드시 필요한 것이다. 동물에서와 같이 PCD는 식물체의 정상적인 성장 및 발달에 필요할 뿐만 아니라 더위, 추위, 염분 및 UV 조사와 같은 비생물학적 스트레스 및 병원체에 대한 과민감 반응(HR)과 같은 생물학적 스트레스에 저항하는데 반드시 필요한 것이다. 식물체는 동물과 같이 잘 보존된 PCD 메커니즘을 지니며 이는 Bax 저해제-1(BI-1), 아라비돕시스 IAP-유사 단백질(At ILP) 및 BAG족 단백질들로 이행되는 것이다.

[0003] BAG족 단백질은 효모, 동물 및 식물체에 걸쳐 잘 보존되어 있다. BAG족 단백질의 첫 번째 멤버는 인간 BCL-2와 상호작용하는 마우스 배아세포의 상보적 DNA(cDNA) 라이브러리로부터 유래된 단백질임을 특징으로 한다. 아라비돕시스 내에는 7개의 BAG족 단백질 멤버가 프로파일 시퀀스(Pfam) 및 프로파일-프로파일(FFAS) 알고리즘과 같은 바이오인포메틱스 도구를 통해 확인되었다.

[0004] 포유류 BAG 단백질과 유사하게 아라비돕시스 BAG족 단백질 멤버는 110 내지 130개의 보존된 아미노산 잔기를 지닌 C-말단 BAG 도메인(BD)의 존재를 특징으로 한다. BAG 도메인은 30 내지 40개의 아미노산 잔기로 된 3개의 α 헬릭스로 구성되어 있으며 두 번째 및 세 번째 헬릭스는 열 충격 단백질 70(Hsp70) 또는 열 충격 단백질 70의 유사단백질(Hsc 70) 샤페론의 ATPase 도메인과 직접 상호작용에 의해 공동-샤페론 활성을 매개시키는데 중요한 역할을 하는 것이다.

[0005] 아라비돕시스 BAG 1~4 단백질은 N말단 유비퀴틴 유사(UBL) 도메인을 지니는 특징으로 하고 아라비돕시스 BAG5-7 단백질은 BD 인근에 칼모둘린-결합 모티프를 지니는 특징으로 한다. 아라비돕시스 BAG 유전자에 관한 정보가 제한되어 있지만 최근의 발견은 이들 유전자가 발달 및 환경 스트레스에 관련된 다양한 프로세스 내에서 공동-샤페론으로 작용함을 암시하고 있다.

[0006] 7개의 아라비돕시스 BAG족 단백질 멤버 중 AtBAG4 및 AtBAG6가 추위, 더위, 자외선, 병원체 공격에 반응하고 또한 변성 단백질 반응(UPR)에 반응하는 것으로 여겨진다. 동물 BAG 단백질과 유사하게 Hsp70 단백질의 농도와 관련된 세포 내 식물 BAG 단백질의 농도가 최적의 샤페론 활성화에 결정적이다. BAG 단백질의 농도가 높아질수록 ATP 가수분해 사이클을 변화시켜 Hsp70에 의한 재접힘 활성을 저해한다. 또한 스트레스 조건하에서 Hsp70 및 Hsc70에 의한 재접힘 활성화는 세포의 생존에 매우 중요한 것이고 따라서 이들 단백질의 양은 매우 정교하게 조절되어야 하는 것이다.

[0007] 아라비돕시스 내의 BAG 유전자의 조절 메커니즘을 이해하기 위해서 본 발명자들은 비생물학적 스트레스, 호르몬 처리 및 병원체 공격에 응답하는 다양한 조직 내에서 모든 아라비돕시스 BAG 유전자의 전사체량 수준을 측정하였다. 또한 본 발명자들은 활용 가능한 마이크로어레이 데이터베이스로부터 얻어진 과거 연구의 정보를 사용하여 컴퓨터 모의분석을 수행하였다.

[0008] 본 발명자들은 모든 아라비돕시스 BAG족 단백질 유전자들의 업스트림 1-kbp 영역에 존재하는 시스 조절 요소를 분석하고 이들의 결과를 컴퓨터 모의실험 결과와 연관시켜 분석하였다. 이러한 결과를 확인하기 위해 특정 호르몬 처리 및 비생물학적 스트레스 조건하에서 qRT-PCR 분석을 수행하였다. 이에 따라 본 발명자들은 조직학적 염색 및 정량적 형광 β -글루쿠로니다아제(GUS) 레포터 에세이를 통해 열 충격하에서 AtBAG6 유전자의 발현이 유도됨을 확인하였다. 또한 기본 열저항성 시험 및 전해액 누출 실험을 통해 식물체 내의 열 스트레스 저항성을 부여하기 위한 AtBAG6 유전자 발현의 필요성을 확인하였다.

[0009] 따라서 본 발명자들은 아라비돕시스 BAG 유전자의 외부 환경 스트레스에 반응하는 발현 프로파일을 확인하고 이에 따라 아라비돕시스 BAG 유전자 1~7의 프로모터 내 활성 모티프를 확인하고 외부 환경 스트레스에 응답하는 BAG 유전자 1~7의 발현 프로파일을 비교 분석함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 아라비돕시스 BAG 유전자의 외부 환경 스트레스에 응답하는 발현 프로파일을 확인하고 이에 따라 아라비돕시스 BAG 유전자 1~7의 프로모터 내 활성 모티프를 확인하고 외부 환경 스트레스에 응답하는 BAG 유전자 1~7의 발현 프로파일을 비교 분석코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 목적은 3개의 α 헬릭스를 지니고 110~130개의 아미노산 잔기로 구성된 BAG 도메인을 지니고, 열 충격 단백질 70(Hsp70) 또는 열 충격 단백질 70의 유사단백질(Hsc70)의 ATPase 도메인과 상호 작용하는 공동-샤페론 기능을 지닌 아라비돕시스 BAG(BCL-2 athanogene) 단백질을 코드화시킨 아라비돕시스 BAG 유전자에 있어서, 상기 아라비돕시스 BAG 유전자는 AtBAG1(서열번호: 1), AtBAG2(서열번호: 2), AtBAG3(서열번호: 3), AtBAG4(서열번호: 4), AtBAG5(서열번호: 5), AtBAG6(서열번호: 6) 및 AtBAG7(서열번호: 7) 유전자로 분류되고, 각각의 AtBAG 유전자는 아라비돕시스 식물체 내에서 병원체 또는 비생물학적 스트레스에 응답하여 BAG 유전자 업스트림 프로모터 영역 내의 스트레스 응답 조절 요소를 통해 아라비돕시스 BAG 단백질을 다양한 양상으로 발현시킴을 특징으로 하는 아라비돕시스 BAG 유전자를 제공하는 것이다.

[0012] 이때 상기 AtBAG1 유전자는 DRE 모티프(서열번호: 8), MYC 모티프(서열번호: 9), MYB1 모티프(서열번호: 10), MYB 코어(서열번호: 11) 및 HSE 모티프(서열번호: 12)를 지니고, 아라비돕시스 식물체 내에서 추위에 응답하여 슈트에서 미량 유도되며 열과 염분 스트레스에 응답하여 슈트 및 뿌리 모두에서 약간 감소됨을 특징으로 한다.

- [0013] 또한 상기 AtBAG2 유전자는 ABRE 모티프(서열번호: 13), DRE 모티프(서열번호: 8), MYC 모티프(서열번호: 9) 및 MYB 코어(서열번호: 11)를 지니고, 아라비도시스 식물체 내에서 앱시스산(ABA)에 응답하여 유도되고 염분에 응답하여 뿌리에서 유도되나 추위 및 열에 응답하여 슈트 및 뿌리 모두에서 감소됨을 특징으로 한다.
- [0014] 한편 상기 AtBAG3 유전자는 TCA 조절요소(서열번호: 14), MYC 모티프(서열번호: 9), MYB 코어(서열번호: 11), MYB1 모티프(서열번호: 10)를 지니고, 아라비도시스 식물체 내에서 앱시스산(ABA) 및 살리실산(SA)에 응답하여 미량 유도되고 염분에 응답하여 유도되며 추위에 응답하여 슈트 및 뿌리에서 감소됨을 특징으로 한다.
- [0015] 또한 상기 AtBAG4 유전자는 DRE 모티프(서열번호: 8), MYB 코어(서열번호: 11), MYB1 모티프(서열번호: 10), MYC 모티프(서열번호: 9)를 지니고, 아라비도시스 식물체 내에서 추위에 응답하여 뿌리에서 감소되며 염분 및 열에 응답하여 뿌리에서 유도됨을 특징으로 한다.
- [0016] 한편 상기 AtBAG5 유전자는 DRE 모티프(서열번호: 8), HSE 모티프(서열번호: 15)를 지니고, 아라비도시스 식물체 내에서 열에 응답하여 슈트 및 뿌리에서 유도되고 추위에 응답하여 감소함을 특징으로 한다.
- [0017] 또한 상기 AtBAG6 유전자는 TGACG 모티프(서열번호: 16), HSE 모티프(서열번호: 17)를 지니고, 아라비도시스 식물체 내에서 살리실산(SA)에 응답하여 과량 유도되고 메틸 자스몬산(MeJA)에 응답하여 소량 유도되며 열에 응답하여 슈트 및 뿌리에서 유도됨을 특징으로 한다.
- [0018] 한편 상기 AtBAG7 유전자는 ERE 모티프(서열번호: 18), TGACG 모티프(서열번호: 16)를 지니고, 아라비도시스 식물체 내에서 1-아미노시클로프로판-1-카르복실산(ACC) 및 메틸 자스몬산(MeJA)에 응답하여 미량 유도됨을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명의 효과는 아라비도시스 BAG 유전자의 외부 환경 스트레스에 응답하는 발현 프로파일을 제공하고 이에 따라 아라비도시스 BAG 유전자 1~7의 프로모터 내 활성 모티프를 확인하고 외부 환경 스트레스에 응답하는 BAG 유전자 1~7의 발현 프로파일을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 환경 스트레스와 관련된 호르몬 처리에 응답하는 아라비도시스 BAG 유전자의 발현을 나타낸 것이다.
- BAR 발현 브라우저의 수치는 테이블 내의 log₂-전환 비율(처리/대조)로 나타내었다. 오른쪽에 색상 스케일을 나타내었다. ACC 1은 아미노시클로프로판-1-카르복실산을 의미한다. MeJA는 메틸 자스몬산을 의미한다. ABA는 앱시스산을 의미한다. SA는 살리실산을 의미한다.
- 도 2는 엘리시터와 병원체에 응답하는 아라비도시스 BAG 유전자의 발현을 나타낸 것이다.
- (a) 엘리시터에 대한 응답 (화학적 엘리시터, CaCl₂, 박테리아 유도 엘리시터, 플라젤린 2(Flg2), 헤어핀 Z(HrpZ), 리포폴리사카라이드(LPS), 진균 엘리시터, 사멸 유도 파이토프토라 단백질 1(NPP1)).
- (b) 병원체에 대한 응답 (독성(Pseudomonas syringae pv tomato DC3000), 비독성(P. syringae ES4326/avrRpt2), 및 비-숙주(P. syringae pv phaseolicola) 박테리아; 생물영양성(Erysiphe orontii), 헤미생물영양성(Phytophthora infestans) 및 사체영양성(Botrytis cinerea) 진균.

수치는 테이블 내의 log2-전환 비율(처리/대조)로 나타내었다. 오른쪽에 색상 스케일을 나타내었다.

도 3은 비생물학적 스트레스에 응답하는 아라비도시스 BAG 유전자의 발현을 나타낸 것이다.

수치는 테이블 내의 log2-전환 비율(처리/대조)로 나타내었다. 오른쪽에 색상 스케일을 나타내었다. S는 슈트 조직을 나타내며 R은 뿌리 조직을 나타낸다.

도 4는 qRT-PCR을 통한 다양한 호르몬 처리하에서 아라비도시스 BAG 유전자의 풍부한 상대 전사체를 나타내는 것이다.

10일령 묘목을 10 μ M 앱시스산(ABA), 10 μ M 1-아미노시클로프로판 -1-카복실산(ACC), 10 μ M 메틸 자스몬산(MeJA) 및 0.5 mM 살리실산(SA)으로 보충시킨 액상 1/2 MS 배지로 이송시킨다. 시료를 총 RNA 분리를 위해 1시간 및 3시간에 수확하였다. AtBAG 유전자의 발현을 qRT-PCR로 측정하였다. 3개의 생물학적 전사체를 평균하였다. 에러 바는 평균의 표준 에러를 나타낸다.

도 5는 qRT-PCR을 통한 다양한 스트레스 조건하에서 아라비도시스 BAG 유전자의 풍부한 상대 전사체를 나타내는 것이다.

18일령 묘목을 액상 1/2 MS 배지로 이송시킨다. 4°C(추위) 또는 37°C(더위) 또는 250mM 만니톨(삼투압 스트레스) 또는 250mM NaCl(고염분)로 처리하여 12시간 인큐베이션시킨다. 슈트와 뿌리 시료를 총 RNA 분리를 위해 채취하였다. AtBAG 유전자의 발현을 qRT-PCR로 측정하였다. 세 번의 생물학적 반복실험을 통해 확인된 전사체량을 평균하였다. 에러 바는 평균의 표준 에러를 나타낸다.

도 6은 PATBAG6:GUS 활성을 시각화한 것이다.

(a) 일반 성장 조건 (22°C) 및 열 스트레스(37°C) 후에 P35S:GUS 및 PATBAG6:GUS 라인의 조직화학적 분석이다. 적어도 3개의 독립적 형질전환 식물체를 각각의 분석에 사용하였다. 바는 5mm를 나타낸다.

(b) 일반 성장 조건 (22°C) 및 열 스트레스(37°C) 후에 P35S:GUS 및 PATBAG6:GUS 라인의 정량 형광 GUS 활성 분석이다. 세 번의 생물학적 반복실험을 통해 확인된 전사체량을 평균하였다. 에러 바는 표준편차(S.D.)를 나타낸다.

도 7은 Col-0, atbag6, atbag7 및 hot1의 기저 열저항성 응답을 나타낸다.

(a) ATBAG6(상부 패널) 및 ATBAG7(하부 패널)의 예측 유전자 구조를 나타내는 개략도이다. 검은색 화살표는 시작 코돈 ATG(검은색 박스의 엑손, 수평 검은 선의 인트론, 양 말단의 검은 박스의 5' 및 3' UTR)를 나타낸다. T-DNA 삽입 부위는 검은색 화살표 끝머리로 표시하였다. 파른색 화살표는 제노타이핑을 위한 프라이머 위치를 나타낸다.

(b) T-DNA 삽입 라인 atbag6 및 atbag7을 a에 나타난 나타난 프라이머 쌍을 이용하여 발현시켰다.

(c) Col-0, atbag6, atbag7 및 hot1을 이용한 시험의 기저 열 저항성을 나타낸다. 일반 성장 조건(22°C)하에서 5일간 성장시킨 식물체, 이 기간 내에 열 충격(45°C)을 가하고 1주일 이상 회복시킨 개체 사진을 나타낸다. 25분 및 30분간 열 처리시킨 식물체의 생존률(퍼센트, 평균 $\pm$ SD)을 이미지 하단에 나타난 바와 같이 세 번 독립 실험하여 수득하였다.

(d) 일반 성장 조건(22°C)에서 성장시킨 7일령 식물체를 사용하여 5mL 탈이온수에서 인큐베이션시킨 후 전해액 누출을 측정하였다. 한편 45°C 열 충격을 15분간 가한 후 3시간 회복시킨 식물체의 전해액 누출을 측정하였다. 시료를 오토클레이브시킨 후 총 이온을 측정하였다. 이온 누출은 오토클레이브 후에 22°C 및 45°C에서 측정된 전도도 비율 퍼센트로 표시하였다. 데이터는 세 번의 생물학적 반복시험으로부터 표준편차를 계산하여 나타낸 것이다.

도 8은 아라비도시스 BAG 유전자의 ~1-kbp 프로모터 영역 내에 존재하는 다양한 시스-조절요소를 나타낸 것이다.

(a) AtBAG1~7의 프로모터 분석을 PLACE, PlantCare 및 PPDB 데이터베이스를 사용하여 수행하였다. 색상 화살표 머리는 다양한 조절요소의 상대 위치를 나타낸다. 별표는 TSS를 나타내며 번역되는 시작 코돈(ATG)을 나타내었다. 프로모터 서열을 위한 롤러를 스킵 내에 나타내었다.

(b) 도 8a에서 사용된 색상 화살표머리는 아라비도시스 BAG 유전자의 ~1-kbp 프로모터 영역 내에 존재하는 다양

한 시스-조절요소를 나타낸다.

도 9는 서로 다른 호르몬 처리시 qRT-PCR에 의한 마커 유전자의 상대적 전사체 풍부성을 나타낸 것이다.

10일령의 묘목을 10 μ M 앱시스 산(ABA), 10 μ M 1-아미노시클로프로판-1-카르복실산(ACC), 10 μ M 자스몬산 메틸(MeJA) 및 0.5 mM 살리실산(SA)을 보충시킨 1/2 MS 액상 배지로 이송시킨다. 총 RNA 분리를 위해 1시간 및 3 시간에 시료를 채취한다. 마커 유전자의 발현을 qRT-PCR로 측정하였다. 3개의 생물학적 전사체의 평균을 수득한다. 에러 바는 표준 에러 바를 의미한다. 별표는 정상과 파이토호르몬 처리간의 중요한 통계학적 차이를 표시한 것이다.

도 10은 서로 다른 스트레스 조건하에 qRT-PCR에 의한 마커 유전자의 상대적 전사체 풍부성을 나타낸 것이다

18일령의 묘목을 1/2 MS 액상 배지로 이송시킨 후 4°C(추위) 또는 37°C(더위)에서 인큐베이션 시키거나 250mM 만니톨(삼투압 스트레스) 또는 250 mM NaCl(고염분) 12시간 처리시킨다. 슈트 및 뿌리 샘플을 채취하여 총 RNA를 분리한다. 마커 유전자의 발현은 qRT-PCR로 측정한다. 3개의 생물학적 전사체의 평균을 수득한다. 에러 바는 표준 에러 바를 의미한다. 별표는 정상과 비생물학적 스트레스 처리간의 중요한 통계학적 차이를 표시한 것이다.

도 11은 P_{35S}:GUS 및 P_{AtBAG6}:GUS 컨스트럭트의 개략도이다.

RB는 오른쪽 경계, LB는 왼쪽 경계, P_{35S}는 칼리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, P_{AtBAG6}는 AtBAG6 유전자 프로모터, Hyg는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 코딩 영역, GUSPlus-6His는 6 히스티딘 코돈과 융합된 β -글루쿠로니다제 유전자, CAT 인트론은 카탈라제 유전자 인트론, T_{nos}는 노팔린 신타제 터미네이터이다. P_{AtBAG6}의 벡터 내 삽입 위치는 BamHI/NdeI 및 BamHI/BglII 제한 효소 부위에 의해 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] BAG(BCL-2 athanogene)족 단백질은 진핵생물체에 다양하게 보존되어 있다. 이들 단백질은 식물 세포예정사(PCD)에 결정적 역할을 하는 것으로 알려져 왔다.
- [0022] 지난 10년간 발전된 바이오인포메틱스의 도움으로 7개의 BAG 동족체(homolog) 유전자가 아라비도시스 게놈 유전자에서 확인되었다. 이를 살펴보면 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 지니는 AtBAG1, 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 지니는 AtBAG2, 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 서열을 지니는 AtBAG3, 서열번호: 4의 뉴클레오타이드 서열을 지니는 AtBAG4, 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 서열을 지니는 AtBAG5, 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열을 지니는 AtBAG6 및 서열번호: 7의 뉴클레오타이드 서열을 지니는 AtBAG7 등이다.
- [0023] 이들 아라비도시스 BAG 유전자의 발현은 병원체 공격과 비생물학적 스트레스 조건과 관련되어 있음이 규명되고 있다. 본 발명에서 환경 스트레스 조건하의 아라비도시스 BAG족 유전자의 발현을 Botany Array Resource(BAR) 발현 브라우저 도구를 사용하여 분석하였다. 환경 스트레스와 관련된 스트레스 및 호르몬 처리 조건하에서 qRT-PCR 분석을 통해 컴퓨터 모의실험 데이터로 부분적으로 확인하였다.
- [0024] 특히 열 충격에 응답하여 AtBAG6 유전자의 유도는 GUS 레포터 라인을 사용하여 확인하였다. AtBAG6 유전자의 결손은 식물체의 기저 열저항성을 손상시켰으며 열 스트레스에 응답하여 세포 사멸의 증가를 나타내었다.
- [0025] BAG 유전자의 조절 메커니즘을 규명하기 위해 본 발명자들은 스트레스 응답 조절요소가 존재하는 1-kbp 이내의 프로모터 영역을 분석하였다. 본 발명자들의 전사 프로파일링은 아라비도시스 BAG 유전자가 업스트림 조절요소의 조절 하에 환경 스트레스에 대해 서로 다르게 응답하는 것으로 규명되었다.

[0026] 이하 본 발명을 첨부한 도면에 의거 더욱 상세히 설명한다.

[0027] 1. 호르몬 교란에 응답하는 아라비도시스 BAG 유전자의 발현 분석

[0028] 첫째로 본 발명자들은 BAR 발현 브라우저를 이용하여 전자적 노던 블롯 방법으로 7개의 아라비도시스 BAG 유전자의 발현 프로파일을 체계적으로 분석하였다. 다양한 호르몬에 응답하는 아라비도시스 BAG 유전자 발현의 정도를 결정하기 위해 본 발명자들은 처리된 샘플과 대조 샘플간의 log2-전환 비율을 계산하였다(도 1). AtBAG5 유전자의 자료는 입수할 수 없었다. AtBAG1, AtBAG4 및 AtBAG7의 발현수준은 호르몬 처리에 응답하여 약간만 변화하였다. log2-전환 비율은 -0.5 내지 +0.5 이었다. AtBAG2의 발현은 ABA 처리에 의해 강하게 유도되었고 MeJA 처리에 의해 약간 유도되었다. AtBAG3의 전사 수준은 MeJA, ABA 및 SA에 대한 응답하여 약간 상향 조절되었다. AtBAG6 전사체의 발현 수준은 ACC, MeJA 및 ABA 처리에 약간 증가하였으나 SA에 의해서는 약간 감소하였다.

[0029] 2. 병원체의 공격에 대한 아라비도시스 BAG 유전자 발현의 분석

[0030] 다음으로 본 발명자들은 엘리시터(도 2a) 및 병원체(도 2b)에 응답하는 아라비도시스 BAG 유전자 발현을 조사하였다. 흥미롭게도 AtBAG2 유전자의 발현은 화학적 엘리시터 CaCl_2 및 헤어핀 Z(HrpZ) 및 LPS 리포폴리사카라이드(LPS)와 같은 박테리아 유래 엘리시터에 응답하여 급격히 유도되었다. 그러나 네크로스-유도 *Phytophthora* 단백질 1(NPP1)과 같은 오마이세트 유전자 엘리시터에 응답하여 하향 조절되었다. 더욱이 AtBAG2 유전자 발현은 비숙주 및 비독성 *Pseudomonas syringae* 및 *Pseudomonas infestans*에 응답하여 상당히 하향 조절되었다. 또한 *Erysiphe orontii*, *Botrytis cinerea* 및 virulent *P. syringae*에 응답하여 어느 정도 하향 조절되었다. 비록 AtBAG1 유전자는 다양한 병원체에 대해 AtBAG2 유전자와 유사한 응답을 나타내나 AtBAG1 유전자의 하향 조절 수준은 AtBAG2 유전자보다 더 낮게 나타났다. AtBAG3의 유전자의 발현 수준은 *B. cinera* 보다 독성 *P. syringae*에 응답하여 약간 높게 나타났다. AtBAG6 전사체를 *P. syringae* pv tomato DC3000 및 *B. cinera*에 응답하여 어느 정도 축적하였으며 *P. syringae* ES4326/avrRpt2에 응답하여 약하게 나타났다. 본 발명자들은 병원체 공격 이후 AtBAG4 및 AtBAG7 유전자 발현의 큰 변화는 관찰되지 않았다(도 2b).

[0031] 3. 비생물학적 스트레스에 응답하는 아라비도시스 BAG 유전자의 발현 프로파일

[0032] 다음으로 본 발명자들은 추위, 삼투압, 염분, 가뭄, 산화, UV-B, 상처 및 열 스트레스와 같은 다양한 비생물학적 스트레스 조건 하에서 아라비도시스 BAG 유전자의 전사 응답을 모니터링 하였다(도 3). AtBAG1 유전자의 발현은 추위, 염분 및 상처에 응답하여 슈트에서 약간 유도되었고 열 스트레스 하에서는 억제되었다. AtBAG2의 발현은 가뭄, 추위, 염분, 산화, 삼투압 및 열 스트레스에 응답하여 높게 유도되었다. UV-B에 응답하여 AtBAG2, AtBAG3(슈트) 및 AtBAG6(뿌리)의 발현은 하향 조절되었다. AtBAG3 유전자는 염분 및 가뭄에 응답하여 약간의 유도를 나타내었으며 삼투압 스트레스(후기 시점)하에서는 강한 유도를 나타내었다. 그러나 열 및 삼투압 스트레스(초기 시점) 하에서는 약간 억제되었다. AtBAG4 유전자의 발현은 추위, 삼투압 스트레스 및 상처에 의해 약간 억제되었다. AtBAG7 유전자의 발현은 다양한 스트레스에 응답하여 약간의 조절을 나타내었다. 그러나 AtBAG6 유전자의 발현은 열, 산화, 삼투압, 염분 및 상처 스트레스에 응답하여 강하게 유도되었다.

[0033] 4. qRT-PCR에 의한 아라비도시스 BAG 유전자 발현의 검증

[0034] 다양한 스트레스 및 호르몬 처리 조건하에 아라비도시스 BAG 유전자 발현의 컴퓨터 모의분석 후에 본 발명자들은 qRT-PCR을 수행함으로써 컴퓨터 모의분석 데이터를 검증하였다. 호르몬 또는 스트레스 조건하에서 원하는 효과가 유도되는지를 결정하기 위해 본 발명자들은 관련 마커 유전자의 발현을 분석하였다. 마커 유전자는 MeJA의 경우 PDF1.2이고, SA의 경우 PR1이고, ABA의 경우 RD29B이고 추위의 경우 COR15a이고 염분 및 삼투압 스트레스

의 경우 HSFA6a이고 열의 경우 HSP101이고 염분과 추위의 경우 RD29A이다. 이러한 마커 유전자의 유도 패턴에 의거하여 스트레스 처리의 관련성을 확인하였다(도 9 및 도 10). 또한 본 발명자들은 아라비도시스 BAG 유전자의 qRT-PCR 데이터와 컴퓨터 모의분석 데이터 간의 높은 정도의 상호관련성을 관찰하였다(도 4, 도 5).

[0035] 본 발명자들의 qRT-PCR 데이터는 AtBAG1 유전자 발현이 추위 하에서 슈트 내에서 약간 유도되고 열 및 염분 스트레스 처리에 의해 억제되며 SA에 의해 약간 억제되는 것을 확인하였다. AtBAG2 유전자의 발현은 뿌리 내에서 ABA와 염분 처리에 응답하여 유도되고 추위 및 열 스트레스에 의해 억제된다. ABA 및 SA에 응답하여 AtBAG3 유전자 발현은 약간 유도되며 추위에 의해서는 하향 조절되는 것이다. AtBAG4 유전자의 발현은 다른 호르몬 처리에 응답하여 미미한 변화를 나타내었다. 그러나 본 발명자들은 염분 및 열처리에 의한 AtBAG4 유전자의 발현 유도를 관찰하였으며 뿌리 조직 내에서 추위에 대해서는 감소되었다. 본 발명자들의 qRT-PCR 결과는 서로 다른 환경 조건하에서 AtBAG5 유전자의 발현이 상당한 의미를 부여하는 것으로 판단되었으나 BAR 발현 브라우저에서는 그 자료를 입수할 수 없었다. AtBAG5 유전자의 발현은 열 스트레스 조건 하에서 슈트 및 뿌리 모두에서 유도되었으나 예를 들면 ABA, ACC 및 SA에 응답하여서는 약간 유도되는 것 같이 호르몬 처리에 응답해서는 약간의 변화만 나타내었다.

[0036] 컴퓨터 모의분석 자료에 일치하게 본 발명자들은 염분 스트레스에 의한 뿌리 내에서 AtBAG6 유전자의 증가된 발현을 관찰하였으며 이는 슈트와 뿌리 모두에서 열 스트레스에 응답하여 유도된 것이다. AtBAG6 유전자의 발현은 SA 처리에 의해 증가되었다. AtBAG7 유전자의 발현은 MeJA에 응답하여 약간 상향 조절되었으며 열 염분 스트레스와 같은 비생물학적 스트레스 처리에 의해 뿌리 조직 내에서 역시 약간 상향 조절되었다.

[0037] 5. GUS 리포터 분석법에 의한 열 스트레스 하에서 AtBAG6 유전자 발현의 검증

[0038] 본 발명자들의 서로 다른 비생물학적 스트레스에 응답하는 AtBAG 유전자의 컴퓨터 모의분석은 열 스트레스 조건 하에서 AtBAG6 유전자 발현 수준이 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 qRT-PCR 결과와 일치하는 것이다. 따라서 동일한 결과를 검증하기 위해 본 발명자들은 GUS 리포터 분석 시스템을 채택하였다. 본 발명자들은 GUS 유전자 발현을 위한 플라스미드를 구축하였으며 AtBAG6 프로모터(PAtBAG6)와 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S 프로모터(P35S)에 의해 유도된 GUS 활성을 측정하였다(도 11). 정상적 조건(22°C)하에서 본 발명자들은 5일령 묘목의 모든 조직 내에서 P35S:GUS 라인 내의 강한 GUS 발현을 관찰하였다. 그러나 PAtBAG6:GUS 라인 내에서 GUS 발현은 미미하게 나타났으며 대부분 하배축(hypocotyls)에 한정되었으며 뿌리와 잎에는 함량을 겨우 추적할 수 있었다. 열 스트레스 처리를 위해 본 발명자들은 정상 조건(22°C)에서 2주간 식물체를 성장시켰다. 그리고 37°C에서 2시간 열 스트레스를 가하였다. PAtBAG6:GUS 라인 내에서 본 발명자들은 열 스트레스 조건(37°C)에서 GUS 활성이 증가하는 것을 발견하였다. 그러나 P35S:GUS 라인 내에서는 가시적 변화가 나타나지 않았다(도 6a).

[0039] GUS 활성을 정량화하기 위해 본 발명자들은 상기한 동일 묘목으로부터 단백질 샘플을 사용하여 형광 GUS 활성 에세이를 수행하였다. P35S:GUS 라인의 형광 분석 결과는 PAtBAG6:GUS 라인에 비해 22°C에서 높은 보존적 GUS 활성을 나타내었다(도 6b). 한편 37°C에서 2시간 열처리는 PAtBAG6:GUS 라인에서만 오직 GUS 활성의 증가를 나타내었다. P35S:GUS 라인은 차이를 나타내지 않았다(도 6b). 이를 종합하여 본 발명자들의 결과는 열 스트레스 조건 하에서 AtBAG6 유전자 발현으로부터 수득된 qRT-PCR 데이터뿐만 아니라 컴퓨터 모의분석 역시 확실히 검증시킨 것이다.

[0040] 6. 기저 열 저항성 내에서 AtBAG6의 생리학적 역할

[0041] 본 발명자들의 qPCR 데이터와 GUS 데이터는 열 쇼크에 응답하는 AtBAG6 유전자 발현 유도를 명확하게 확인하였다. 본 발명자들은 열 스트레스 응답에 AtBAG6 유전자의 역할을 판단하기 위해 추가 조사를 수행하였다. 기저 열 저항성을 측정하기 위해 본 발명자들은 AtBAG6 유전자의 첫 번째 엑손 내에 T-DNA 삽입을 통해 아라비도시스

탈리아나 동형 접합성 atbag6 변이주(SALK_047959)와 AtBAG7 유전자의 첫 번째 엑손 내에 T-DNA 삽입을 통해 아라비도시스 탈리아나 동형 접합성 atbag7 변이주(SALK_058247)의 특성을 분리하였다(도 7a). 이는 게놈 DNA PCR을 통해 확인하였다(도 7b). 열 민감도 에세이를 위한 양성 대조군으로 본 발명자들은 T-DNA 넥아웃 변이주 thaliana HSP101, hot1를 사용하였다. 이는 모두 기저 및 획득된 열 저항성을 요구하는 것이다. 정상조건 하에서 정상하였을 때 WT(야생형), atbag6, atbag7 및 hot1 간의 표현형의 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 5일령 묘목에서 지정된 시간간격으로 45℃에 노출시키고 22℃에서 회복시켰을 때 atbag6, atbag7 및 hot1은 WT(야생형)에 비해 충분히 회복되지 않았다(도 7c).

[0042] 열 저항성 시험 결과를 강화시키기 위해 본 발명자들은 열 스트레스에 응답하는 식물체의 플라즈마 멤브레인 손상의 지표인 전해액 누출 에세이를 수행하였다. 열 쇼크에 응답하여 WT(야생형), atbag6, atbag7 및 hot1을 포함하는 모든 제노타입은 이온 누출이 증가하였다. 그러나 atbag6, atbag7 및 hot1은 WT(야생형)에 비해 더 높은 수준의 누출이 관찰되었다(도 7d). 이러한 결과는 AtBAG6의 손상이 열 스트레스에 민감도를 식물체에게 증가시키는 것을 확인시키는 것이다.

[0043] 7. 아라비도시스 BAG 유전자 프로모터 내의 조절 요소 분석

[0044] 다양한 자극에 응답하는 유전자 발현은 프로모터 영역 내에 존재하는 잘 보존된 시스-조절요소에 의해 조절된다. 따라서 본 발명자들은 아라비도시스 BAG 유전자의 1-kbp 이내의 프로모터 영역을 일반적으로 입수 가능한 PLACE, PlantCARE 및 PPDB 데이터베이스를 통해 분석하였다. 아라비도시스 BAG 유전자의 프로모터 영역 내에서 본 발명자들은 MYC 컨센서스 서열, MYB-결합 사이트, 가뭄 응답 조절요소(DRE), 열 충격 조절요소(HSE) 및 ABA-응답 조절요소(ABRE), 에틸렌 응답 조절요소(ERE), TGACG 모티프, TCA 조절요소 및 W-박스과 같은 호르몬-응답 조절요소를 포함하는 다중 스트레스와 관련된 시스-조절요소를 관찰하였다(도 8 및 표 1).

[0045] AtBAG 유전자의 프로모터 영역 내에 모든 조절 유전자의 관련 존재를 접근하기 위해 본 발명자들은 PPDB 데이터베이스를 이용하여 전사 시작 사이트(TSS)의 비교와 같은 각각의 위치를 고려하였다. AtBAG4, AtBAG5 및 AtBAG6의 TSS 정보는 입수 가능하지 않기 때문에 본 발명자들은 관련 문헌과 AtBAG4 및 AtBAG6 프로모터를 위한 TSS 정보를 조사하였다. 이를 통해 본 발명자들은 프로모터 분석을 위해 qRT-PCR에 의해 확인된 모든 데이터를 통합시켜 하기 표 1에 그 정보를 요약하였으며 아라비도시스 BAG 유전자 프로모터 내의 시스-조절요소 및 특이 모티프 존재의 생물학적 의미를 부여하였다.

표 1

[0046] BAR, qRT-PCR 데이터 요약 및 프로모터 모티프 분석

유전자	qRT-PCR에 의해 확인된 BAR 데이터	모티프	서열	ATG로부터의 위치
AtBAG1	추위에 응답하여 슈트에서 미량 유도되나 열 및 염분 스트레스에 응답하여 슈트 및 뿌리에서 미량 감소됨	DRE	CCGAC	-166, -576
		MYC	CANNTG	-826
		MYB1	WAACCA	-224, -812
		MYB 코어	CNGTTR	-407, -1022
		HSE	AAACTTTC	-307
AtBAG2	ABA에 응답하여 유도됨 염분에 응답하여 뿌리에서 유도되나 추위 및 열에 응답하여 슈트 및 뿌리에서 감소됨	ABRE	TACGGTC	-627
		DRE	CCGAC	-520, -582
		MYC	CANNTG	-942, -1058
		MYB 코어	CNGTTR	-479, -698, -742, -806, -960

AtBAG3	ABA 및 SA에 응답하여 미량 유도 염분에 응답하여 유도되나 추위에 응 답하여 슈트 및 뿌리에서 감소됨	TCA 조절요소	GAGAAGAATA	-34, -169
		MYC	CANN TG	-69, -402, -812, -962
		MYB 코어	CNGTTR	-492, -701, -1011
		MYB 1	WAACCA	-524, -933
AtBAG4	추위에 응답하여 뿌리에서 감소되나 염분 및 열에 의해 뿌리에서 유도됨	DRE	CCGAC	-467
		MYB 코어	CNGTTR	-366, -888
		MYB1	WAACCA	-266, -935
		MYC	CANN TG	-145, -147, -156, -276
AtBAG5	열에 응답하여 슈트 및 뿌리에서 유 도 됨 추위에 응답하여 감소됨	DRE	CCGAC	-154
		HSE	AAAAACTTTC	-137
AtBAG6	SA에 응답하여 과량 유도되고 MeJA에 의해 약간 유도됨 열에 응답하여 슈트 및 뿌리에서 유 도됨	TGACG 모티프	TGACG	-221
		HSE	AGAAAATTCC	-488
AtBAG7	ACC 및 MeJA에 의해 약간 유도됨	ERE	ATTTCAAA	-317
		TGACG 모티프	TGACG	-524

[0047] BAG족은 세포 신호화, 성장 및 발전을 조절하는 공동-사페론으로 역할을 하며 환경 스트레스 응답과 관련된 다 기능성 단백질 그룹이다. 따라서 다양한 생물학적 또는 비생물학적 스트레스 조절 메커니즘에 응답하는 이들 단백질의 발현을 이해하는 것이 중요하다. 본 발명자들은 컴퓨터 모의 실험을 통해 다양한 호르몬 및 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 응답하는 아라비도시스 BAG 유전자의 발현 수준을 체계적으로 분석하였다.

[0048] 식물 호르몬은 식물의 성장 및 발전뿐만 아니라 다양한 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 응답하는 것으로 이미 공지되어 있다. 따라서 본 발명에서는 ABA, 에틸렌, MeJA 및 SA와 같은 식물 호르몬과 관련된 스트레스를 통해 실험하였다. 본 발명자들의 컴퓨터 모의 실험은 ABA가 적절한 수준으로 AtBAG3 및 AtBAG6 단백질의 발현을 유도하고 그보다 높은 수준으로 AtBAG2의 발현을 유도함을 qRT-PCR 시험을 통해 확인하였다. 더욱이 AtBAG2 및 AtBAG3의 발현은 염분 스트레스에 응답하여 유도되었으며 추위 처리로 감소되었다. 이러한 결과는 아라비도시스 BAG 유전자의 발현은 ABA에 의해 조절되고 이는 다양한 환경 스트레스에 대한 적합한 응답으로 이전의 연구에서 제안된 것과 일치하는 것이다.

[0049] 또한 본 발명자들은 DRE, ABRE, MYC, HSE 및 MYB-결합 사이트와 같은 보존된 스트레스-응답 시스-조절요소의 존재를 아라비도시스 BAG 유전자 프로모터 영역 내에서 확인하였다(도 8 및 표 1). 이러한 조절요소는 이들 발현의 조절에 중요한 것이다.

[0050] 아라비도시스 BAG 유전자 프로모터 영역 내의 보존된 스트레스 응답 모티프 존재와 ABA에 응답하는 이들 유전자의 유도는 예를 들면 추위, 가뭄 및 고 염분과 같은 다양한 환경 스트레스에 대한 적합한 반응으로 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다 (도 1). 스트레스에 응답하는 아라비도시스 BAG 유전자의 프로모터 내의 보존된 모티프의 존재와 유전자 발현의 조절자의 아이덴티티와의 관련성은 이후 연구에서 규명될 수 있을 것이다.

[0051] 에틸렌, MeJA 및 SA의 중요한 역할은 다양한 병원체에 대항하는 식물 방어 기전의 조절로서 공지되어 있다. 특히 에틸렌 및 MeJA는 사체영양성(necrotrophic) 병원체 및 해충으로부터 방어와 관련된 것이고 SA는 생물영양성 및 반생물영양성(hemibiotrophic) 병원체에 대한 응답 방어를 활성화시키며 체계적으로 획득된 저항성(SAR)을 유도한다.

[0052] 본 발명자들의 qRT-PCR 데이터는 SA 및 MeJA에 응답하는 AtBAG6 단백질의 발현이 증가함을 나타내고 있다. 이는

선천성 면역성과 기저 방어 응답의 역할을 하는 것으로 여겨진다. 이에 덧붙여 본 발명자들의 컴퓨터 모의 실험은 *B. cinerea* 및 *P. syringae* 병원체에 응답하여 AtBAG6의 약한 유도를 나타내고 있다. 이러한 결과는 AtBAG6가 숙주 방어 메커니즘 내의 역할을 담당하고 SA에 응답하여 상향 조절됨을 암시하는 종전의 보고와 일치하는 것이다. 또한 AtBAG6 T-DNA 삽입 변이체(atbag6)는 사물영양성 진균 병원체인 *B. cinerea*의 감수성을 증가시킨다.

[0053] 최근 아스파르트릴 프로테아제 절단에 의한 AtBAG6의 활성화는 오토파지 및 진균 병원체에 대한 식물 방어를 촉발하는 중요한 이벤트이다. 식물 PCD의 고전적 예는 HR이며 식물-미생물 상호작용을 통해 관찰된다. 또한 AtBAG6 세포 사멸 도메인(CDD)의 과발현은 식물체 앞에서 HR-유사 표현형을 야기시키고 이에 따라 PCD가 유발된다. 이들을 합쳐져 식물 세포 사멸 내의 AtBAG6 조절 역할을 확인하고 있으며 AtBAG6-유도 세포 사멸의 기능은 단순히 각각의 세포를 사멸시키는 것이 아니라 전체 식물을 보호하는 기능을 지닌 의미로 해석된다.

[0054] 본 발명자들은 AtBAG2 발현이 다양한 병원체에 응답하여 특이하게 하향 조절되거나 박테리아-유래 엘리트에 의해 유도되고 이는 병원체 공격에 대한 식물 방어 체계의 역할을 암시하는 것으로 관찰하였다. 이러한 결과는 AtBAG2 단백질의 프로모터 영역 내의 4개의 W-박스 모티프의 존재에 의해 지지되는 것이며 W-박스는 WRKY-결합 부위로 알려져 있고 AtWRKY18의 유도 발현을 위한 음성 조절 요소로 역할하는 것이 알려져 있다.

[0055] 이러한 관찰은 병원체 공격에 응답하는 AtBAG2 레벨이 W-박스 모티프에 의해 밀접하게 조절되어질 가능성을 암시하는 것이다. 이는 AtWRKY18의 조절과 비슷한 방법이다. 이와 관련하여 추가적 연구가 진행되어 병원체 유도 HR 경로에 응답하는 AtBAG2 단백질의 상향 또는 하향 조절을 규명하여야 할 것이다.

[0056] 식물체 내에서 생물학적 스트레스뿐만 아니라 추위, 가뭄, 염분, 더위 및 UV와 같은 비생물학적 스트레스는 세포 사멸을 유도하고 식물체의 성장 및 생산성에 심각한 제약을 야기한다. 이전의 연구는 추위 스트레스 하의 AtBAG4 단백질의 상향 조절을 기술하고 있으며 추위, 염분, UV 및 산화 스트레스에 저항성을 지닌 형질전환 담배 식물체 내의 AtBAG4 단백질의 보존된 발현을 나타내고 있다.

[0057] 본 발명자들의 컴퓨터 모의 실험 상의 qRT-PCR 데이터 역시 뿌리 조직 내에서 염분 및 더위에 의해 AtBAG4 단백질이 유도되나 추위에 응답해서는 AtBAG4 단백질의 증가된 발현이 관찰되지 않는 것을 확인하였다. 이는 종래의 보고와 상이한 것으로 추위 처리 조건과 성장 조건의 차이에 근거할 것이다. 또한 본 발명자들은 BAR에서 언급된 조건을 따라 하였으며 이는 식물체를 4℃로 12시간 동안 이송시킴으로써 식물체에 추위 스트레스 처리를 가하는 것으로 반면 이전의 보고는 이들 식물체를 -20℃에서 10분간 처리한 것이었다.

[0058] 본 발명에서 본 발명자들의 체계적 분석은 AtBAG6 단백질이 qRT-PCR 및 정량적인 형광성 GUS 에세이 결과에 의해 열 스트레스에 응답하여 명백히 상향 조절됨을 확인한 것이다 (도 5 및 도 6). 따라서 본 발명자들은 식물체의 기저 열 저항성 내에서 AtBAG6의 역할을 확인하고 이때 양성 대조군으로 AtBAG7 변이체를 사용하는 것이다. 추위, 더위 또는 튜니카마이신과 같은 화학적 작용제에 의해 환경 스트레스가 유도되더라도 ER-국소화 AtBAG7 단백질의 전사 수준에는 아무런 영향을 미치지 않을지라도 이들 단백질은 분자 샤페론 BIP2와 직접적으로 상호 작용하여 스트레스 유도 세포예정사를 지연시키는 중요한 역할을 한다.

[0059] AtBAG7의 전사 반응은 AtBAG7의 공동 샤페론 활성이 환경 스트레스에 의해 유도된 세포예정사를 지연시키는 데 필수적인 것임을 확인한 것이다. 또한 AtBAG7 단백질은 단백질 수준에서 조절되어질 수 있는 가능성이 존재하고 예를 들면 최근 연구는 ER-국소화된 AtBAG7 단백질은 열 스트레스에 응답하여 핵에 트랜스로케이션된다는 것과 UPR 경로를 조절한다는 것을 암시하고 있다.

- [0060] 상기 보고서에서 본 발명자들은 atbag6 녹아웃 식물체는 atbag6 녹아웃 식물체와 유사하게 기저 열 저항성이 손상되었음을 확인하였다. 또한 이들 변이체는 세포막이 손상됨을 나타내는 열 스트레스에 응답하는 전해액 누출이 증가되었다. atbag6의 열 스트레스 민감 표현형은 오토파지의 결함에 기인한 것이 아니며 이는 열 스트레스 유도 오토파지가 AtBAG6 단백질에 의해 조절되지 않기 때문이다.
- [0061] 이는 AtBAG7 공동 사페론 효과와 유사하게 AtBAG6 단백질이 열 스트레스 저항성에 관련되어 있음을 암시하는 것이다. 이러한 보고는 스트레스 조건 하에서 식물 생존을 위한 BAG 유전자의 중요성을 나타내는 것이다.
- [0062] 세포막으로부터 떨어진 엽록소와 같은 세포 소기관 및 미토콘드리아는 식물체 내의 세포예정사를 조절하는데 중요한 역할을 한다. AtBAG5 단백질의 국소화는 미토콘드리아에서 예측되어 있었으며 미토콘드리아-조절 세포 사멸 메커니즘을 조절하는 중요한 요소이다. 본 발명자들은 열에 응답하여 유도되는 AtBAG5 단백질의 프로모터 내의 HSE 존재를 관찰하였다. 이에 따라 열 스트레스 저항성에서 AtBAG5 단백질의 역할을 확인하는 것은 흥미로운 일이다.
- [0063] 결론적으로 본 발명은 이전 연구 결과를 확인하였을 뿐만 아니라 BAC 유전자의 식물체 내의 다양한 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 의해 유도되는 세포예정사의 조절에 관한 가설을 제시하게 한다. 예를 들면 본 발명자들은 아라비도시스 BAG 유전자의 프로모터 영역 내에서 보존된 모티프의 존재를 기술하였다. 전사 인자 상부 스트림에 의한 조절과 관련되어 있는 것이다. 이 조절은 추후 연구를 통해 규명되어야 할 것이다. 또한 다수의 환경 조건하에서 아라비도시스 BAG족 유전자와 관련된 조절 네트워크를 조사하는 것 역시 흥미로운 것이다.
- [0064] 집적된 데이터는 아라비도시스 BAG 단백질이 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대항하는 식물 방어에 관련되어 있음을 암시하는 것이다. 또한 세포 사멸의 유도 또는 저해에 관련되어 있는 것이다. 그러나 BAG 단백질의 각각의 기능 및 명확한 메커니즘은 추가적 연구를 요할 것이다. 아라비도시스 BAG 유전자의 발현에 대한 본 발명자들의 데이터 검색은 유용한 예비적 도입을 제공할 것이며 관련 연구를 모티베이션할 것이다.
- [0065] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0066] (실시예 1) 전사 데이터 컴퓨터 모의분석
- [0067] 호르몬 및 비생물학적 및 생물학적 스트레스 조건하에서 응답하는 아라비도시스 BAG족 유전자의 발현을 특정하기 위해 Botany Array Resource(BAR) 발현 브라우저 도구(<http://bar.utoronto.ca/welcome.htm>)를 사용하여 자료를 수득하였다. 1-아미노시클로프로판-1-카복실산(ACC), 메틸 자스몬산(MeJA), 앱시스산(ABA), 살리실산(SA)과 같은 다양한 호르몬 처리의 응답에 대해 본 발명자들은 AtGenExpress Hormone Series 데이터베이스를 사용하였다. 슈도모나스 시링게 pv tomato DC3000, P.시링게 pv phaseolicola, P. 시링게 ES4326/avrRpt2, Phytophthora infestans, Botrytis cinerea, Erysiphe orontii 및 박테리아와 오마이세트(oomycete)-유래 엘리시터(elicitor)를 포함하는 다양한 병원체에 응답하는 AtBAG 유전자의 발현을 조사하기 위해 AtGenExpress Stress Series 데이터베이스로부터 자료를 추출하였다. 추위, 삼투압, 염분, 가뭄, 산화, UV-B, 상처 및 열 스트레스와 같은 스트레스 자극에 대한 응답을 판명하기 위해 AtGenExpress Stress Series 데이터베이스로부터 데이터를 추출하였다. 호르몬, 병원체 및 비생물학적 스트레스 처리로부터 발현 데이터의 경우 적어도 두 개 이상의 전사체의 평균을 사용하였으며 적절한 LOG2-전환 비율(처리/대조군)을 분석해 사용하였다. 전사 없이 특정 호르몬 및 스트레스에 응답하는 발현 수치는 분석에서 제외하였다.

[0068] (실시예 2) 식물 재료 및 성장 조건

[0069] 모든 야생형(WT) 아라비도시스 및 T-DNA 변이체를 컬럼비아(Col-0) 생태형으로 준비하였다. 본 발명자들은 ABRC 스톡으로부터 동형접합성 T-DNA 변이체 atbag6(SALK_047959)와 atbag7(SALK_058247)을 분리하였다. 본 발명자들은 이전 연구에서 얻어진 녹아온 변이체 AtHSP101, hot1을 사용하였다. 야생형(WT)은 (Col-0) 종자를 표면 멸균시키고 2% (w/v) 슈크로오스와 1% (w/v) 한천을 포함하는 절반 역가의 Murashige and Skoog (1/2 MS, pH 5.7)를 발아를 위해 사용하였다. 플레이트를 성충구조하에 4 °C 암소에서 3일간 보관하고 명소에서 16시간/암소에서 8시간 순환시키는 조건하에 22°C의 제어된 환경 챔버로 이송시켰다. 이때 백색광 광도는 $100 \mu\text{mol} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 이었다.

[0070] (실시예 3) CRNA 추출 및 역전사

[0071] RNA 추출을 위해 수직 위치로 식물을 10일 동안 2MS의 플레이트상에서 성장시키고, 25개까지의 모종을 2%(w/v) 슈크로오스와 10 μM 의 ACC 또는 0.5mM의 SA를 각각 보충시킨 1/2MS으로 이송시켰다. 18일령의 묘목에 250mM의 염화나트륨(고염분) 또는 250mM의 만니톨(삼투압 스트레스)을 통해 비생물학적 스트레스를 가하고 4°C(추위) 또는 37°C(더위)하에서 12시간 인큐베이션 시켰다. 슈트 및 뿌리의 부위를 각각 채취하고 액체 질소에 동결시킨 후 RNA 추출 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 제조자 지침에 의거 총 RNA를 추출하였다. NanoDrop ND-1000 스펙트로포토메터를 사용하여 RNA 농도와 순도를 측정하였다. 게놈 DNA 오염을 제거하기 위해 본 발명자들은 RNase가 제거된 1 μg 의 RNA를 DNase I로 처리하고 올리고-(d)T 프라이머와 RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 제조자 지침에 의거 cDNA의 한 가닥을 합성하였다.

[0072]

[0073] (실시예 4) 실시간 QRT-PCR 분석

[0074] TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (SYBR Green 고농도 ROX) 키트(Enzyomics, 대전시, 한국)를 사용하여 제조자 지침에 따라 CFX 384 Touch 실시간 PCR 감지 시스템(Bio-Rad, Hercules, CA, 미국)을 통해 RT-qPCR 분석을 행하였다. 간단히 설명하면 본 발명자들은 1 μL cDNA(1:10 희석), 1 μL 의 정방 및 역방 프라이머(10pmol/ μL) 및 5 μL SYBR Green mix를 포함하고 나머지 부피를 RNase가 제거된 물로 채운 뒤 10 μL 의 반응부피를 세팅하였다. PCR 사이클 조건은 95°C에서 15분간 1사이클, 95°C에서 10초/ 55°C에서 10초/ 72°C에서 30초간 40사이클을 반복하였으며 증폭된 생성물의 특이성을 확인하기 위해 멜팅 곡선 단계를 수행하였다. 3개의 생물학적 전사체를 각각의 샘플로 사용하였으며 발현 수준은 Actin2에 대한 결과로 일반화 시켰다. 모든 프라이머 서열을 표 2에 나타내었다.

표 2

[0075]

유전자	위치	프라이머	서열 (5'-3')
Act in2	AT3G18780	Act in2-F	TGATGCACTGTGTGTGACAA (서열번호: 19)
		Act in2-R	GGGACTAAAACGCAAAACGA (서열번호: 20)
AtBAG1	AT5G52060	AtBAG1-F	AGATGATGAGAAACAAACCGACAA (서열번호: 21)
		AtBAG1-R	CGGAACCTCTACCGCCATTA (서열번호: 22)
AtBAG2	AT5G62100	AtBAG2-F	AAGGCAACCGCAAACGAA (서열번호: 23)
		AtBAG2-R	TGTCAGCATTTCCCGTTCCT (서열번호: 24)
AtBAG3	AT5G07220	AtBAG3-F	GTCTCGACCTGGAGGAATGG (서열번호: 25)
		AtBAG3-R	ACGTGGCACATCGGAGTTC (서열번호: 26)
AtBAG4	AT3G51780	AtBAG4-F	AGCTGTAAGCACTGAGTGGGAAT (서열번호: 27)
		AtBAG4-R	TGGCGGAGGAGGGTTCA (서열번호: 28)
AtBAG5	AT1G12060	AtBAG5-F	TCCCGATTGAAACTCCATTACC (서열번호: 29)

AtBAG6	AT2G46240	AtBAG5-R	GCGGTGGCGTTTGTTTTG (서열번호: 30)
		AtBAG6-F	CCTGGCAACGGATTCTAAGC (서열번호: 31)
		AtBAG6-R	GGAATTGTTGTCGAGGAAGC (서열번호: 32)
AtBAG7	AT5G62390	AtBAG7-F	GTTCGAGGAGCGAAGAGATCA (서열번호: 33)
		AtBAG7-R	GCGGGTCTACCACATCTAACATT (서열번호: 34)
COR15A	AT2G42540	COR15A-F	AACGAGGCCACAAAGAAAGC (서열번호: 35)
		COR15A-R	CAGCTTCTTTACCCAATGTATCTG (서열번호: 36)
PDF1.2	AT5G44420	PDF1.2-F	GCTTCCATCACCCCTTATCTTC (서열번호: 37)
		PDF1.2-R	GCCGGTGGTCGAAA (서열번호: 38)
HSP101	AT1G74310	HSP101-F	CACAATCTCCTCCACCTGATGA (서열번호: 39)
		HSP101-R	GCACGACGAATGACCTTAATAAGA (서열번호: 40)
PR1	AT2G14610	PR1-F	GTCTCCGCCGTGAACATGT (서열번호: 41)
		PR1-R	CGTGTTGCGAGCGTAGTTGT (서열번호: 42)
HSFA6A	AT5G43840	HSFA6A-F	CCCTAGATGCTTTAAGCACAATAATTCT (서열번호: 43)
		HSFA6A-R	ATCGATGTCATCACCATACTCTTCTGG (서열번호: 44)
RD29A	AT5G52310	RD29A-F	GTTACTGATCCCACCAAGAA (서열번호: 45)
		RD29A-R	GGAGACTCATCAGTCACTTCCA (서열번호: 46)
RD29B	AT5G52300	RD29B-F	GCAAGCAGAAGAACCAATCA (서열번호: 47)
		RD29B-R	CTTTGGATGCTCCCTTCTCA (서열번호: 48)
AtBAG6	AT2G46240	P _{AtBAG6} F-attB1*	aaaaagcaggcatatgAACGAAACCAATAATT (서열번호: 49)
		P _{AtBAG6} R-attB2*	agaaagctgggTTGTGATGGATCCATGTA (서열번호: 50)
AtBAG6	AT2G46240	6F	ATGATGCCTGTGTACATGGAT (서열번호: 51)
		6R	AGAGAAGGTACTTCGTCTGTCTCC (서열번호: 52)
AtBAG7	AT5G62390	7F	ATGACTTTGTTCCATAGACTCGAT (서열번호: 53)
		7R	TTCTTCTCCGTTTCAAGCAT (서열번호: 54)
T-DNA		LBa	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG (서열번호: 55)

* attB1 및 attB2 영역은 밑줄로 나타내었다.

(실시예 5) GUS 리포터 유전자와 융합된 AtBAG6 프로모터의 분석

AtBAG6 유전자(PAtBAG6)의 1kb 이내의 프로모터 영역을 표 2에 기재된 PAtBAG6F-attB1/PAtBAG6R-attB2의 프라이머 세트와 고신뢰성 PCR을 수행하여 아라비도시스 계통 유전자를 증폭하였다. 그 후 BP 반응 키트 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국)를 제조가 표준 프로토콜에 따라 사용하여 pDONRPAtBAG6를 생성시키기 위해 게이트웨이 엔트리 벡터 pDONR221을 클로닝하였다. PAtBAG6 영역을 2단계를 통해 pDONR-PAtBAG6로부터 분리하였다.

첫 번째 단계는 제한효소 NdeI으로 절단하고 DNA 폴리머라아제 I Large(Klenow) 프래그먼트(New England Biolabs Inc., Beverly, MA, 미국)에 의해 블런트화 시켜 pDONR-PAtBAG6를 선형화시키는 것이다. 두 번째 단계는 BamHI으로 분해시켜 pCambia1305.1 (P35S:GUS) 바이너리 벡터의 35S 프로모터 영역을 또한 제거하는 것이다. 이러한 2개의 단계는 우선 제한효소 BamHI으로 절단하고 Klenow Fragment에 의해 블런트화 시켜 벡터를 선형화시키는 것이다. 얻어진 PAtBAG6 프로모터 단편을 GUS 리포터 유전자와 융합시켜 PAtBAG6:GUS 컨스트럭트를 형성할 수 있는 바이너리 벡터로 삽입시키는 것이다(도 9).

PAtBAG6:GUS 및 P35S:GUS 벡터를 floral dip 방법(Clough 및 Bent 1998)으로 아그로박테리움 투메파시엔스 균주 GV3101를 사용하여 형질전환 아라비도시스 전환체를 발달시키는데 사용하였다. 형질전환된 종자를 10 µg/mL 하이그로마이신(Duchefa, Haarlem, 네덜란드) 및 250 µg/mL 세파탁심(Duchefa, Haarlem, 네덜란드)을 포함하는 항생제를 보충시킨 MS 한천 배지 내에서 선별하였다. 2주령의 묘목을 37°C에서 2시간 열 스트레스를 가하고 모든 묘목을 이미 기술한대로 GUS 염색에 사용하였다.

[0081] 묘목을 1mg/mL 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-β-D-글루쿠로나이드, 200mM 인산나트륨(pH 7.0), 0.5mM ferricyanide 및 10mM DTT를 포함하는 용액에 침지시켰다. 그 후 암소 37℃에서 하룻밤 인큐베이션 시켰다. 조직을 70% 에탄올로 세척하고 GUS 이미지를 디지털 카메라를 사용하여 촬영하였다. 정량적 GUS 활성을 측정하기 위해 4-메틸움벨리페릴-β-D-글루쿠로나이드(MUG; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국)를 이미 설명한 것과 같이 약간 변형시켜 기질로 사용하여 묘목으로부터 얻어진 단백질 추출물 상에서 형광분석을 행하였다. 즉 50 μg의 단백질 추출물을 1mM MUG, 50mM 인산나트륨(pH 7.0), 10mM EDTA, 10mM DTT, 0.1% Triton X-100 및 15 % 메탄올을 포함하는 용액에 가하고 37℃에서 15분간 인큐베이션 시켰다. 반응을 0.2 M Na2CO3을 사용하여 여기 364nm 발광 447nm에서 Gemini XPS Fluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, 미국)를 사용하여 형광분석 하였다. 데이터는 단백질 1 마이크로그램당 임의의 형광 유니트로서 나타내었다. 에세이는 샘플을 3개의 독립적인 생물학적 시험을 통해 수행하였다.

[0082] (실시예 6) 기저 열저항성 시험

[0083] 기저 열저항성 시험을 위해 묘목을 2% (w/v) 슈크로오스를 포함하는 고체 영양 배지에서 이전 섹션에서 설명한 것과 유사한 성장조건하에서 성장시켰다. 5일령 묘목을 포함하는 플레이트를 플라스틱 일렉트릭 테이프를 밀봉시킨 후 지정된 시간만큼 45℃의 수욕상에 침지시켰다. 플레이트를 수욕상으로부터 제거시킨 후 동일한 명/암 사이클을 사용한 일반 성장조건 하에서 성장시킨다. 기저 열저항성을 생존율을 사용하여 결정하였다.

[0084]

[0085] (실시예 7) 전해액 누출 측정

[0086] 전해액 누출을 측정하기 위해 7일령 묘목을 5mL의 탈이온수에 넣고 22℃에서 웨이커에 배치시킨다. 용액의 첫 번째 전기전도도를 Orion 3 Star conductometer (Thermo Electron Cooperation, 미국)을 사용하여 측정하고 A로 지정하였다. 동일한 식물체를 암조건 하에서 45℃의 뜨거운 수욕상에 15분간 유지시키고 샘플을 22℃의 웨이커 위에서 3시간 회복시킨다. 다시 용액의 전기전도도를 측정하고 B로 지정하였다. 샘플을 15분간 오토클레이빙시킨 후 전기전도도를 세포내의 총 이온량을 수득하기 위해 다시 측정하였다. 이온 누출을 오토클레이빙 후에 A와 B의 전기전도를 측정한 비율의 퍼센트로 표시하였다.

[0087] (실시예 8) 시스-조절 프로모터 서열의 컴퓨터 모의 분석

[0088] 아라비도시스 BAG족 유전자의 프로모터 영역 내에 존재하는 시스-조절요소를 확인하기 위해 본 발명자들은 일반에게 입수 가능한 식물 시스-역할 DNA 조절요소 (PLACE; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>), 식물 시스-역할 조절요소(PlantCARE; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 및 식물 프로모터 데이터베이스 버전 3.0 (PPDB; <http://ppdb.agr.gifu-u.ac.jp/ppdb/cgi-bin/index.cgi>) 데이터베이스를 사용하여 측정하였다. 본 발명자들은 각각의 아라비도시스 BAG 유전자의 번역 개시 코돈의 1-kbp 이내의 업스트림 영역을 선별하고 스트레스 또는 호르몬 응답 조절요소의 존재를 분석하였다.

도면

도면1

	ACC (10 μ M)			MeJA (10 μ M)			ABA (10 μ M)			SA (10 μ M)	Legend + -
시간(h)	0.5	1	3	0.5	1	3	0.5	1	3	3	0.00 0.20 0.40 0.60 0.80 1.00 1.20 1.40 1.60 1.80 >2.00*
AtBAG1	-0.4	-0.1	0	-0.2	0	-0.1	-0.1	0.1	0.4	-0.6	
AtBAG2	0.1	0.2	-0.2	-0.1	0.9	0.4	0.2	1.7	1.4	0	
AtBAG3	-0.2	-0.2	-0.1	0	0.2	0.6	0	0	0.8	0.5	
AtBAG4	0.2	0.1	-0.3	0	0	-0.5	0	0.2	-0.4	0.2	
AtBAG6	0.5	0.9	-0.4	0.2	0.9	0.2	0	0.1	0.6	-0.7	
AtBAG7	0	0	0	0	0	0	0	-0.1	-0.5	0	

* 4- Fold

도면2

(a)

	GST-NPP1		Flg2		HrpZ		LPS1		CaCl ₂		Legend + -
시간(h)	1	4	1	4	1	4	1	4	1	4	0.00 0.20 0.40 0.60 0.80 1.00 1.20 1.40 1.60 1.80 >2.00*
AtBAG1	-0.2	-0.1	-0.5	0.2	-0.4	0	-0.1	0.2	-0.2	0.2	
AtBAG2	-0.6	0	0.4	-0.1	1.8	-0.5	0.9	-0.3	3	0.3	
AtBAG3	0	0	-0.3	0	-0.4	0.2	0	0	0	0.2	
AtBAG4	-0.4	-0.1	-0.2	0.5	-0.3	0.2	0	0.2	0.2	0.2	
AtBAG6	0	-0.2	-0.6	0.2	-0.5	0.4	-0.4	0	0	0.2	
AtBAG7	-0.4	0.2	-0.3	0.1	-0.4	0.2	0	0.2	0	0.2	

* 4- Fold

(b)

병원체	<i>B. cinerea</i>				<i>E. orontii</i>				<i>P. infestans</i>				<i>P. syringae</i> pv tomato DC3000				<i>P. syringae</i> ES4326/avrRPT2				<i>P. syringae</i> pv phaseolicola				Legend
시간(h)	18	48	96	120	6	12	24	2	6	24	4	8	16	24	48	2	6	24	+	-					
<i>AtBAG1</i>	-0.1	-0.4	-0.9	-1	-0.2	-0.2	-0.7	0	-0.5	-0.7	0.1	-0.2	-0.2	-0.1	0.1	0	-0.3	-0.6			0.00				
<i>AtBAG2</i>	-0.2	-0.9	-1	-1	-1.5	-1.3	-1.7	-0.8	-0.4	-0.9	0.4	-0.2	-0.6	-1.3	-0.3	-1.2	-0.4	-1.4			0.20				
<i>AtBAG3</i>	0.3	0.6	-0.5	-0.5	0.1	0.1	0.2	0.1	-0.1	1.3	0	0.3	0.3	0.4	0.1	0.1	-0.2	0.3			0.40				
<i>AtBAG4</i>	-0.1	-0.5	-0.1	0	-0.3	0	0.3	-0.3	0.2	0	0.2	-0.2	-0.2	0	0.2	-0.1	-0.3	0			0.60				
<i>AtBAG6</i>	0.6	1	-0.4	-0.1	0.4	-0.1	0	0.4	-0.3	1.1	0.1	0.2	0.5	0.7	-0.3	0.7	-0.2	0			0.80				
<i>AtBAG7</i>	0	0.5	0.3	0.1	0.2	0.6	0.3	-0.3	-0.1	-0.2	0	0.1	0.2	0	0	-0.3	0	0.2			1.00				
																					1.20				
																					1.40				
																					1.60				
																					1.80				
																					>2.00				
																					* 4-Fold				

* 4- Fold

도면3

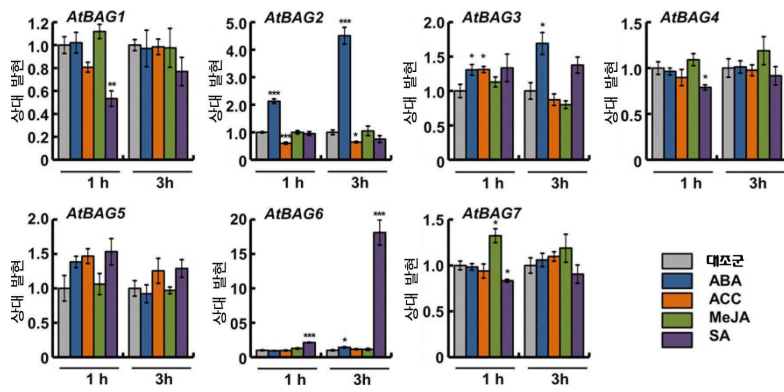
스트레스 시간(h)	추위						삼투압						염분						가뭄						Legend + -
	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12							
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	R	S	R						
AtBAG1	0.4	0.2	0.5	0	1.2	0.1	0.4	-0.2	0	-0.7	0.3	-0.9	0.9	-0.2	0.6	-0.8	0.6	-0.6	0	-0.1	-0.5	-0.1	0.2	0.1	
AtBAG2	-0.2	1.2	-0.6	0.3	-1.3	0.8	0	1.7	0.4	0.5	0.9	1.3	0.7	0.4	0.2	0.4	0.6	1.2	-0.2	0.7	-0.6	-0.6	0	0.1	
AtBAG3	0	0.1	-0.2	-0.5	-1.2	-1.1	0.3	-0.2	0.4	0.1	1.3	0	0	-0.2	0.5	-0.2	0.6	0	0.3	-0.1	0.5	-0.1	0.1	-0.1	
AtBAG4	0	0.1	0	0	-0.7	-0.4	-0.5	-0.3	-0.3	-0.7	-0.8	0	0	0.1	0.6	-0.3	0	0.1	0.4	-0.2	0.2	-0.5	0		
AtBAG6	-0.8	-1.3	-0.8	-1	1.4	-0.3	0	0.1	0	2	1.1	2.6	0.1	0.5	0.1	1.2	0.6	2.2	0.4	0	0.2	0.1	0.2	0	
AtBAG7	0	-0.3	0.2	0.1	0.2	0	-0.3	-0.3	-0.2	0	-0.1	-0.2	-0.2	-0.4	0.1	-0.1	0	-0.5	0	0	0	0.2	0.2	0	

스트레스 시간(h)	산화						UV-B						상처						열						Legend + -
	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12							
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	R	S	R						
AtBAG1	0.1	0.2	-0.2	-0.2	-0.1	-0.1	-0.3	0.5	-0.4	0.1	0.2	0.1	0.9	0.2	0.1	-0.1	0.3	0.1	1.1	-0.4	-0.4	-0.5	0	-0.8	
AtBAG2	-0.4	1.1	-0.3	-0.4	0	0.2	1.7	1.2	-1.3	-0.2	-1	-1.7	-0.1	0.9	-1.2	0.3	-0.1	-0.2	0.1	2.5	-0.5	0.6	-0.2	0.8	
AtBAG3	-0.2	0	0	0.2	-0.2	0	-1.1	0	0.1	0.5	0	0	0.2	0	0.2	0	-0.3	0.1	-0.5	0	0	-0.1	-0.3	-0.1	
AtBAG4	-0.3	0	0	0.2	-0.2	0	0	0.1	0.5	0.2	-0.3	-0.2	0.1	0	0	0.2	-0.8	0	0.2	0.4	0.6	0.2	0	-0.2	
AtBAG6	0	-0.2	-0.4	1.5	2.2	0.3	0.5	-1.2	0	-0.8	0.1	-0.1	0.4	-0.2	0	0.5	0.3	1.9	6.9	5.5	-1	0.3	2	2.8	
AtBAG7	-0.1	-0.1	0.2	0.1	0	0	-0.2	-0.3	0.3	0	0.3	0	0	-0.2	0.2	0	0	-0.1	-0.5	-0.8	0.2	0	-0.2	-0.5	

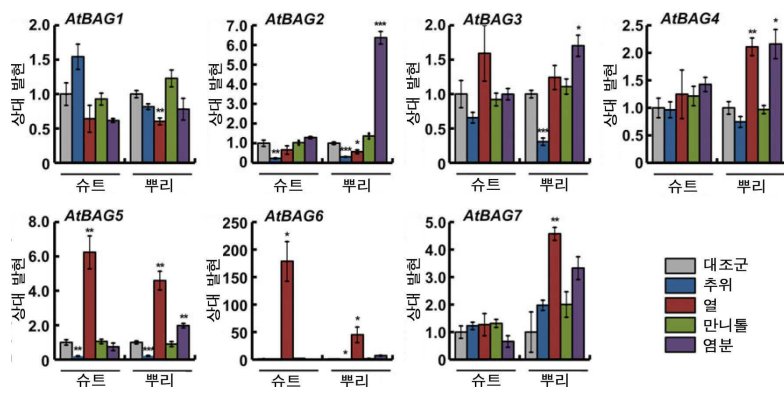
*4- Fold

* 4- Fold

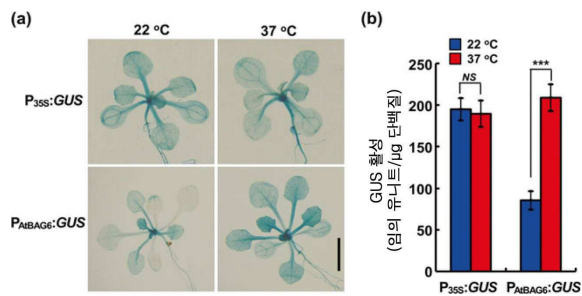
도면4



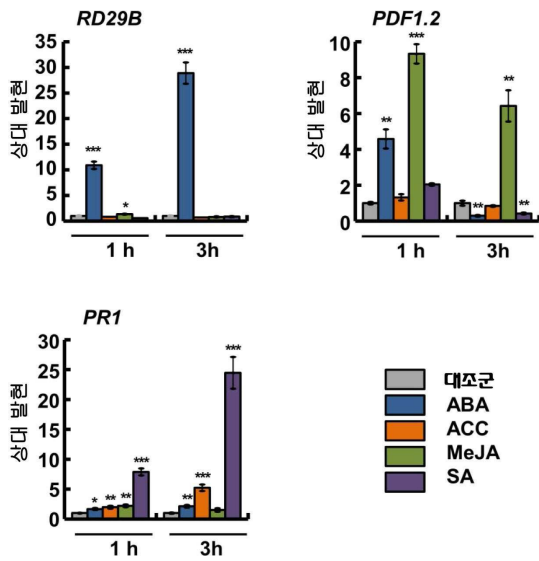
도면5



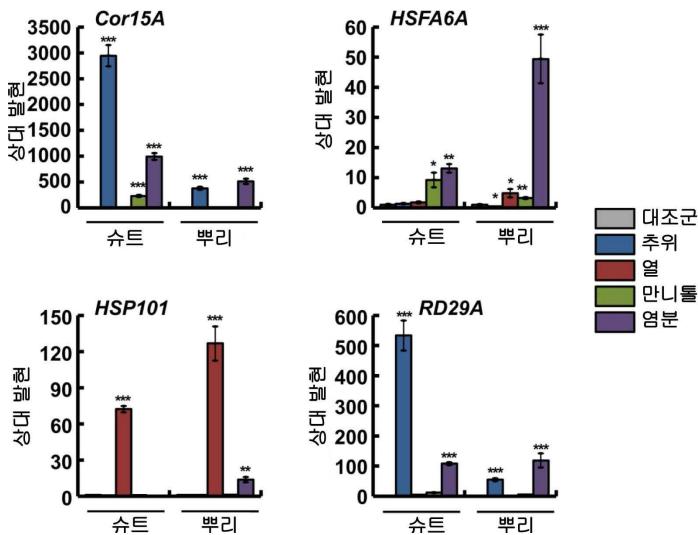
도면6



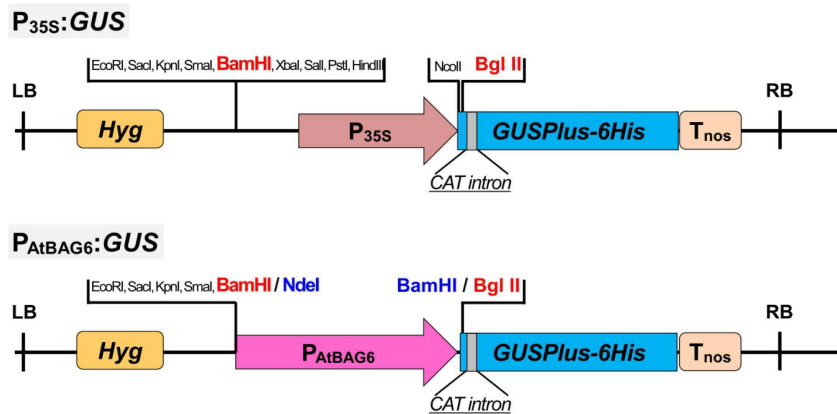
도면9



도면10



도면11



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Arabidopsis BAG genes expressed in response to stress in the
Arabidopsis plant

<130> KP-997

<160> 55

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1029

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atgatgaaga tgatgagaaa caaacgcaca aatcttccga cggcgggtat gactaatggc 60

ggtagagggt ccggcggcgg tggtgggtggc ggccggcaggg agtcaggcgg tcgtgatttg 120

gaaattagac ctggtgggtat gttgggttcag aaacgtaacc cggatttgga tcctgtcggg 180

ctccaccac caccgatgat cagagttaga atcaagtacg gtgccgtcta ccatgagatc 240

aatattagtc ctcaagcttc ttttggggag cttaaagaaga tgttgactgg accaacgggt 300

attcatcacc aagatcagaa gctaattgat aaagataaag agagggtatc gaaggcgttc 360

ctcgatgttt cgggagtgaag agataaatct aagatggtgc ttatagaaga cccgcttagc 420

caagagaaac ggtttttgga gatgaggaag attgctaaaa ccgaaaaggc gtctaaagcg 480

atatcgata ttagccttga agttgatagg ctccggcgac gagtttcggc ttttgagatg 540

gtaactaaaa aaggagggaa gattgcggag aaagatcttg taacgggtat cgaattgctg 600

atgaatgagt tgattaagtt ggatgcgatt gtagctgaag gagatgtcaa gttacaaaga 660

aagatgcagg tgaagagagt gcagaattat gtggaaacac tcgatgcctt gaaggtgaaa 720

aactccatgg ctaatgggca acagaaacag tcaagtactg ctccagagact tgcaccgatt 780

caagaacata acaatgaaga gagacaagaa cagaaaccga tacaatcgct catggacatg 840

ccgatacaat acaaagagaa gaagcaagag attgaagagg agcctaggaa ttcaggggaa 900

ggaccatttg tgtagattc ttctgctaaa tgggaaacat tcgatcatca tcccgtgacg 960

ccattgagct cgactactgc gaaaaataac gcgatcccgcc ccagggtttaa ttgggaattc 1020

tttgattga 1029

<210> 2

<211> 891

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

atgatgaaaa ttagtatcgg aacaacaact tccggcgacg gtgaaatgga gctccgacct	60
ggaggaatgg ttgtacagaa aaggacggat catagctcaa gcgtgccacg tggcattcgg	120
gttcgggtca aatcgggtc ggtccatcac gagatcagta tcaactctca atctactttc	180
ggggaattaa agaagatatt gtctggtcgc acaggagtgc atcatcaaga catgcagatt	240
atatacaaag acaaagaaag agactcaaag atgtttcttg atctttctgg tgtcaaagat	300
cgttcgaaac ttattcttat agaagatccc atttctcagg agaaacgtct ccttgagttg	360
aggaaaaatc ccaccaaaga gaaatcatct aaagcaatct ctgatattag ttccaagtc	420
gaaagactcg ccggacaact gtcggcgttt gatacagtga ttggtaaagg agggaaagtt	480
gaagagaaga atcttgagaa ttgatggag atgttgatga atcaattggt caagctcgat	540
gccatctcag gtgatggaga cgtaaattg aagaagaaga tgcagaatct aatgattcga	600
tttacaattt gttggaagga ggaaagatta cacaagtatg ttgaggctct cgacttggtg	660
aagatcaaga actcaaggca accgcaaagc aaaccaaagc cgcaatacaa ggaacgggaa	720
atgctgacat ttacgagga ggcgtcaagg aaaccgacgg cctcctcacc aagtcctcgg	780
gtgatcataa caacaagatg ggaaacgttt gattctagtt cagcctccac ggcaacccta	840
caaccggtta gaccggttca cccaaaattt aaatgggaat tattcaatta a	891

<210> 3

<211> 912

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

atgatgaaga tgaatacagg aacatcgccg tcggtcatcg gcggcgggac tagtggtaat	60
gagtgggagt ctgcacctgg aggaatggtt gttcaacgtc ggacagatca gaactccgat	120
gtgccacgtg tctttcgtgt tcgggttaaa tacgggtcgg tttatcacga gatcaacatc	180
aattcccaat cttccttcgg agagtgaag aagatgttgt ctgatcaagt gggacttcac	240
catgaagaca tgaaggtttt gtacaaagac aaagagagag attcaaagat gtttcttgat	300
ctttgtggag ttaaagatcg gtcaaagctt gttgttaaag aagatccaat ttctcaggag	360
aaacgtctcc ttgcaaaaag gaaaaacgcc gccattgaaa aagcttctaa atctatctct	420
gatattagtt tcgaagtcca cagactcgcc ggacaggtgt cggcgtttga gacggtgatt	480
aataaaggag gtaaagtga agagaagagt cttgtgaatc tgatagagat gttgatgaat	540
cagttattga gacttgatgc tattattgct gatggtgatg tcaaattgat gaggaagatg	600

caggtgcaaa gaggtcagaa gtacgttgag gcactcgacc tcttgaaagt caaaaactct 660
gccaataaag ttgaagtcaa caagtcctgc cgccacaaac cgcaaacgca aacgcgattt 720
gagcaacgcg atttggtatc gtttgtggag gaagaggagg aggagcctag gaattccaat 780
gcatcatcct catcaggtac tccggcgggt gtagcttcaa aatgggaaat gtttgattcc 840
gcatcgacgg ccaaggcggc tgaaacgggt aaaccgggtc ctccgcgatt caaatgggaa 900
ttcttcgatt aa 912

<210> 4

<211> 810

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

atgatgcata attcaaccga agaatcgga tgggaggtga gacctggtgg tatgctcgtc 60
caacgaagag acgacgccgc ttctccgac cacaacctc tccaggatcc cgactctgct 120
tccgcgctt ttgtcaaac catcagaatc actgtttctc atggtctatc gcaccacgat 180
cttcatatct ctgtcacgc cactttcggg gatgtgaaga aagctcttgt tcagaaaact 240
ggattggaag ctagtgaatt gaagatcttg ttgagaggag ttgagagaga tgatgctgaa 300
caattgcaag ctgtggtgt taaggatgcg tctaagcttg ttgttgtgtg tgaggatacg 360

aataagagag tggaacaaca gcctcctgtg gtaactaaag agatggaaaa agctattgct 420
gctgttaacg cggttacagg agaggtcgat aagctctcgg atagagttgt tgctttagaa 480
gttgcgtgta atggaggag gcaagtgcg gtgcgggagt ttgacatggc tgcagagctt 540
cttatgaggc agctgctcaa attggatggc attgagctg aaggggacgc taaagtacag 600
cgtaaggctg aggtacgtag aatccaaaac ttgcaggagg ctgtggataa gttgaaggca 660
agatgttcaa atccgtttgt ggatcagagc aaagctgcag ctgtaagcac tgagtgggaa 720
tcgttcggaa acggtgtcgg aagcttgaac cctcctccgc cagcttcgcc ttcggccaat 780

gtaactcaag attgggagaa atttgactga 810

<210> 5

<211> 648

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

atgaaacgtt caagaaaatt ctcatcgtcg acaacaaca ccaccgttat tcacactttc 60
tataatgacc atactacccc tccggcaacc aaagaaatcc cgattgaaac tccattaccg 120

gcgacgaaag ccaacgtcaa aacaaacgcc accgccgcag cagcgaggat tcagtctggc 180
taccgttctt ataggatccg aaacctatac aagaaaatct catccatcaa tcgggaagcg 240
aacctgttac agagcataat ccaacggcaa gaaacagtag acgccattag aagcgatgag 300

aaggaacgtc tgagaatgaa cgagactctg atggctctgc ttctgaaact agactccgtc 360
cctggtttag atccgacgat cagagaagct cggaggaaag tgagccgtaa gatcgtaggg 420
atgcaggaaa tactcgattc aatctcggag actaaagacg aaattcaatg gtggaattac 480
aacgatctcg gcggagtaga ctccggacaa ggccgtggcg cgtggccttt gtattgggaa 540
gaagcgttg aggaagagat gtgtagagag agagggcgtg aggagatgga gagattctgt 600
gtcagatatt tgggtttcag atgtttccag agattttca gagaatga 648

<210> 6
<211> 3132
<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana
<400> 6

atgatgcctg tgiacatgga tccatcaca ccatgtcaaa tgagaccaca ggaatactat 60
tatcaaggat ttgtaataa ctctcagcat atggcaatgg atgtccacc accgtgtcat 120
ggaagctcgc ttacaggcaa ctttctctgt tactggcctc cttgttatcc cccacaagta 180
ccgtaccatc aatgtctgat gaatcgttcc gctttccatc ctctcaccgc gtcttacgt 240
ccgtcttgtt acgttcatcc accatttcca gttggttatc aaccttggtt tgatgttgag 300
aaggatgtgc ctgggaagca tcactgcggg aaatgttctt cccagatgtg tgatttgaag 360

aaagacagag gcgttgtgat tgaagagcat gagcctgaga ttgagaaagg agaagctgta 420
cttccagttc gttctactaa ctgcccttac ccaattatat ggattcctca tgagaatgct 480
aggaatcagg aatatagaag ctctcttggg ttagggaagc ataaccagcc tctgtctgaa 540
gttagagctc ctgacaatat gacgattcag aaaagtttct ctgaatcttg gcgtggttgt 600
tttccatttg atgagagcag catgaagtcg ttggtacaga atcaagacag taaaaaggcg 660
cagaatggga aaaccgtgga agccccgttt gatatcagca aattcaaac cttattgcaa 720
ggtcaagaca tgaaggaagc gcaaatccag aagaacaagg aagagctggg acagcttacg 780

tatcctactt ctigggttcc atctcgtcgg aaacgagatg atgttgaagc ttctgagagt 840
agtaatgaag acaggaaaaa gatgcagaat gggaaaacgg tggaataccc gtttgatatac 900
agcatgataa aatccttaat ccagggtcaa gatgtgaagg aagcgagaa ccagaagaac 960
aaggaagagc ctggacaggt tccgtatcct attttttggg taccatctta tgggaacagg 1020

aaagatgttg aagcttctga gagtaaggag agtagtaatg aagggcgtaa cttggagtct	1080
tgccctctg atctccacag aatgaaggg cagataactc aagcaaaagg caaagaaggg	1140
aattttgagt gcaatgtact ttcagatgcg gaggagaaga gctctgtaat aaatatcca	1200
gtggcgaacc atctacagga accaagaaat attccagtga aactatcaga aaaccatctg	1260
cctaaaccaa cggagccaac caaaaggatt gcaaagaatg agccagttaa gagcacaaaa	1320
aaagagcagt cttcgtcatc atcagaagca tccaagtgc ctccggtttg tctgcgtgtt	1380
gaccattac cgaagagag aatggtggt tccaaatcag taagtcattc taaacggatg	1440
gaaaaatcta aggagactaa gatcgcggt cactgtcct ccaagaaggc tgaatcaagg	1500
actgttctg aggcctgtaa tgtaaatgt gaagacgcaa acgcagaaat gaagatggct	1560
gaggaagcc taaacgcatt aagaacagaa aaaggatcag ttgagagcaa ttctaattct	1620
caagaagaat caaacggtga gattattaaa cttgtgaag ctaaggagaa tagagaacag	1680
cctgcaaaga agagctttac agaagaggaa gctgctagaa ttatccaatc tatgtaccgt	1740
ggatatgacg tgagaagatg ggagccaatt aagaaattga aggagatagc cactgtccgt	1800
gagcagatgg gagatgttaa aaagcgtatt gaggcgtag aagcttctac tgatcagcac	1860
attgaagaga aggagattgt tgtaaatgga gaactggtga tgaaccttct ttgaaattg	1920
gatgctgtcg agggattgca tcttagtata agagagtta ggaaagcttt ggccacagag	1980
ctctcaagca ttcaagacaa gcttgactcc ttgaaaaata gttgcgccag tgcagagaaa	2040
gaggctgtaa aggaacaagt ggaaattaaa tctcagccta gtgactctcc agtgaacttg	2100
gagcactccc agctcacaga agagaacaaa atggtatctg acacgaattt agagaaggta	2160
cttcgtctgt ctcccgagga acatcctatg agcgtcttga atagaacaga tgaanaacag	2220
gctgaatcgg ctgctgaaac agaagaggga tatggattgt ttgaaacct ggcaacggat	2280
tctaagcaag ctactgaaaa tgcagcggt gcttctctga caacaattcc agagaaaatt	2340
ggagagggtg agactgttgt tccgggtaat ccaccgtcag ctgatggaaa cggaatgaca	2400
gtgaccaacg tagaggaaaa caaagccatg gtggtggaaa gtttgaggga gccaataaac	2460
gaattgccgc aaatggtgga agagactgaa acaaaactcca tacgggaccc ggagaatgct	2520
agtgaagtct ctgaagccga aaccaactca tcagaaatg aaaaccgaaa aggagaagat	2580
gatattgtat tgcattcaga aaaaaatgtc gagctctcag agctacctgt tggagtgatt	2640
gacgaggaaa cacagcctct ttcgcaagat ccatcgtcat catatactcg tgaagggaat	2700
atgactgcaa tggaccctaa aacagcgagc caggaggaaa cagaagtga tcaactaccc	2760
aacaactcca aaggcattgg ccaacagact tctgagccac aagatgaaaa agaacagtct	2820

ccagagaccg aagtcattgt gaaagaacag cctctagaga cagaagttat ttggaacgaa 2880

caggctccgg aaccggaat cactgaacct gggatatcaa aagaaccaa aaagctgatg 2940

gaggagaacc agcgattcaa ggaaacgatg gagacgttgg ttaaggcagg cagagaacaa 3000

ctagaagtca tatcgaaatt aaccagtcgg gtcaaaagcc ttgagaagaa actgtcacat 3060

aagaaaaaga cacagatcag acgtcgtgca agcaaaccaa tgtccgtaag tccaaccgat 3120

gccgtattat ga 3132

<210> 7

<211> 1341

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

atgactttgt tccatagact cgatctcatc gatccgtaca cgtgtacacc actcatcgtc 60

cgtgaaacct ccattgttga accttcatca ttgttcctag ggtttccttc cttcatcgac 120

gaagacattg aagatctctt cgagtittca tcacctaatc ctctcgatct attcgaaacc 180

gtgacggatc tggtaagat taagaaatct ccgtcgtctt gcaagtacaa ggtgattcgt 240

cggagattag agccggagta tccattgaag tatctttgtg accgtgtttc tgatttgaa 300

tcaaagtttg atagatttgt tagtcctaag agtgatagga agtatacatt gacgaaggag 360

ataaagggaa gtggtgagag gaagtataaa tgggaggcgg agattcaagg accgttgag 420

aggaagtata agttggaagc tgagattgaa ggttcgggag agaggaagta tagatggacg 480

acggagatta aaggagggaa gaaggatgag gaagggttaa agttagctgc ttggaagaag 540

gagaaggcga aagctaaagc tattgctgct gctgaagcgg agaagaagaa gaataagaat 600

aagaagaaga gttataattg gacgacggag gtgaagagtg agagagagaa tggtagggtt 660

tcgcatactt atatcatcaa ggctactact ggaggagaga aaaagaagaa acatgaggag 720

aaggagaaga aagagaagat agagactaag agcaagaaga aggagaaaac tcgtgttggtg 780

gtgattgagg aggaggaaga agaagatgat gagtcgtcag aacatggtgc tatcgttctt 840

aggaaggcgt ttccagaag gaatggagca gttaggacca agaaggggaa gaacaaggaa 900

atgccacctg aatatgcggc tgtgatgac cagaggccct tcaaagctta ttgattcgt 960

cgctcaaaat cattgcgtgc tcttcgtgat cttgctattg caaagactaa acttaaggag 1020

ctaagagctt cttccacaa cttcagctac cgtcgctga ttgctcgtga tggagaggag 1080

cgtcagaaat tctcagagaa gatcattgta ctctctctca ctgttgacgc catagaggga 1140

gttgatgtga tggttcgagg agcgaagaga tcaatggtgg atgagctgga agcaatgtta 1200

gatgtggtag acccgcaacc gcaggggaaa tcattgtcga tgagaagaag aacatttgat	1260
atgccagaca gtttgatccg caaagaaatc gcagaggag tgactcagat tgtgcagatg	1320
cttgaacgg aagaagaatg a	1341
<210> 8	
<211> 5	
<212> DNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 8	
ccgac	5
<210> 9	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 9	
canntg	6
<210> 10	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 10	
waacca	6
<210> 11	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 11	
cngttr	6
<210> 12	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 12	
aaaactttc	9

<210>	13	
<211>	7	
<212>	DNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	13	
tacggtc		7
<210>	14	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	14	
gagaagaata		10
<210>	15	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	15	
aaaaactttc		10
<210>	16	
<211>	5	
<212>	DNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	16	
tgacg		5
<210>	17	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	17	
agaaaattcc		10
<210>	18	
<211>	8	
<212>	DNA	

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 18

atttcaaa 8

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 19

tgatgcactt gtgtgtgaca a 21

<210> 20

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 20

gggactaaaa cgcaaaacga 20

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 21

agatgatgag aaacaaaccg acaa 24

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 22

cggaacctct accgccatta 20

<210> 23

<211> 18

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	23	
	aaggcaaccg caaacgaa	18
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	24	
	tgtcagcatt tcccgttcct	20
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	25	
	gtctcgacct ggaggaatgg	20
<210>	26	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	26	
	acgtggcaca tcggagttc	19
<210>	27	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	27	
	agctgtaagc actgagtggg aat	23
<210>	28	

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 28
 tggcggagga gggttca 17

<210> 29
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 29
 tcccgattga aactccatta cc 22

<210> 30
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 30
 gcggtggcgt ttgttttg 18

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 31
 cctggcaacg gattctaagc 20

<210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 32

ggaattgttg tcgaggaagc	20
<210> 33	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 33	
gttcgaggag cgaagagatc a	21
<210> 34	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 34	
gcgggtctac cacatctaac att	23
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 35	
aacgaggcca caaagaaagc	20
<210> 36	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 36	
cagcttcttt acccaatgta tctg	24
<210> 37	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	

<400>	37	
gcttccatca cccttatctt c		21
<210>	38	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	38	
gccggtgcgt cgaaa		15
<210>	39	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	39	
cacaatctcc tccacctgat ga		22
<210>	40	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	40	
gcacgacgaa tgaccttaat aaga		24
<210>	41	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	41	
gtctccgccg tgaacatgt		19
<210>	42	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 42

cgtgttcgca gcgtagttgt 20

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 43

ccctagatgc tttaagcaca ataatttct 29

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 44

atcgatgtca tcaccatact cttctgg 27

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 45

gttactgac ccaccaaaga a 21

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 46

ggagactcat cagtcacttc ca 22

<210> 47

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	47	
	gcaagcagaa gaaccaatca	20
<210>	48	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	48	
	ctttggatgc tcccttctca	20
<210>	49	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	49	
	aaaaagcagg catatgaacg aaacccaaat aatt	34
<210>	50	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	50	
	agaaagctgg gttgtgatgg atccatgta	29
<210>	51	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	51	
	atgatgcctg tgtacatgga t	21

<210> 52
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 52
 agagaaggta cttcgtctgt ctcc 24

<210> 53
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 53
 atgactttgt tccatagact cgat 24

<210> 54
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 54
 ttcttcttcc gtttcaagca t 21

<210> 55
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 55
 tggttcacgt agtgggcat cg 22