

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0041792

(43) 공개일자 2006년05월12일

(21) 출원번호 10-2005-0011098

(22) 출원일자 2005년02월07일

(30) 우선권주장 1020040009605 2004년02월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인 좌남수
경기 용인시 풍덕천2동 현대프라임아파트 208-1102호

(72) 발명자 좌남수
경기 용인시 풍덕천2동 현대프라임아파트 208-1102호
김정아
전라남도 순천시 덕월동 신보아파트 가동 908호
정영호
전라북도 전주시 덕진구 고량동 1112번지
이주희
경기도 용인시 성북동 성남마을 벽산첼시빌 511동 807호

(74) 대리인 배윤정

심사청구 : 있음

(54) 식물의 병저항성 유도 유전자 및 프로모터

요약

본 발명은 식물의 병저항성에 관여하는 *OsEDR1* 유전자 및 프로모터, *OsEDR1* 단백질에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 *OsEDR1* 유전자는 벼에서 다양한 생물적/비생물적 스트레스에 대하여 신호전달 체계의 상단부에서 신속히 반응함으로써, 그 방어(defense)/스트레스(stress) 경로에 대하여 조기에 대응하고 식물이 신속히 병에 대한 방어작용을 활성화시켜 병저항성을 유도하게 하는 특이적 기능을 갖도록 한다.

대표도

도 1

색인어

OsEDR1, 벼, 병저항성, 스트레스

명세서

도면의 간단한 설명

- 도 1은 본 발명에 따른 *OsEDR1* 유전자의 서열,
 도 2는 *OsEDR1* 단백질의 아미노산 서열,
 도 3은 *OsEDR1* 프로모터 GUS 융합 construct,
 도 4는 몇가지 신호분자에 의한 GUS 발현 분석사진,
 도 5는 신호분자와 스트레스에 의한 도 1의 *OsEDR1* 유전자의 전사적 조절을 나타내는 그래프,
 도 6은 벼 묘목 앞에서 다양한 스트레스에 반응하여 나타나는 시간단계별 일시적 조절을 나타낸 그래프,
 도 7은 *OsEDR1*의 유전자 기능분석을 위하여 구축한 형질전환체 생산용 벡터들의 구조를 나타내는 도면,
 도 8은 과발현 형질전환체 라인에서 *OsEDR1* 유전자와 저항성 관련 *PBZ1* 유전자 조절을 나타내는 사진,
 도 9는 *OsEDR1* 의 야생형과 사일런싱(dsRNAi)형질전환 식물체의 사진,
 도 10은 사일런싱 형질전환체 라인에서 *OsEDR1* 유전자와 저항성 관련 *PBZ1* 및 *PR1a* 유전자 조절을 나타내는 노던블롯 분석 사진,
 도 11은 벼에 도열병균 포자를 접종하여 병원균 테스트를 실시한 4일 후에 벼에 나타나는 병징을 나타내는 사진,
 도 12는 *OsEDR1*-GFP 융합단백질의 충격이 양파세포에서 핵으로 이동한 것을 나타내는 사진,
 도 13은 *OsEDR1* 프로모터의 서열,
 도 14는 *OsEDR1* 프로모터의 5가지 construct,
 도 15는 *OsEDR1* 과발현 형질전환체에 벼흰잎마름병균인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (A)를 접종하였을 때의 식물체의 사진.
 도 16은 야생형 니폰바레(Nipponbare) 및 *OsEDR1* 과발현 라인들로부터의 곡물의 형태 및 수확량의 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 병저항성에 관여하는 *OsEDR1* 유전자 및 프로모터, *OsEDR1* 단백질에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 *OsEDR1* 유전자는 벼에서 다양한 생물적/비생물적 스트레스에 대하여 신호전달 체계의 상단부에서 신속히 반응함으로써, 그 방어(defense)/스트레스(stress) 경로에 대하여 조기에 대응하고 식물이 신속히 병에 대한 방어작용을 활성화시켜 병저항성을 유도하게 하는 특이적 기능을 갖는 유전자에 관한 것이다.

식물은 생활사에 있어서 물, 온도, 빛과 토양을 포함하는 아주 다양한 종류의 비생물적 환경 스트레스와 병원성을 갖는 미생물에 의한 생물적 스트레스가 주어진다. 이런 모든 스트레스들은 식물체에 여러 가지 형태의 물리적 손상의 원인이 될 수 있다. 왜냐하면 식물은 움직일 수 없어서 식물 스스로의 신진대사작용이나 구조적 변형을 통해서 만이 방어할 수 있기 때문이다.

그리고 방어를 하기 위해서는 특정 단백질의 생산이 유도되거나 억제 되도록 스트레스의 자극에 반응하는 유전자가 있어야 한다. 이러한 식물의 스트레스에 대한 내성은 세포적 수준에서 설명되어지는데, 만일 식물의 시스템에 결점이 생긴다면 그 세포의 생존에 문제가 발생할 것이다.

한편 식물 스트레스 내성에 관련한 많은 연구들이 수행되고 있다. 그러나 다양한 환경 스트레스로부터 세포괴사를 예방하는 분자 생물학적 기작은 아주 복잡하고 많은 유전자에 의해서 조절되어지고 있어서 지속적인 정보가 요구되어 진다.

생물적 비생물적인 스트레스의 효과적인 인지능력과 적절한 반응을 위한 조직적인 신호전달 체계는 식물체가 성장하고 생존하는데 중요하다.

식물체는 어떤 자극을 인지한 후에 일어나는 신호전달 경로 중에서 방어/스트레스 반응의 복잡한 네트워크가 잘 발달되어 있었는데 이것은 진화적으로 볼때 동물, 곰팡이에서와 같이 미토젠-엑티베이트드 프로틴 키나제(mitogen-activated protein kinase(MAPK)) 캐스캐이드로 보존되어져 있다.

MAPK 캐스캐이드는 연속적 프로틴 키나제의 연속적 인산화과정으로서 모든 진핵생물에서 세포외부에서의 신호로부터 세포내의 목표(target)에 이르기까지의 형질도입, 변환 과정의 기능을 수행한다.

이 캐스캐이드는 MAPKs 외에도 상위 MAPK 키나제(MAPKKs) 와 최상위 MAPKK 키나제 (MAPKKKs) 3단계로 구성되어 있다.

MAPKs는 MAPKKKs에 SXXXS/T 모티프(motif)로 보존되어 있는 세린(serine)과 트레오닌(threonine)/세린(serine) 잔기에 의해서 활성화된 MAPKKs가 인산화시켜줌으로써 활성화된다(J.W. Widmann, 1999, - W. Ligterink, 2001).

MAPKKK 패밀리(S. Jouannic, 1999)는 MAPK 경로 구성요소에서 가장 큰 그룹을 이루고 있고 이스트와 포유동물 시스템에서 뿐만 아니라 경제적으로 중요한 식물체에 이르는 중요한 연구대상이다.

애기장대(*Arabidopsis thaliana*)(C. Jonak, 2002) 병 저항성 경로에 관한 연구를 통해서 얻어진 내용들을 보면 최근에 일부의 MAP 키나제가 과다발현 되었을 경우 저항성이 크게 증가되었다는 결과가 보고 되었었는데(Yang et al 2003) 이는 식물에서도 다른 진핵 생물과 마찬가지로 수용체(Receptor) → G 단백질 → MAP 키나제 경로를 거치는 비슷한 방어관련 신호전달 네트워크가 있을 것이라는 추측을 가능케 한다.

그 동안 식물 MAP 키나제 에 관한 연구는 주로 MAP 키나제 캐스캐이드 가장 하단부에서 작용하는 것으로 알려진 MAP 키나제들에 대한 연구가 대부분이었다.

MAP 키나제 캐스캐이드 상단에서 기능하는 것으로 알려진 MAP kinase kinase kinase(MAPKKK)에 대한 연구는 애기장대의 EDR1의 기능이 밝혀짐으로써 최초로 그 역할이 주목 받기 시작하였는데, EDR1은 병방어관련 신호전달의 positive regulator로서의 기능을 하고 있는 것으로 알려졌다.

EDR1 돌연변이체의 연구를 통해서 EDR1상의 키나제 영역이 저항성과 감수성을 결정하는데도 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다 (D. Tang et al 2002). 그러나 현재까지 EDR1을 통한 병 저항성 신호전달 경로에 관한 연구는 그 하단부의 상호작용 단백질이 어떤 종류인지를 포함하여 많은 궁금증을 남겨두고 있다.

벼(*Oryza sativa* L.)는 아시아에서 수 세기에 걸쳐 인간의 생존에 있어서 사회 경제적 측면에서 넓게 영향을 미쳐 오고 있으며, 단자엽 식량작물의 대표적 연구모델로서 세계적으로도 가장 중요한 식량작물이다.

또한 벼는 세계에서 세 번째로 많은 수량을 기록하고 있으며 60여종 이상의 각종 병해가 발생되고 있다. 그 중 대표적으로 벼도열병(*Magnaporthe grisea*)이 가장 중요한 병원균으로 알려져 있다. 실제로 병 발생에 의한 피해가 극심할 경우 50~90%의 감수를 가져오게 된다.

이러한 벼와 벼도열병의 기주-기생체간의 상호작용은 연구하고자 하는 방어/스트레스(defense/stress) 반응 연구의 주요 모델로서, 인위적이지 않고 오랜 시간에 걸쳐 진화, 형성된 식물과 병원체 상호간의 유전자의 발현양상을 연구할 수 있다.

이에 본 발명자들은 식물체에서 병저항성에 관여하는 유전자를 찾고자 노력한 결과 벼에서 병저항성에 관여하는 *OsEDR1* 유전자 및 프로모터를 분리하였고, *OsEDR1* 유전자는 벼에서 다양한 생물적/비생물적 스트레스에 대하여 신호전달 체계의 상단부에서 신속히 반응함으로써, 그 방어(defense)/스트레스(stress) 경로에 대하여 조기에 대응하고 식물이 신속히 병에 대한 방어작용을 활성화시켜 병저항성을 유도하게 한다는 것을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 식물에 있어서 병 저항성관련 신호전달 체계의 상단부에서 다양한 유전자들의 발현을 조절하고 저항성을 유도하는데 중추기능을 수행하는 유전자를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또다른 목적은 상기 유전자를 포함하여 병저항성을 부여하는 형질전환용 발현벡터를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 식물세포 및 식물세포를 포함하는 형질전환 식물체를 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 상기와 같은 본 발명의 목적들을 달성하기 위하여 창출된 것으로서, 벼에서 병저항성관련 유전자들의 발현을 조절하는 서열번호 1로 기재되는 염기서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 *OsEDR1* 유전자 또는 그 단편을 제공한다.

또한 본 발명은 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 가지는 *OsEDR2* 유전자 또는 그 단편을 제공한다.

또한 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 *OsEDR1* 단백질 또는 그 변이형 단백질을 제공한다.

또한 본 발명은 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 *OsEDR2* 단백질 또는 그 변이형 단백질을 제공한다.

또한 본 발명은 서열번호 5로 기재되는 염기서열 또는 그 단편으로 구성되는 *OsEDR1* 유전자의 프로모터를 제공한다.

또한 본 발명은 병저항성을 부여하는 *OsEDR1* 또는 *OsEDR2*의 유전자가 삽입된 발현벡터를 제공한다.

또한 본 발명은 프로모터가 추가로 삽입된 발현벡터를 제공한다.

또한 본 발명에 의한 발현벡터를 포함하는 형질전환된 식물체를 제공한다.

상기 형질전환 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체를 제공한다.

또한 본 발명의 유전자 또는 프로모터를 유효성분으로 하는 식물의 병저항성 유도 유전자 치료제를 제공한다.

또한 본 발명의 단백질 또는 그 변이체를 유효성분으로 하는 식물의 병저항성 유도 조성물을 제공한다.

본 발명에서는 *AtEDR1*의 염기서열을 이용해 벼 유전체 데이터베이스를 조사해서 본 발명의 *OsEDR1* 유전자를 분리해 내었고 이 유전자가 식물의 방어/스트레스(defense/stress) 반응에 관여한다는 것에 대한 증거를 실험을 통해 제시하고, 그 기능에 관한 연구를 형질전환 벼 라인의 생산을 통해 진행하였다.

상기에서 분리해 낸 데이터에서 도 1에 표시한 부분을 PCR로 증폭해서 프로브로 사용하였다.

병원균 처리 후의 벼 cDNA 유전자 라이브러리를 이용하여 3차례에 걸친 스크리닝으로 12개의 양성인 클론을 얻을 수 있었고 각각의 크기가 다양한 12개 클론 모두를 서열 분석을 하였다.

상기 데이터를 이용하여 NCBI 블라스트 서치(blast search)를 해 본 결과 대부분 키나제와 관련된 유전자들이었으며, 12번 하나의 전장(full length) *OsEDR1* cDNA를 찾아낼 수 있었다.

*OsEDR1*의 전장 cDNA 염기서열을 실제로 *AtEDR1*과 비교해보면 키나제 영역의 상동성이 다른 부위에 비해서 상대적으로 높은 것을 알 수 있다.

*OsEDR1*의 cDNA는 3311bp이고 이것은 3051bp의 ORF(오픈 리딩 프레임)과 1017개의 아미노산, 그리고 분자량은 113046.13, pI는 9.03이다(compute pI/MW tool, ExPASy, 도 1A). 리딩 프레임은 cDNA에서 가장 긴 ORF이고, 개시코돈과 종결코돈 모두 갖추고 있는 완전한 형태의 코딩영역인 서열이다.

한편 아미노산 수준에서 *OsEDR1* 단백질은 애기장대의 *AtEDR1*(Accession No. AF305913)과는 46.5%, 보리의 *HvEDR1*(Accession No. AF305912)와는 59.5%의 유사성을 보였다. *EDR1*의 키나제 영역만 봤을 때는 80%의 동일성을 보였는데 이것은 단자엽인 벼와 보리가 쌍자엽인 애기장대에 비해 조금 더 유사함을 말해준다.

*OsEDR1*은 아르기닌-리치 영역(arginine-rich region(아미노산 31-66, 박스부위)), 겹쳐져서 두 갈래로 나누어지는 뉴클리어 로컬라이제이션 신호(nuclear localization signal(NLS-BP-1, amino acids 42-59/ 52-69, 박스부위)), 티로신 키나제 인산화 부위(tyrosine kinase phosphorylation site)(TKPS, 아미노산 159-164 and 619-627, boxed), 프로틴 키나제 ATP 결합 부위(PK-ATP-BS, 아미노산 741-763, boxed), 세린/트레오닌 단백질 키나제 활성 부위(S/T-PKAS, 아미노산 854-866, boxed), 티로신 프로틴 키나제 부위(아미노산 809-923, 848-867, 895-906, 914-937, and 958-981)와 프로틴 키나제 영역(아미노산 753-983, 음영부분)으로 구성되어 있다(InterProSca, ExPASy; 도 2 참조).

그리고 흥미롭게도 *OsEDR1*은 HSP(열 쇼크 단백질) 70 부위(domain) 또한 가지고 있다.

여기서 NLS와 HSP 70 부위는 식물의 MAPKKK가 가지고 있지 않다고 알려져 있으나, 최근 파슬리 세포에서 밝혀진 바에 의하면, fungal elicitor에 의해서 elicitor responsive MAPK (*ERMK*, *AtMAP3*와 유사)의 활성화 결과 MAPK가 핵으로의 이동이 일어난다고 하는데(Ligterink, 1997), 이것은 *ERMK*가 인산화 전사 인자로서 식물의 방어반응에 관여한다는 가능성을 제시해 주고 있다.

또한 상기와 동일한 방법으로 또하나의 벼의 *OsEDR2* 유전자를 분리하고 서열을 분석해 본 결과 서열번호 2에 기재된 바와 같이 앞서 규명한 *OsEDR1* 유전자와 90% 이상의 상동성을 가지는 유전자임을 확인하였고 그 단백질인 서열목록 4에 기재된 *OsEDR2* 또한 *OsEDR1* 단백질과 90% 이상의 상동성을 가짐을 확인하였다.

본 발명의 형질전환체 생산용 벡터는 상기 유전자를 통상적인 방법에 따라 적절한 발현벡터에 삽입하여 얻을 수 있다. 이러한 벡터로는 상기 유전자를 식물에서 발현할 수 있는 것으로 대표적인 예로는 pCamLA 벡터를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 형질전환 식물체는 상기 발현벡터를 통상적인 방법에 따라 형질전환시켜 식물세포에 도입한 후 식물체를 재배함으로써 얻을 수 있다.

또한 본 발명의 *OsEDR1* 유전자 또는 그 프로모터를 유효성분으로 하는 식물의 병저항성 유도 유전자 치료제를 제조할 수 있으며, *OsEDR1* 단백질 또는 그 변이체를 유효성분으로 하는 식물의 병저항성 유도 조성물을 제조할 수 있다.

한편 본 발명인 *OsEDR1* 유전자의 기능을 규명하기 위한 실험을 수행하였다.

다양한 자극에 대한 *OsEDR1*의 발현을 알아보기 위해 전체 RNA가 100uM의 각각의 JA, SA, ABA, CN, EN, and 구리, 카드뮴(cadmium) 수은(mercury); 0.1% CT; 1mM ET; 10mM H₂O₂; drought; 150mM의 NaCl과 슈크로오스(sucrose) 각각; 그리고 UV-C 조사(생체외)로 처리된 잎 조각들로부터 추출되고 노던 분석이 수행되었다.

그 결과 *OsEDR1*의 mRNA 발현은 절단에 의한 상처(wounding)에 의해서 뿐만 아니라 단자엽과 쌍자엽 식물체의 방어/스트레스 반응에 관여하는 전체적인 신호전달 분자인 JA(P. Reymind, 1998), SA(P. Reymind, 1998), ABA(E. Grell, 1998), 2차 전달자(second messenger)인 H₂O₂(J.J. Grant, 2000), PP 인히비터(T.A. Millward, 1999)인 CN과 EN(R. Rakwal, 2001), fungal elicitor[CT (L.A. Hadwiger, 1999)] drought, high salt(NaCl) sugar(sucrose), 중금속(M. Hajdich, 2001)인 구리(copper), 카드뮴(cadmium), 수은(mercury), 고온 (37°C) 스트레스에 의해서 15분 만에 유도되어진다는 것을 알 수 있다.

또한 시간단계별 발현양상을 알아보기 위해 신호분자 JA, SA, ET, ABA 및 H₂O₂를 처리하였을때 *OsEDR1*의 발현양상을 30, 60, 90 및 120분 동안의 짧은 시간단위별로 조사하였다.

그 결과 *OsEDR1*의 전사체가 최고가 되는데 걸리는 시간이 아주 짧은 것과, 사용되는 elicitor의 형태에 따라 유도의 수준이 다양한 것에서, *OsEDR1*은 여러 가지의 신호가 주어지면 빠른 시간 안에 잠깐동안 조절되어짐을 알 수 있다. 따라서 본 발명인 *OsEDR1*은 다양한 스트레스에 반응하고 여러 가지의 신호가 주어지면 빠른 시간 안에 잠깐동안 조절되어지는 유전자인 것이다.

아울러 *OsEDR1*의 기능분석을 하기 위하여 사일런싱, 안티센스, 과발현의 3가지 형태의 컨스트럭트를 제조하여 각각의 형질전환 식물체를 생산하였다.

*OsEDR1*의 과발현 형질전환 식물체는 19개의 라인이 만들어져 있으며, 야생형에 비해 잘 크지 못하고 느린 성장속도를 보이고, 잎에 전형적인 세포사(cell death) 현상이 약 50% 정도의 라인들에서 관찰되었다.

안티센스 형질전환 식물체는 22 라인이 확보되어 있고, 모든 생육단계에서 형질전환 식물의 표현형은 야생형과 크게 차이가 없고 특별한 표현형이 관찰되지 않았다.

사일런싱 형질전환 식물체는 36개 라인이 확보되어 있고, 이것은 *OsEDR1*의 기능이 억제된 돌연변이체로 볼 수 있다. 이러한 형질전환 식물체의 경우 그 표현형이 야생형(wild)과 비교해볼때 강력한 세포사 표현형이 관찰되었다.

이 현상은 최근에 병저항성 유전자와 관련하여 보고되고 있는 병반(lesion) 유사 현상의 일종으로 병원균 처리가 되지 않은 식물에서 유전자이상으로 인하여 병이 난 것처럼 보이는 현상이다. 즉, 사일런싱과 과발현 형질전환체의 표현형이 세포사 현상을 보이고 이들 형질전환체에서 *OsEDR1* 발현이 증가되는 것을 볼 수 있는데 이는 *OsEDR1*이 세포사에 관여한다고 볼 수 있다.

본 발명은 *OsEDR1* 유전자를 이용하여 형질전환체 생산용 벡터를 만들고 식물의 형질전환을 유도하여 병저항성이 강화된 식물을 제공한다. 특히 병저항성 식물체를 만들어냄으로써 농약사용량을 대폭적으로 줄일 수 있는 환경 친화적 내병성 신 품종을 개발할 수 있고, 이를 통해 농업생산성 제고 및 비용절감 등의 경쟁력을 강화하는 데 큰 기여를 할 수 있다.

이하, 실시예 및 첨부된 도면을 참조하여 본 발명을 상세히 설명한다.

1. 벼의 재배 및 샘플링

벼를 멸균상태인 배지에 키우기 위하여 볍씨를 깐 종자를 살균하여 키운 식물체를 사용하였다.

볍씨를 까서 100% 에탄올에 30초간 흔들어 준 다음 1/2락스에 담귀 20분간 웨이킹 시켜주고 멸균수로 4~5번 행귀준 다음 1/2MS 배지에 치상한다. 28℃ 챔버에서 2주 정도 키운 식물체를 사용한다.

2. 벼 유전체 DNA의 분리

수확된 벼는 -80℃에 보관하며 일정량의 샘플에 액체질소를 부어 얼려가며 고운분말 상태로 만든다.

상기 분말 100mg~200mg 정도에 엑스트랙션 버퍼(100mM Tris-Cl, pH8.0, 100mM EDTA, pH8.0, 250mN NaCl) 1ml을 넣고 50℃에서 1~2시간 배양시킨다. 프로티네이즈 K(10ug/ml) 0.5ul 와 10% laurylsarcosine을 100ul 넣고 55℃에서 1시간 배양시킨다.

배양후 3000rpm에서 15분 원심분리 시킨 후 상등액만 새로운 튜브에 옮기고 페놀/클로로포름을 동량 넣어 1시간 동안 천천히 흔들어준다.

충분히 분리된 시료는 3000rpm에서 15분 원심분리 후 위 과정을 다시 한번 반복한다.

분리된 상등액에 이소프로판올(isopropanol)을 60% 넣고 인버트(invert)한 후 5000rpm에서 15분 원심분리 하고 70% 에탄올(Et-OH) 1ml을 넣어 씻은 다음 펠렛(pellet)을 취하여 TE 50ul에 녹인다.

3. cDNA 유전자 라이브러리 스크리닝

벼에 병원균(*Magnaporthe grisea*)을 처리한 후 만든 cDNA 라이브러리를 사용하였다.

가. *OsEDR1* 프로브 제조

벼는 애기장대 다음으로 전체 유전체 분석이 끝난 단자엽의 대표적 식물이다. 이에 애기장대에서의 *AtEDR*이 벼에도 존재하는지 여부를 데이터베이스 상에서 알아볼 수 있었다. 그리고 *AtEDR*의 서열에서 MAPKK 키나제로서의 서열 특이적인 부위를 찾아 프라이머(*OsEDR1*-F 5'-CTTGTGATTGGTGAAGGATTGGC-3' *OsEDR1*-R 5'-GCAATTAGGACGGTGAAGGATCT-3')를 제작했다.

그리고 벼 유전체 DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 280bp의 프로브를 제조하였다.

나. 스크리닝

제 1차 스크리닝 시에는 150mm LB 플레이트에 50,000 pfu/plate가 되도록 재조합 파아지를 감염시킨 XLI-Blue MRF 숙주세포를 도포하였다.

라이브러리를 37℃에서 배양한지 12시간 후에 플라크가 형성되면 플레이트를 4℃에서 2시간 이상 방치한 후 하이본드(Hybond-C) 막(Amersham)에 5분씩 레플리카(replica)로 플라크(plaque)를 옮겼다.

파아지 DNA가 부착된 막을 변성 용액(0.5N NaOH, 1.5M NaCl)에 2분 동안 적신 후, 중성화 용액(1.5M NaCl, 0.5M Tris-Cl(pH 7.4))을 두 차례 각각 2분씩 적서 중화시킨 다음 2X SSC 에 담귀 30초간 세척 후 상온에서 충분히 건조한다.

상기 건조된 막은 다시 80℃ 에서 2시간 구워 DNA를 막에 확실히 고정시킨다. 서던 혼성화를 통해 ³²P로 표지한 *OsEDR1* 프로브와 혼성화되는 양성 플라크를 0.5cm의 스포이드 뒷부분을 이용하여 뽑아낸 후 1ml TM 버퍼(10mM MgCl₂, 10mM 트리스(Tris)(pH 7.6))에 담귀 4℃에 보관하였다. 2차, 3차 스크리닝도 이와 동일한 방법으로 하였으나 제 2차 스크리닝 시에는 90mm LB 플레이트에 100pfu/플레이트, 3차 스크리닝 시에는 20pfu/plate 농도가 되도록 도포하였다.

다. 절제(Excision)

시험관을 이용하여 3ml의 LB 액체 배지에 XL1-Blue MRF 와 XL0LR 세포를 30℃에서 오버나이트(overnight)로 키운 후, 3000rpm에서 10분간 원심분리 후 10mM MgSO₄ 1ml 에 리서스펜트(resuspend) 시켜서 OD₆₀₀ 값 1.0이 나오게 한다.

LB 50ml 에 각각을 250μl 정도씩 시드(seed)하여 OD₆₀₀ 0.3 ~ 0.4 가 나올때까지 2시간 정도 키운다. 그 후 3000rpm 에서 10분 원심분리하여, XL1-Blue 는 10mM MgSO₄ 3 ~ 4ml 에 리서스펜트하여 OD₆₀₀ 값이 5.0 정도 나오게 하고, XL0LR 는 10mM MgSO₄ 15 ~ 20ml에 리서스펜트하여 OD₆₀₀ 값이 1.0이 나오게 한다.

마이크로튜브에 파아지 DNA 1μl, 헬퍼 파아지 1μl 와 XL1-Blue 200μl를 넣고 37℃에서 15분 동안 배양한다. LB 5ml에 섞어 37℃에서 천천히 흔들어 주며 오버나이트 걸쳐(overnight culture) 한다. 마이크로튜브에 1ml 씩 담고 70℃에서 20 분 동안 가열한 후, 3000rpm 에서 10분동안 원심분리하고 상등액을 따로 모아 4℃에 보관한다. 그리고 이 상등액 5μl 와 XL0LR 세포 200μl 를 섞어 37℃에 15분 동안 반응시키고 LB amp 플레이트에 200μl 정도 도말한다.

이렇게 하여 얻은 콜로니를 시퀀싱(sequencing)을 통해 원하는 cDNA 임을 확인한다. 절제(Excision)해서 얻은 12개의 cDNA 클론 중, 시퀀싱 결과 12번이 전체 *OsEDR1* ORF를 가진 3.4kb의 클론이었다.

4. 서던(Southern) 블롯 분석

상기와 같은 방법으로 분리한 벼 유전체 DNA 1 μ g을 *Hind* III, *Eco*RI, *Xba* I, *Bgl*III, *Bam*HI and *Pst* I의 제한효소를 처리한 후 0.8% 아가로스 겔에 전기영동 하고, 나일론막(하이본드-N+, Amersham)에 블러팅 한다. 준비된 막을 [α -³²P]dCTP-라벨드(메가프라이머 DNA 라벨링 시스템, Amersham) 프로브로 혼성화시켰다. 혼성화된 막을 2X SSC 와 0.1% SDS(로우 스트린전시(low stringency))로 65°C에서 1시간 씻고, 다시 0.2X SSC 와 0.1% SDS(하이 스트린전시(high stringency))로 65°C에서 1시간 씻어 각각을 X-선 필름으로 -80°C에서 이틀 동안 감광시켰다.

벼 유전체내의 *OsEDR1*의 사본 수를 알아보기 위해 서던 블러팅을 수행하였다. 로우 스트린전시 상태에서는 하나의 강한 밴드와 최소한 두개의 약한 밴드가 보였다. 하이 스트린전시로 씻었을 경우에 *Hind* III, *Xba* I, *Bam*HI, *Pst* I에서 뚜렷이 하나의 밴드를 보였다. 그러나 *Eco*RI에서 약한 밝기의 밴드가 하나 더 보였다.

이 실험결과는 로우 스트린전시에서 약하게 나온 밴드로서 벼 유전체에 *OsEDR1*과 호몰로그(homologs)한 다른 유전자가 존재함을 배제할 수는 없지만 *OsEDR1*은 벼 유전체에서 단일 사본수로 존재한다고 할 수 있다.

5. *OsEDR1*의 식물 신호전달 물질에 대한 반응성 실험

*OsEDR1*의 식물 신호전달 물질에 대한 반응을 알아보기 위하여 *OsEDR1* promoter GUS fusion construct를 구성하고 (도 3 참조), 다양한 물질을 처리한 후 *OsEDR1* promoter에 의해서 유도되어지는 GUS activity를 관찰하였다. 몇가지 신호물질에 의한 GUS 발현분석 결과 특이하게도 probenazol에 의해 잎과 shoot 부위에서 발현이 매우 증가되는 현상을 관찰할 수 있었고, probenazol은 *OsEDR1* promoter::GUS 발현을 매우 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다.(도 4 참조)

이는 그동안 매우 획기적인 도열병 방제약인 probenazol이 아마도 식물체 내에 흡수된 후 *OsEDR1*의 발현을 촉진함으로써 MAP kinase-mediated defense signal pathway를 증폭할 가능성을 암시한다고 생각할 수 있다. 만일 이러한 내용이 옳다면 그동안 확실하게 밝혀지지 않았던 probenazol의 식물체 내에서의 저항성 증진 기작을 밝힐 수 있는 좋은 시스템이 될 수 있을 것으로 본다.

6. 다양한 자극에 대한 *OsEDR1*의 발현관찰

도 3은 벼 묘목 잎에서 신호분자와 다양한 스트레스에 의한 도 1의 *OsEDR1* 유전자의 전사적 조절을 나타내는 그래프로서 다양한 스트레스들과 샘플링 시간들은 각각 상·하 레인에 나타내었다. 상기 막대그래프는 0분에서부터 지속적으로 발현된 *OsEDR1* mRNA 수준을 100%라 했을 때 mRNA 수준의 상대적 강도를 %로 나타낸다. 전체 RNA가 100 μ M의 각각의 JA, SA, ABA, CN, EN, and 구리, 카드뮴(cadmium) 수은(mercury); 0.1% CT; 1mM ET; 10mM H₂O₂; drought; 150mM의 NaCl과 슈크로오스(sucrose) 각각; 그리고 UV-C 조사(생체외)로 처리된 잎 조각들로부터 추출되었다. CON은 절단에 의한 상처를 말한다.

본래의 묘목(생체내)은 25/37/12°C의 다양한 온도들에 놓여진다. 화살표는 실험의 초기에서 샘플링을 나타내며 연속적인 빛에서 처리들이 수행되었다 (150 μ mol m⁻²s⁻¹).

블러들은 [α -³²P]dCTP 라벨드 *OsEDR1* cDNA 프로브와 혼성화되고, ca. 3.4kb의 하나의 혼성화 밴드가 나타났다. 동일한 로딩(loading (20 μ g))이 메틸렌 블루로 막의 염색에 의해 확인되었고 rRNA 일부가 보여진다.

노던 분석이 상술한 물질과 방법에 의해 수행되었다. 본 실시예에서 *OsEDR1*의 mRNA 발현은 절단에 의한 상처(wounding)에 의해서 뿐만 아니라 단자엽과 쌍자엽 식물체의 방어/스트레스 반응에 관여하는 전체적인 신호전달 분자인 JA(P. Reymond, 1998), SA(P. Reymond, 1998), ABA(E. Grell, 1998), 2차 전달자(second messenger)인 H₂O₂(J.J. Grant, 2000), PP 인히비터(T.A. Millward, 1999)인 CN과 EN(R. Rakwal, 2001), fungal elicitor[CT (L.A. Hadwiger, 1999)] drought, high salt(NaCl) sugar(sucrose), 중금속(M. Hajduch, 2001)인 구리(copper), 카드뮴(cadmium), 수은(mercury), 고온 (37°C) 스트레스에 의해서 15분 만에 유도되어진다는 것을 알 수 있다.

흥미롭게도 JA를 처리하고 5분이면 *OsEDR1*의 전사체가 측정할 수 있을 정도로 증가하고, 10분이면 절단에 의한 상처(CON)로 15분만에 발현되는 양보다 전사수준이 미세하게나마 더 높게 발현된다.

특히 다양한 스트레스 인자들/ 자극 중에서 CT, 오스몰라이트(osmolytes), NaCl, 슈크로오스, 중금속(heavy metal)들이 *OsEDR1* mRNA의 축적을 아주 강력하게 야기시킴을 알 수 있다.

이러한 데이터들이 말해주는 것은 MAPKKK인 *OsEDR1*이 다양한 스트레스에 반응한다는 것과 어떤 신호가 주어졌을 때 아주 빠르게 반응한다는 것이다.

7. 시간 단계별로의 발현분석

신호분자 JA, SA, ET, ABA 및 H₂O₂를 처리하였을때 *OsEDR1*의 발현양상을 30, 60, 90 및 120분 동안의 짧은 시간단위 별로 조사하였다.

도 4는 벼 묘목 앞에서 다양한 스트레스에 반응하여 나타나는 시간단계별 일시적 조절을 나타낸 그래프이다. 상기 막대그래프는 0분에서부터 지속적으로 발현된 *OsEDR1* mRNA 수준을 100% 라 했을때 mRNA 수준의 상대적 강도를 %로 나타낸다.

절단에 의한 상처(CON)의 경우 30분에서 전사체(transcript) 수준이 증가하였다가 점점 감소하는데 JA와 SA도 언뜻 비슷한 양상을 보이니, mRNA의 그 축적량이 매우 높은 것을 알 수 있다.

ET의 경우 *OsEDR1*의 전사체 수준이 30분에 조금 증가하다가 시간이 갈수록 감소하고, ABA는 15분 이후부터 수준이 감소하는데 30분에는 어느 정도 보이다가 120분에서 절대적인 수준이 낮아짐을 알 수 있다. H₂O₂ 경우 30분에서 더욱 더 증가하다가 시간이 갈수록 점점 감소함을 볼 수 있다.

상기 실험 결과 *OsEDR1*의 전사체가 최고가 되는데 걸리는 시간이 아주 짧은 것과, 사용되는 elicitor 의 형태에 따라 유도의 수준이 다양한 것에서, *OsEDR1*은 여러 가지의 신호가 주어지면 빠른 시간 안에 잠깐동안 조절되어짐을 알 수 있다.

8. 노던 블롯 분석

가. 전체 RNA 분리

수확한 벼 잎은 -80℃에 보관하며 일정량의 샘플을 액체질소를 부어 얼려가며 고운 분말상태로 만든다. 분말 100mg~200mg 정도에 1ml의 TRIzol Reagent(Invitrogen, USA)을 넣고 3~4분 동안 vortex 한다. 상온에서 5분 동안 배양하고 0.2ml의 클로로포름을 넣고 15~20초 동안 볼텍스(vortex) 한다. 상온에서 2~3분 배양하고 4℃ 12000g 에서 15분 동안 원심분리 시킨다. 상등액 0.6ml 을 새로운 튜브에 담고 0.5ml 이소프로판올(isopropanol)을 넣고 인버트(invert) 시켜준다. 상온에서 10분 동안 배양하고 4℃ 12000g에서 원심분리 시킨다. 아래에 남은 페릿에 75% Et-OH(in - 20℃ with DEPC) 1ml을 넣어 씻어주고 4℃ 7500g에서 원심분리 시킨다. Et-OH을 버리고 페릿을 잠깐 말린 후 DEPC 물 50~100μl에 녹여준다.

나. 노던 블롯 분석

RNA 전기영동은 포름알데히드 겔(formaldehyde gel)을 사용하였다. 포름알데히드와 DEPC 물이 1:11이 되고 0.5X의 MOPS가 섞인 1.2% 아가로오스에 정량한 RNA 시료를 러닝 버퍼(running buffer)(1X MOPS, 포름알데히드(formaldehyde), 포름아미드(formamide), EtBr, DNA 로딩 다이(DNA loading dye)와 1:2의 비율로 섞어 70℃ 에서 3분 동안 변성시킨 후 1X MOPS 버퍼에서 50V로 약 2시간 전기영동 한다.

전기영동 후 나일론막(하이본드-N+, Amersham)에 모세관 효과를 이용하여 RNA를 트랜스퍼 시켰고, 80℃에서 2 시간 구워 고정시켰다.

이 막을 혼성화 용액(50% 포름아미드, 5X SSPE, 0.5X Denhardt' 용액, 0.2% SDS)에 담가 42℃에서 프레-혼성화(pre-hybridization) 시켰다. ssDNA 를 5분 끓여 변성시키고 42℃ 혼성화용액에 넣고 2시간 동안 차단 후 10분 정도 씻어 낸다. 여기에 방사능으로 표시된 프로브를 열변성시켜서 넣고 오버나이트 시킨다.

18시간 이상이 지난 후 혼성화용액은 버리고 워시 용액(wash solution)(2xSSPE, 0.1x SDS)에 막을 씻는다. RI가 어느정도 남아있는지 측정해보고 잘 떨어지지 않으면 하이 스트린전시 용액으로 씻어서 신호 위치에서 적당한 RI 값이 나오면 X-ray 필름에 감광시킨다.

9. cDNA의 제한효소 절단 양상 확인 및 서브클로닝

OsEDR1 유전자의 기능 분석을 위하여 형질전환체 생산용 발현백터를 구성하였고, 도 5는 *OsEDR1*의 유전자 기능분석을 위하여 구축한 형질전환체 생산용 벡터들의 구조를 나타내는 도면이므로서 (A)는 pCambia + 35S 프로모터 카세트로 구성된 pCamLA 벡터의 구조이다.

가. 과발현 벡터 구성

*OsEDR1*의 개시코돈 쪽의 *Kpn*I 과 종결코돈 *Not*I 으로 3.4kb의 인서트(insert)가 잘려 나오게 되나, pCamLA 벡터에서는 35S 프로모터 쪽의 *Kpn*I 터미네이터 쪽의 *Sac*I 이 클로닝 가능한 부위여서 벡터의 *Sac*I 과 인서트의 *Not*I 의 절단 부위를 T4 DNA 중합효소를 이용하여 블런트시킨 후 각 절편의 *Kpn*I 을 점착말단으로 하여 서브클로닝을 할 수 있었다. 도 7에서 (B)는 *OsEDR1* cDNA의 전체 ORF이 pCamLA 벡터에 삽입된 과발현 벡터 구성을 나타낸다.

나. 안티센스 벡터 구성

*OsEDR1*의 개시코돈 200bp 정도 안쪽에 있는 *Sac*I 과 종결코돈 뒤쪽의 cDNA 벡터의 MCS 에 있는 *Kpn*I 을 이용해 인서트를 잘라내고, 위에서 사용한 pCamLA 벡터 부위에 넣으면 안티센스로 서브클로닝이 된다. 도 7에서 (C)는 *OsEDR1* cDNA의 전체 ORF이 꺼꾸로 pCamLA 벡터에 삽입된 안티센스 벡터 구성을 나타낸다.

다. 사일런싱 벡터 구성(Silencing vector construction)

*OsEDR1*의 특이적인 부위를 프라이머(*OsEDR2* 5'-CTTGTGATTGGTG AAAGGATTGGC-3', *OsEDR3* 5'-CAAAATCACAAACCTTCACATTCCAG-3': 400bp)를 제작하여 PCR을 이용하여 클로닝하고, attB1,2를 어댑트(adapt)시켜서 사일런싱 벡터인 pB7GWIWG2(II)에 서브클로닝 하였다. 도 7에서 (D)는 *OsEDR1*이 서로 마주 보도록 pB7GWIWG2(II) 벡터에 삽입된 사일런싱 벡터 구성을 나타낸다.

10. 벼 형질전환

*OsEDR1*의 기능분석을 하기 위하여 상기와 같이 사일런싱, 안티센스, 과발현의 3가지 형태의 컨스트럭트를 제조하여 각각의 형질전환 식물체를 생산하였다.

가. *OsEDR1*의 과발현 형질전환 식물체

*OsEDR1*의 과발현 형질전환 식물체는 19개의 라인이 만들어져 있으며, 야생형에 비해 잘 크지 못하고 느린 성장속도를 보이고, 잎에 전형적인 세포사(cell death) 현상이 약 50% 정도의 라인들에서 관찰되었다.(도 8 참조)

이들 라인들 간에 나타나는 병반의 정도에 차이가 보였으며 이는 아마도 형질전환된 벡터가 삽입되어진 위치에 따라 나타나는 영향으로 추측된다.

OsEDR1 과발현 라인들은 조숙한 노화(premature senescence)를 보인다.

나. *OsEDR1*의 안티센스 형질전환 식물체

형질전환 식물체는 22 라인이 확보되어 있다. 모든 생육단계에서 형질전환 식물의 표현형은 야생형과 크게 차이가 없고 특별한 표현형이 관찰되지 않았다.

다. *OsEDR1*의 사일런싱 형질전환 식물체

사일런싱 형질전환 식물체는 36개 라인이 확보되어 있고, 이것은 *OsEDR1*의 기능이 억제된 돌연변이체로 볼 수 있다. 이러한 형질전환 식물체의 경우 그 표현형이 야생형(wild)과 비교해볼때 강력한 세포사 표현형이 관찰되었다(도 9 참조).

이 현상은 최근에 병저항성 유전자와 관련하여 보고되고 있는 병반(lesion) 유사 현상의 일종으로 병원균 처리가 되지 않은 식물에서 유전자이상으로 인하여 병이 난 것처럼 보이는 현상이다.

실제로 사일런싱 형질전환체 36개 라인 중에서 병반이 보이는 형질전환체와 병반이 보이지 않은 형질전환체를 각각 4개씩 선별하여 노던 분석을 하였다.

도 10은 형질전환체 라인에서의 *OsEDR1* 및 방어관련 PBZ1 유전자와 PR1a 유전자의 조절을 관찰한 사진으로서 사일런싱 형질전환체 8개 라인의 노던 분석결과이다.

1, 2, 3, 4 는 병반이 나타난 형질전환체 라인이고, 5, 6, 7, 8 은 병반이 나타나지 않은 형질전환체 라인이다.

상기 관찰 결과 병저항성 관련 유전자로 알려진 PBZ1의 경우 병반이 보인 형질전환체에서 뚜렷한 발현 증가를 보이고 있고, 저항성 유전자로 알려진 PR1a의 경우도 같은 경향을 보이는 것을 알 수 있다.

특이한 사항은 *OsEDR1* 을 사일런싱 시킨 돌연변이체에서 병반이 보이지 않은 형질전환체의 경우에는 발현이 전혀 되지 않지만, 병반이 보인 형질전환체에서는 약하게나마 *OsEDR1* 이 발현되고 있음을 알 수 있다.

11. 프로모터 클로닝

HindIII 부분 분해로 pBluescript 내부에 3-6 Kb의 인서트 DNA를 가진 벼 게노믹 라이브러리가 구축되었다. 라이브러리는 플레이트 상에 도포되었고 *OsEDR1* cDNA 클론과 함께 colony hybridization이 수행되었다. positive 클론들이 분리되고, *OsEDR1*이 플라스미드 벡터에서 인서트 DNA임을 확인하기 위해 서열분석되었다. 상기 클론 중 하나는 2Kb *OsEDR1* 프로모터와 *OsEDR1*의 5'부분의 4Kb 인서트를 가진다. 상기 *OsEDR1* 프로모터는 서열번호 5에 기재된 바와 같이 서열분석었는데, 보고된 web data 상에서 *OsEDR1*의 2Kb 에 해당하는 프로모터 부위를 얻을 수 있도록 서열번호 제 6 내지 제 11에 기재된 서열의 프라이머를 제작하고, 일련의 결실분석이 1.97 Kb의 S1, 1.38 Kb의 S2, 0.78 Kb의 S3, 0.58 Kb의 S4, 0.16 Kb의 S5 construct 까지의 크기에 따라 행해졌다.

12. 병원균 테스트

각각의 종자를 MS 배지 상에서 무균 상태로 발아한 후 약 2주 정도 28℃에서 18시간 연속해서 빛을 주고 그 후 암 조건에서 키운 후 1×10^5 농도의 도열병균 포자를 접종한 후 4일 후에 나타나는 병징을 관찰하였다.(도 11 참조)

OsEDR1 센스 라인과 *OsEDR1* 사일런싱 라인 4는 둘다 병반 생성률이 매우 낮으며 특히 *OsEDR1* 센스 라인의 경우에는 마치 과민성 반응처럼 그 병반의 형태가 작고 침입부위가 컨트롤에 비해 매우 작은 것을 알 수 있었다. 그러나 수확량에서는 야생형인 니폰바레(Nipponbare)와 거의 차이가 없으므로 단지 병방어능력만 증가되었으며 나머지 벼가 갖는 다른 특성들은 큰 변화가 없는 것으로 추측된다.

13. 저항성품종 육성 가능성 실험

저항성품종 육성을 위한 가능성을 보기 위하여 형질전환체 가운데 선발된 라인들에 벼흰잎마름병원균인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (A)를 접종한 후에 감염정도를 관찰해 본 결과 과발현 계통에서 놀랄만한 저항성 반응이 확인되었다.(도 15 참조)

또한 *OsEDR1* 을 형질전환한 후 얻어지는 형질전환체의 수량은 그 라인별로 편차가 있었으나 일반적으로 병반이 적게 나타나는 계통의 저항성 형질전환체는 저항성증가와 더불어 그 생장과 수량면에 있어서도 대조구와 별 차이가 없는 아주 바람직한 특성을 보여주었다.(도 16 참조) 반면, 발현을 억제한 경우에는 오히려 감수성이 더 증가한 듯한 인상을 받을 수 있었다.

즉, *OsEDR1* 은 세균인 벼 흰잎마름병에 대한 저항성을 유도할 수 있는 역할을 수행하는 것으로 여겨지며, 이는 *OsEDR1* 이 저항성관련 positive regulator라는 것을 강하게 뒷받침하는 결과이다.

14. 아그로박테리움 스트레인(*Agrobacterium* strain) LBA4404 competent cell 으로의 유전자 도입

변형된 freeze-thaw 방법으로서, competent cell을 만들기 위해 30℃에서 5ml LB+ 카나마이신(kanamycin) 배지에 하나의 콜로니를 찍어 오버나이트 컬처한 씨를 50ml 배지에 2ml 넣어 오버나이트 컬처하여 OD₆₀₀에서 0.5 ~ 1.0 이 나오게 키운다. 배양액은 4℃ 3000rpm 에서 5분 동안 원심분리하여 세포를 모으고 얼음에 보관중인 차가운 20mM CaCl₂ 1ml 에 리서스펜션(re-suspension) 하여 100ul 분주하였다. 여기에 각 DNA를 5μl 넣고 액체질소에 1분 동안 급냉시킨 후 37℃ 워터 배스(water bath)에 5분 동안 배양시킨다. 약 1ml LB에 넣어 30℃에서 2~4시간 키운 후 세포를 모아 LB 카나마이신 배지에 도말하여 30℃에서 이틀간 배양한다.

15. 아그로박테리움을 이용한 캘러스(callus) 형질전환

벼의 재배 및 샘플링에서의 방법으로 법씨를 까고 소독하여 씨눈이 위로 가도록 해서 2N₆ 배지(Sucrose 30g, Casamino acid 300mg, 프롤린(Proline) 2.878mg, CHU 3.981g, N6-비타민 1ml, 2,4-D (2mg/ml 에탄올) 1ml, pH 5.8, Gellan Gum 2g/1L 3차 증류수)에 끼워두면 28℃에서 15일 정도 후에 씨눈 주위에 캘러스가 유도되어진다. 코-컬처(co-culture)에 들어가기 앞서 유도되어진 캘러스를 새로 만든 2N₆ 배지에 옮겨서 3일 정도 두어 형질전환 효율이 좋은 상태의 신선한 캘러스를 준비한다.

가. Co-culture

LB broth(NaCl 15g, 트립톤 10g, 이스트 엑스트랙트 5g/ 1L DW) 20ml에 카나마이신(100mg/ml) 20ul를 넣은 배지에 준비된 아그로박테리움 스트레인을 48시간 동안 키운다. 배양한 아로박테리움은 3000rpm 에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 모아 AAM 배지(MSAA 100ml, MS 비타민 1ml, Casamino acid 0.5g, 슈크로오스 65.8g, 글루코오스 36g/1L DW)에 아세토시링곤(acetosyringon) (20mg/DMSO ml)을 1ml 넣은 용액에 희석하여 660nm 에서 0.1이 나오게 한다.

준비된 캘러스를 튜브에 적당량 담고 30초간 위의 AAM 배지에 담근다. 약 30초 후에 상층액은 잘 따라내고 캘러스를 멸균된 3M 페이퍼에 뿌려 말린다. 캘러스가 20 ~ 30분 동안 건조하는 동안 페트리디쉬에 3M 페이퍼를 깔고 AAM 1ml을 흐르지 않고 적시듯이 묻혀준다. 적당히 마른 캘러스를 준비된 페트리디쉬 위에 얹고 호일로 싸 다음 24℃에 3일 동안 배양시킨다.

나. 선별

1차 선별 배지(2N₆/(L) 하이그로마이신(hygromycin(50mg/ml)) 200μl, 세파톡신(250mg/L) 1ml)를 만든다. 3일간 배양된 캘러스를 멸균된 튜브에 담고 멸균수로 한번 씻어낸다. 다시 세파톡신 50μl를 넣은 멸균수 50ml 에 3번 이상 헹구내고 멸균된 3M 페이퍼 위에 뿌려서 말린다. 적당히 마른 캘러스를 앞서 만든 배지에 치상 한다.

캘러스는 28℃에서 암 상태로 1주일간 배양시킨다. 그리고 일주일 후 2차 선별 배지(2N₆/(L), hygromycin(50mg/ml) 600 μl, 세파톡신(250mg/L) 1ml)를 만든다. 캘러스 가운데 검게 변한 부분은 형질전환되지 않은 부분이므로 제외시키고 하얀 부분만 2차 배지에 치상 한다. 그 후 28℃에서 암 상태로 3주일간 배양시킨다.

다. 제너레이션(Generation)

제 1차 제너레이션 배지(MS 4.3g, MS 비타민 1ml, 슈크로오스 30g, 소르비톨 30g, Casamino acid 2g, MES 11g, pH5.8, Gellan gum 4g, NAA 20ul, 키네티(Kinetin) 10ul, 세파톡신 1ml, 하이그로마이신(Hygromycin) 600ul)를 만든다.

캘러스의 검게 변한부분은 제외시키고 한 무더기에서 한개나 두개 덩어리만 옮겨준다. 그리고 광 조건을 28℃로 하여 3주일간 배양시킨다. 3주일 후 2차 리제너레이션(regeneration) 배지(MS 4.3g, MS 비타민 2ml, 슈크로오스 30g, pH5.8, Gellan gum 6g)를 만들어 캘러스의 검게 변한 부분은 제외시키고 다시 한 무더기에서 한 개나 두개 덩어리만 옮겨준다.

전과 동일한 조건에서 3주일간 배양일 내에 캘러스에서 슈팅(shooting) 과 루팅(rooting)이 되고 어느 정도 자라면 여유 공간이 있는 병(1/2 MS 미디어(media) (1L) : MS 2.15g, 슈크로오스 15g, Gellan gum 6g)으로 옮겨 키워준다.

16. 세포 내 타게팅(targeting) 을 보기 위한 OsEDR1::GFP 연구

가. OsEDR1::GFP 융합 벡터 구성

Cambia + GFP 카세트 이원 벡터(binary vector)의 클로닝 부위에는 *Xba* I 과 *Bam*HI 이 있다. 그리고 *OsEDR1*에서 사용할 수 있는 부위가 앞쪽에 *Bam*HI 이 있고, 이원 벡터와 융합시킬 때 프레임을 맞추기 위한 3'프라이머 제작시 *Bam*HI 을 어댑터 시키면 쉽게 클로닝이 될 수 있었다.

하지만 ORF의 종결코돈 200bp 앞쪽에 *Bam*HI 이 존재하여 전체 ORF를 사용하기가 어려웠다. 전체 ORF를 사용해야 하는 GFP 연구여서 3' 위치의 ORF 안쪽에 있는 *Bam*HI 부위를 사이트 디렉티드 돌연변이(site directed mutagenesis)를 이용하여 제거하였다.

그리고 *OsEDR1* 앞쪽의 *Bam*HI 부위와 종결코돈을 없애면서, GFP 발현벡터에 프레임이 맞게 프라이머를 제작하였으며, 프라이머 끝에 *Bam*HI 어댑터(adaptor)를 붙여 벡터 *Bam*HI 에 서브클로닝 하였다.

나. Bombardment를 이용한 세포내 유전자 타게팅 분석

만들어진 OsEDR1::GFP 컨스트럭트를 텅스텐 캐리어(carrier)를 이용하여 코팅한 후 충격을 이용하여 양파세포에 삽입한 후 발현을 관찰하였다.

우선 DNA를 키트(Promega, USA)로 깨끗하게 고농도로(1ug/1ul) 뽑은 후, 마이크로튜브 6mg의 텅스텐을 측정하여 70% 에탄올 100ul를 첨가한 후 3분 동안 볼텍스(vortex)한다.

텅스텐이 뭉치지 않게 10분 동안 세워 둔 후, 10,000rpm으로 10초간 원심분리 시킨다. 피펫을 이용하여 상등액을 제거한 후 100ul의 멸균수를 더하여 1분 동안 볼텍스하고, 1분간 세워두었다가 원심분리 한다. 마찬가지로 상등액은 제거하고 한 번 더 멸균수로 세척한다. 그리고 50% 글리세롤 100ul를 넣어 4℃에서 보관한다.

이렇게 만들어진 마이크로캐리어(microcarrier)를 5분 동안 볼텍스한 후 상층 부분에서 50ul를 취하여 새로운 마이크로튜브로 옮기고 준비한 DNA 5ul를 넣고 테이핑한다. 2.5M CaCl₂ 50ul를 더하여 테이핑하고, 0.1M 스퍼미딘(spermidine)을 20ul 더하여 3분 동안 볼텍스한다. 이것은 순서대로 넣어주어야 한다.

1분 동안 세워둔 다음 10초간 캐리어가 가라 앉을 수 있도록 원심분리하고 상등액은 완전히 제거한다. 그 후 70% 에탄올을 100ul 첨가하여 섞은 다음, 잠깐 원심분리하여 상등액을 버리고, 100% 에탄올 60ul 첨가하여 테이핑하여 준다.

이렇게 준비된 샘플은 미리 100% 에탄올에 담궈 소독해 둔 마이크로캐리어 홀더에 끼워둔 마이크로캐리어 위에 10ul씩 떨어뜨려 말린다. 양파는 판판하고 좋은 세포를 얻기 위해, 싱싱하고 큰 것을 준비하여 MS배지 위에 안쪽 세포층 만을 떼어내어 올린다. Bombard는 클린 벤치(clean bench) 안에 설치하고 젤 위에 1100psi의 헬륨가스 압력에 견디는 디스크를 설치하고 적당거리 아래 스탑 스크리닝 설치한다. 맨 아래에 양파세포를 정 중앙에 놓고, 진공(vacuum) 28에서 bombard를 쏜다.

암상태 28℃에서 오버나이트 보관 후에 confocal microscope 를 이용하여 GFP 발현 및 타게팅 부위를 관찰하면 도 12에서 나타난 바와 같이 OsEDR1-GFP 융합단백질의 bombardment가 양파세포에서 핵으로 이동한 것을 알 수 있다.

상기 GFP 실험결과는 두가지 가능성을 제시하고 있는데 하나는 실제로 NLS 영역에 의해서 MAPKKK가 핵으로 이동한다는 것이고, 다른 하나는 일반적인 식물의 MAPKKK처럼 막이나 세포질에 존재한다는 가능성으로 평소에 막에 존재하던 MAPKKK가 스트레스와 같은 자극에 의해서 핵으로 이동하는 것으로 볼 수도 있는 것이다.

발명의 효과

본 발명에 따르면 *OsEDR1*은 *japonica*-type 벼 cv. 니폰바레에서 MAPKKKs 클론으로서 처음으로 밝혀졌으며, 다양한 환경적 요인에 의해서 매우 빠르게 순간적으로 조절되어지는 유전자로서, 벼에서 다양한 생물적/비생물적 스트레스에 반응하고 신속히 신호를 전달하여 조기에 대응하는 기능을 가진다.

또한 *OsEDR1* 유전자는 벼 신호전달에서 MAP 키나제가 차지하는 위치상, 신호전달의 상단부에서 병 저항성관련 다양한 생물적/비생물적 스트레스에 대하여 다양한 유전자들의 발현을 조절하는 중추기능을 수행하고 식물이 신속히 병에 대한 방어작용을 활성화시켜 병저항성을 유도하는 특이적 기능을 갖도록 한다.

특히 *OsEDR1* 유전자 및 프로모터를 유효성분으로 하는 식물의 병저항성 유도 유전자 치료제 및 병저항성 식물체를 만들어냄으로써 농약사용량을 대폭적으로 줄일 수 있는 환경 친화적 내병성 신품종을 개발할 수 있고, 이를 통해 농업생산성 제고 및 비용절감 등의 경쟁력을 키움으로써 농민과 소비자 모두에게 이익을 도모할 수 있다.

이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대해서 도시하고 설명하였으나, 본 발명은 상술한 특징의 실시예에 한정되지 아니하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본원 발명의 요지를 벗어남이 없이 다양한 변형 실시가 가능할 것이며, 이러한 변형 실시는 본원 발명의 특허청구범위 내에 있는 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1로 기재되는 염기서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 유전자 또는 그 단편.

청구항 2.

서열번호 2로 기재되는 염기서열을 가지는 유전자 또는 그 단편.

청구항 3.

서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 단백질 또는 그 변이형 단백질.

청구항 4.

서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 단백질 또는 그 변이형 단백질.

청구항 5.

서열번호 5로 기재되는 염기서열 또는 그 단편으로 구성되는 *OsEDR1* 유전자의 프로모터.

청구항 6.

병저항성을 부여하는 제 1항 또는 제 2항의 유전자가 삽입된 발현벡터.

청구항 7.

제 6항에 있어서,

제 5항의 프로모터가 추가로 삽입된 발현벡터.

청구항 8.

제 6항 또는 제 7항의 발현벡터를 포함하는 형질전환된 식물체.

청구항 9.

제 8항에 있어서,

상기 형질전환 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

청구항 10.

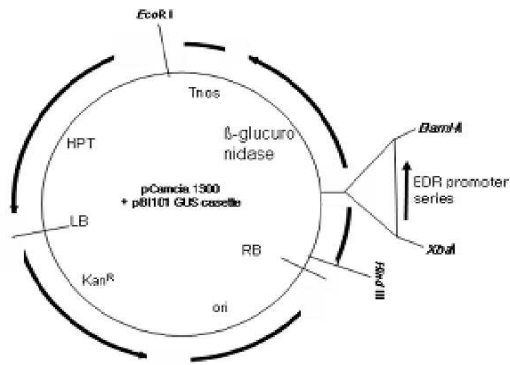
제 1항 또는 제 2항의 유전자 또는 제 5항의 프로모터를 유효성분으로 하는 식물의 병저항성 유도 유전자 치료제.

청구항 11.

제 4항 또는 제 6항의 단백질 또는 그 변이체를 유효성분으로 하는 식물의 병저항성 유도 조성물.

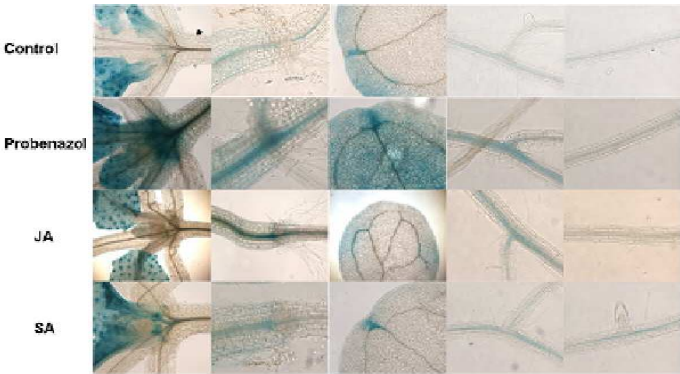
도면

도면3

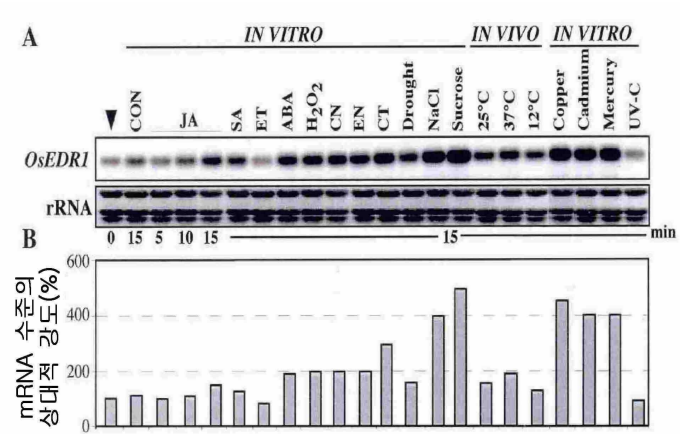


OsEDR1 Promoter GUS fusion construct

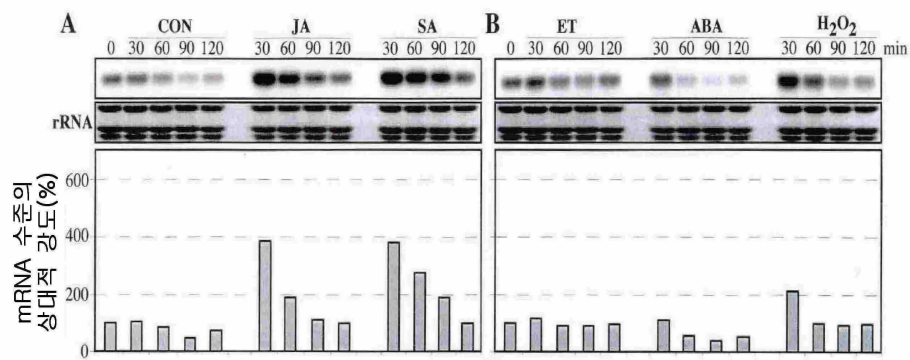
도면4



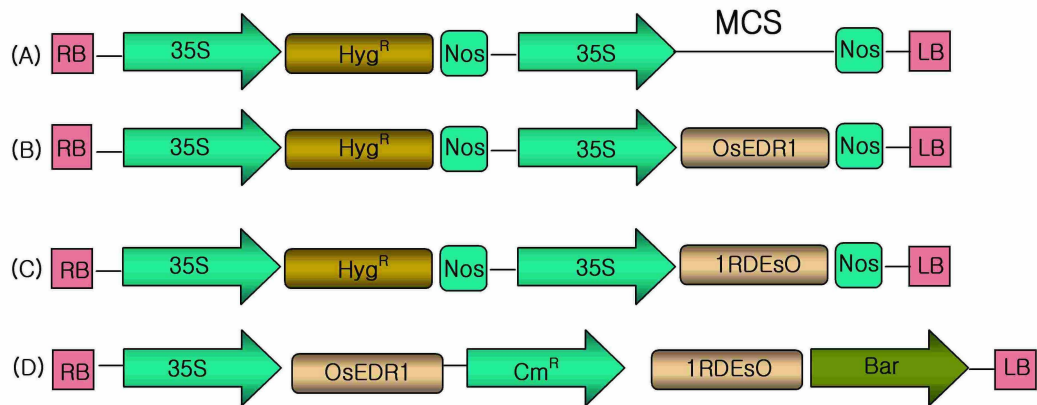
도면5



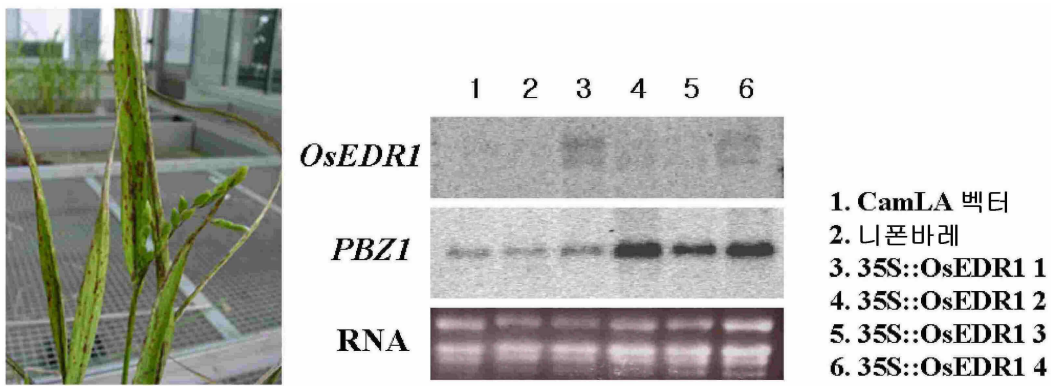
도면6



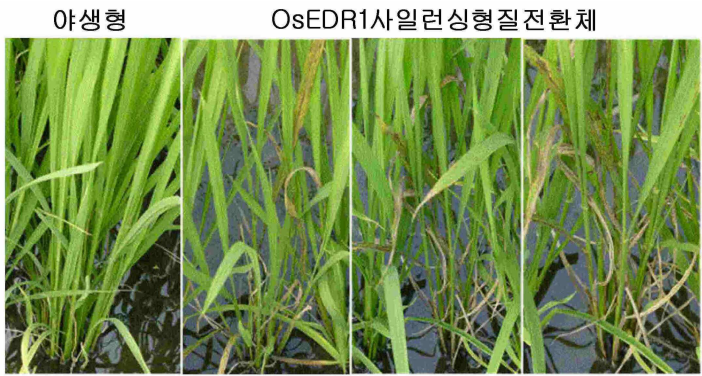
도면7



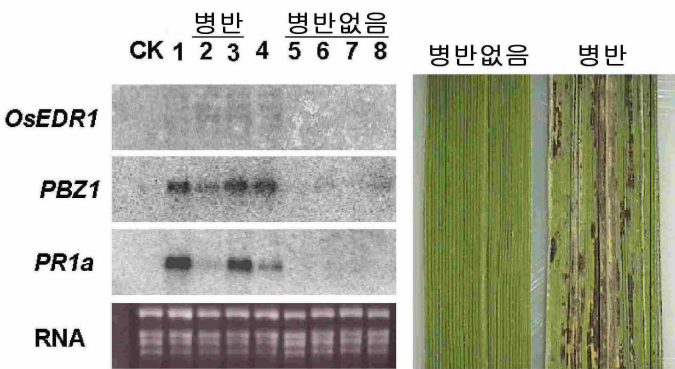
도면8



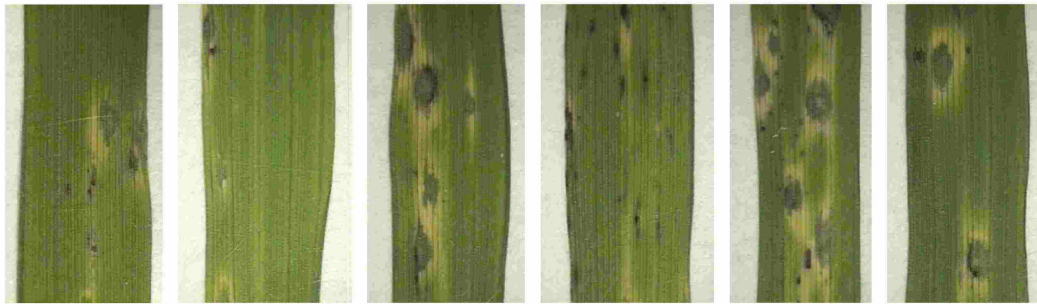
도면9



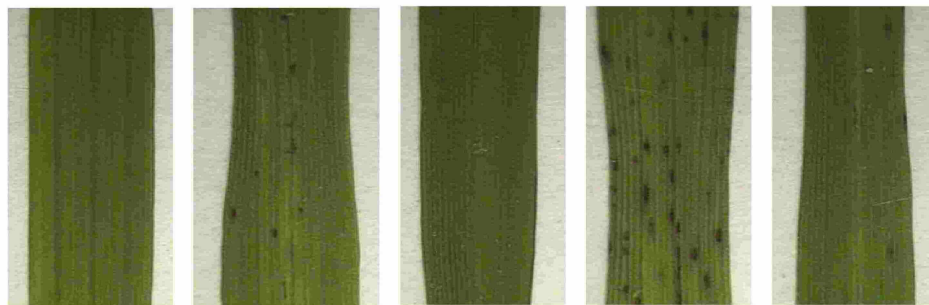
도면10



도면11



컨트롤(니폰바레)

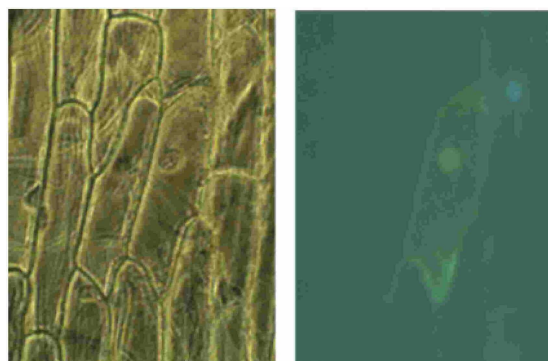


OsEDR1 (센스라인 ; 1)

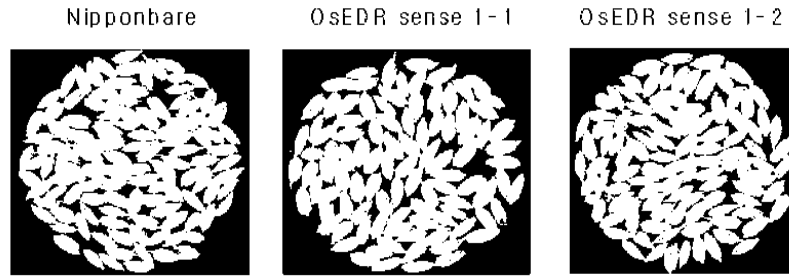


OsEDR1(사일런싱 라인 ; 4)

도면12



도면16



서열목록

<110> JWA, NAM-SOO

<120> DISEASE-RESISTANCE INDUCIBLE GENE AND PROMOTER THEREOF IN PLANT

<150> KR20040009605

<151> 2004-02-13

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 3311

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

gcggagacgt ggttgacgag atgaagaatc tgttcaagag taagatcaag tggcagcacc	60
ggtcgaacga ccccgcgctcg tcgcaggggc aggggcaggg gctgccgcag cgacgccgcc	120
gtcgccatcg ccggcgagct ccccgctggg ggggcgcgct gcgctatccg tgtcgacggt	180
atcgctgctg tccccttccg ccgccgcgac gccgacgggg gctggctgctg gcggggccgg	240
gaggtggggg tgggggaacg ggtggggagg attacatggt gtcggaggag gagttccaga	300
tcgagctggc gatggcactg tcggcgtcca acagcgagtg cgtgggacgac ctggacgggg	360
agcagatcag gaaggccaag ctgataagcc tcggcagggg caaccgcttc gccgccgtcc	420
gggacgacga gcaaaccgcg gatgcgctct cccgccgcta ccgggactac aactttcttg	480
attacatga gaaagttatt gatggcttct atgacatctt tggccctct atggaatcat	540
caaagcaagg gaagatgcc tctactagcag atcttcaaac gggcataggc gacctgggtt	600
ttgaagtcac cgtaatcaat cgtgccattg ataccacctt acaggagatg gaacaagttg	660

cacaatgtat cctgcttgac tttcctgttg caaatattgc agccttagtt caaagaatag	720
ccgagcttgt tacagatcac atgggtggac ctgtgaaaga tgcaaagac atgctcacta	780
gatggctaga gaaaagcact gagctaagaa cctcactaca cacaagtttg ttgcctattg	840
gctgcatcaa gataggtctg tctcgtcacc gtgccctact tttcaagatt ctcgctgata	900
gtgttgcat tccttgcaag cttgtcaaag ggagtaatta tactggatgat gatgatgatg	960
ctatcaacat aataaagatg aatgaaagg agtttttggt tgatctcatg gctgctcccg	1020
gtactcttat tccatcagat gtcttaagtt ggaagggcaa ctcattaaat tctaagcaa	1080
gactcaccca gaatccattg gctgggtcat caagtacaac tgattctaata ctcagtcca	1140
atgcattacc acccggacat aaagggtggcc aactgccttt atttagcagt ggcgattgga	1200
tattggccag tcaatctgga tatgaaaaag atggagccac cacatcttca caggcctctt	1260
caagtggcac aacatctgtt gctgctggaa gcgcttttga tagttcttgg acattagttt	1320
ctcatggaca atcagatgat ccatcaacct ctgctggtat gtcagcacag cagaaagtta	1380
tacttccagg tggagaacat ccatggaatg agaataataa tgcgcgaaat gagaataata	1440
aacttgtttc agatttaca gggaaattcag agtccatcaa cttatttgcc gaccttaatc	1500
cttttggggg tagggagccc aaaaggactt cagtgccatt aaatgggcca gataatagaa	1560
ataatgagtt gcaaagacgc agagagaatg tagtccctag cacacgaaga cccagcagc	1620
gattagttat gaaaaactgg ttccttaca atgatgtttc caacaacaag cagtacaatt	1680
atgttgagga ttcatttgca cgtagaaata ttggtgataa tgctgcatca tcatctcagg	1740
tggcacggcc atctgcaaaa aataactaatc ttaatgttgg agtgcgact gatacaccat	1800
acatggcagc tcataattat gataatagta tggctggttc ctctgcaatg aagatgactt	1860
ctacagctgg gattgggaag gttcctgata aggttctgta cggtgatttg gacaagggcc	1920
ttactaattc tagactgggg gatcaaccac cgatagaaag acataaatgg ggcaattctg	1980
tagaaggaag gattccaaca ggcacagttc acaatcaagc aaaagaacac aaggagaact	2040
tcgatggaaa gcaagacaat aagaagttac atcctgatcc aaagaaatcc ccacttgaca	2100
gattcatgga cacatcaatg ccatcaagga accctgaatc cgtttcacca tcctttgcta	2160
ggtcacacaa gctagacacc atgttcgacg atgtgtctga atgtgaaatt cattgggaag	2220

atcttgtgat tggtgaaagg attggccttag gttcatatgg agaggtgtac cgtgctgatt 2280
ggaatggaac agaagtagct gtcaagaaat tcttggatca agatttctat ggtgatgctt 2340
tggatgaatt ccggagtgaa gtgcggatta tgcgtcgact gcgtcatcca aatattgttc 2400
tcttcatggg tgctgttact cgtcctccaa acttatctat tgtatctgag tatcttccaa 2460
ggggaagctt atataagatc cttcacgctc ctaattgcc aattgacgag aagcgtagaa 2520
ttaaaatggc ctttgatgtg gccaaaggaa tgaattgcct ccatattagt gtaccaacaa 2580
ttgttcatcg ggatcttaaa tcaccaaact tgctggttga caacaactgg aatgtgaagg 2640
tttgtgattt tggactttca cgcttgaagc acagtacatt cttatcatcc aaatccactg 2700
ctggaactcc ggagtggatg gcacctgagg tcttgcggaa tgaacaatca aatgaaaagt 2760
gtgatgttta cagcttttgt gtcattctgt gggaattagc aacacttagg atgcatgga 2820
gtggaatgaa tccaatgcaa gttgttgggg cagtcggctt ccaggacaag cggctcgata 2880
ttccaagga aattgatcct ctagttgcaa ggatcatatg ggaatgctgg cagaaggatc 2940
caaatttgcg gccctcgttt gcacagttaa ccagtgttt gaagactgtc caaaggctag 3000
taacccttc tcaccaggag tccagagcc ctctgtgcc tcaagaaata tgggtgaatt 3060
cttccacccc ttgatgttga ggggcattcc actctcaaaa ttgtgagtaa ttattgatga 3120
ttgttgctgt taagtttggt caagtctgca aatgtgggcg cactgtagat tctagcggcc 3180
ctaattgtag acatccctgc tgccgcgaca aaagaacca gcagtagagt atgtatagag 3240
actatagtca tcgacaaaa cgatgacctg aagaagaaat ccagtctgtg gcattctatt 3300
tttcaaaaaa a 3311

<210> 2
<211> 3054
<212> DNA
<213> Oryza sativa

<400> 2
atgaagaatc tgttcaagag taagatcaag tggcagcacc ggtcgaacga cccgcgctcg 60
tcgcaggggc aggggcaggg gctgccgcag cagacgccgc cgtcgccatc gccggcgagc 120
tccccgtcgg gggggccgcc tgcgctatcc gtgtcgacgg tatcgtcgtc gtcccccttc 180
gccgccgcga cgccgacggg ggctgctgcg gcggggggcg gaggtggggg tgggggaacg 240

ggtggggagg attacatgtt gtcggaggag gagttccaga tgcagctggc gatggcgctg	300
tcggcgcca acagcgagtg cgtgggagac ctggacgggg agcagatcag gaaggccaag	360
ctgataagcc tcggcagggg cgaccgcttc gccgcccgtcc gggacgacga gcaaaccgcg	420
gatgcgctct cccgccgcta ccgggactac aactttcttg attaccatga gaaagttatt	480
gatggcttct atgacatttt tggccctct atggaatcat caaagcaagg gaagatgcc	540
tcactagcag atcttcaaac gggcataggc gacctgggtt ttgaagtcac cgtaatcaat	600
cgtgccattg ataccacctt acaggagatg gaacaagttg cacaatgtat cctgcttgac	660
tttcctgttg caaatattgc agccttagtt caaagaatag ccgagcttgt tacagatcac	720
atgggtggac ctgtgaaaga tgcaaagac atgctcacta gatggctaga gaaaagcact	780
gagctaagaa cctcactaca cacaagtttg ttgcctattg gctgcatcaa gataggtctg	840
tctcgtcacc gtgccctact tttcaagatt ctcgctgata gtgttggcat tccttgcaag	900
cttgtcaaag ggagtaatta tactggtgat gatgatgatg ctatcaacat aataaagatg	960
aatgaaaggg agtttttggg tgatctcatg gctgctcccg gtactcttat tccatcagat	1020
gtcttaagtt ggaagggcaa ctcatataat tctaatagca gactcaccca gaatccattg	1080
gctgggtcat caagtacaac tgattctaata ctcagtgcca atgcattacc acccggacat	1140
aaagggtggc aactgccttt atttagcagt ggcgattgga tatcgccag tcaatctgga	1200
tatgaaaaag atggagccac cacatcttca caggcctctt caagtggcac aacatctgtt	1260
gctgctggaa gcgcttttga tagttcttgg acattagttt ctcatggaca atcagatgat	1320
ccatcaacct ctgctggtat gtcagcacag cagaaagtta tacttccagg tggagaacat	1380
ccatggaatg agaataataa tgccggaat gagaataata aacttgtttc agatttaca	1440
gggaattcag agtccatcaa cttatttgcc gaccttaatc cttttggggg tagggagccc	1500
aaaaggactt cagtgccatt aaatgggcca gataatagaa ataagagtt gcaaagacgc	1560
agagagaatg tagtccctag cacacgaaga cccagcagc gattagttat gaaaaactgg	1620
tctccttaca atgatgtttc caacaacaag cagtacaatt atgttgagga ttcatttgca	1680
cgtagaaata ttggtgataa tgctgcatca tcatctcagg tgccacggcc atctgcaaaa	1740
aatactaatac ttaatgttgt agtgccact gatacaccat acatggcagc tcataattat	1800

gataatagta tggctggttc ctctgcaatg aagatgactt ctacagctgg gattgggaag 1860
 gttcctgata aggttctgta cggtgatttg gacaagggcc ttactaattc tagactgggg 1920
 gatcaaccac cgatagaaaag acataaatgg ggcaattctg tagaaggaag gattccaaca 1980
 ggcacagttc acaatcaagc aaaagaacac aaggagaact tcgatggaaa gcaagacaat 2040
 aagaagttac atcctgatcc aaagaaatcc ccacttgaca gattcatgga cacatcaatg 2100
 ccatcaagga accctgaatc cgtttcacca tcctttgcta ggtcacacaa gctagacacc 2160
 atgttcgacg atgtgtctga atgtgaaatt cattgggaag atcttgtgat tggtgaaagg 2220
 attggcttag gttcatatgg agaggtgtac cgtgctgatt ggaatggaac agaagtagct 2280
 gtcaagaaat tcttgatca agatttctat ggtgatgctt tggatgaatt ccggagtga 2340
 gtgcggatta tgcgtcgact gcgtcatcca aatattgttc tcttcatggg tgctgttact 2400
 cgtcctccaa acttatctat tgtatctgag tatcttccaa ggggaagctt atataagatc 2460
 cttcaccgtc ctaattgcca aattgacgag aagcgtagaa ttaaaatggc cttgatgtg 2520
 gccaaaggaa tgaattgcct ccatattagt gtaccaacaa ttgttcatcg ggatcttaaa 2580
 tcaccaaact tgctggttga caacaactgg aatgtgaagg tttgtgattt tggactttca 2640
 cgcttgaagc acagtacatt cttatcatcc aaatccactg ctggaactcc ggagtggatg 2700
 gcacctgagg tcttgcgga tgaacaatca aatgaaaagt gtgatgttta cagctttggt 2760
 gtcattctgt gggaattagc aacacttagg atgccatgga gtggaatgaa tccaatgcaa 2820
 gttgttgggg cagtcggctt ccaggacaag cggctcgata ttccaagga aattgacct 2880
 ctagttgcaa ggatcatatg ggaatgctgg cagaaggatc caaatttgcg gccctcgttt 2940
 gcacagttaa ccagtgcttt gaagactgtc caaaggctag taacccttc tcaccaggag 3000
 tcccagagcc ctctgtgcc tcaagaaata tgggtgaatt cttccacccc ttga 3054

<210> 3
 <211> 1017
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 3
 Met Lys Asn Leu Phe Lys Ser Lys Ile Lys Trp Gln His Arg Ser Asn
 1 5 10 15
 Asp Pro Ala Ser Ser Gln Gly Gln Gly Gln Gly Leu Pro Gln Arg Arg

20	25	30
Arg Arg Arg His Arg Arg Arg Ala Pro Arg Arg Gly Gly Arg Leu Arg		
35	40	45
Tyr Pro Cys Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Pro Leu Pro Pro Pro Arg Arg		
50	55	60
Arg Arg Gly Leu Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Thr		
65	70	75
		80
Gly Gly Glu Asp Tyr Met Leu Ser Glu Glu Glu Phe Gln Met Gln Leu		
	85	90
		95
Ala Met Ala Leu Ser Ala Ser Asn Ser Glu Cys Val Gly Asp Leu Asp		
	100	105
		110
Gly Glu Gln Ile Arg Lys Ala Lys Leu Ile Ser Leu Gly Arg Gly Asn		
	115	120
		125
Arg Phe Ala Ala Val Arg Asp Asp Glu Gln Thr Ala Asp Ala Leu Ser		
	130	135
		140
Arg Arg Tyr Arg Asp Tyr Asn Phe Leu Asp Tyr His Glu Lys Val Ile		
	145	150
		155
		160
Asp Gly Phe Tyr Asp Ile Phe Gly Pro Ser Met Glu Ser Ser Lys Gln		
	165	170
		175
Gly Lys Met Pro Ser Leu Ala Asp Leu Gln Thr Gly Ile Gly Asp Leu		
	180	185
		190
Gly Phe Glu Val Ile Val Ile Asn Arg Ala Ile Asp Thr Thr Leu Gln		
	195	200
		205
Glu Met Glu Gln Val Ala Gln Cys Ile Leu Leu Asp Phe Pro Val Ala		
	210	215
		220
Asn Ile Ala Ala Leu Val Gln Arg Ile Ala Glu Leu Val Thr Asp His		
	225	230
		235
		240
Met Gly Gly Pro Val Lys Asp Ala Asn Asp Met Leu Thr Arg Trp Leu		
	245	250
		255
Glu Lys Ser Thr Glu Leu Arg Thr Ser Leu His Thr Ser Leu Leu Pro		
	260	265
		270
Ile Gly Cys Ile Lys Ile Gly Leu Ser Arg His Arg Ala Leu Leu Phe		
	275	280
		285
Lys Ile Leu Ala Asp Ser Val Gly Ile Pro Cys Lys Leu Val Lys Gly		
	290	295
		300

Ser Asn Tyr Thr Gly Asp Asp Asp Asp Ala Ile Asn Ile Ile Lys Met
305 310 315 320

Asn Glu Arg Glu Phe Leu Val Asp Leu Met Ala Ala Pro Gly Thr Leu
325 330 335

Ile Pro Ser Asp Val Leu Ser Trp Lys Gly Asn Ser Leu Asn Ser Asn
340 345 350

Ala Arg Leu Thr Gln Asn Pro Leu Ala Gly Ser Ser Ser Thr Thr Asp
355 360 365

Ser Asn Leu Ser Ala Asn Ala Leu Pro Pro Gly His Lys Gly Gly Gln
370 375 380

Leu Pro Leu Phe Ser Ser Gly Asp Trp Ile Leu Ala Ser Gln Ser Gly
385 390 395 400

Tyr Glu Lys Asp Gly Ala Thr Thr Ser Ser Gln Ala Ser Ser Ser Gly
405 410 415

Thr Thr Ser Val Ala Ala Gly Ser Ala Phe Asp Ser Ser Trp Thr Leu
420 425 430

Val Ser His Gly Gln Ser Asp Asp Pro Ser Thr Ser Ala Gly Met Ser
435 440 445

Ala Gln Gln Lys Val Ile Leu Pro Gly Gly Glu His Pro Trp Asn Glu
450 455 460

Asn Ile Asn Ala Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Val Ser Asp Leu Gln
465 470 475 480

Gly Asn Ser Glu Ser Ile Asn Leu Phe Ala Asp Leu Asn Pro Phe Gly
485 490 495

Gly Arg Glu Pro Lys Arg Thr Ser Val Pro Leu Asn Gly Pro Asp Asn
500 505 510

Arg Asn Asn Glu Leu Gln Arg Arg Arg Glu Asn Val Val Pro Ser Thr
515 520 525

Arg Arg Pro Gln Gln Arg Leu Val Met Lys Asn Trp Ser Pro Tyr Asn
530 535 540

Asp Val Ser Asn Asn Lys Gln Tyr Asn Tyr Val Glu Asp Ser Phe Ala
545 550 555 560

Arg Arg Asn Ile Gly Asp Asn Ala Ala Ser Ser Ser Gln Val Ala Arg
565 570 575

Pro Ser Ala Lys Asn Thr Asn Leu Asn Val Gly Val Arg Thr Asp Thr

580	585	590
Pro Tyr Met Ala Ala His Asn Tyr Asp Asn Ser Met Ala Gly Ser Ser		
595	600	605
Ala Met Lys Met Thr Ser Thr Ala Gly Ile Gly Lys Val Pro Asp Lys		
610	615	620
Val Leu Tyr Gly Asp Leu Asp Lys Gly Leu Thr Asn Ser Arg Leu Gly		
625	630	635
Asp Gln Pro Pro Ile Glu Arg His Lys Trp Gly Asn Ser Val Glu Gly		
645	650	655
Arg Ile Pro Thr Gly Thr Val His Asn Gln Ala Lys Glu His Lys Glu		
660	665	670
Asn Phe Asp Gly Lys Gln Asp Asn Lys Lys Leu His Pro Asp Pro Lys		
675	680	685
Lys Ser Pro Leu Asp Arg Phe Met Asp Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn		
690	695	700
Pro Glu Ser Val Ser Pro Ser Phe Ala Arg Ser His Lys Leu Asp Thr		
705	710	715
Met Phe Asp Asp Val Ser Glu Cys Glu Ile His Trp Glu Asp Leu Val		
725	730	735
Ile Gly Glu Arg Ile Gly Leu Gly Ser Tyr Gly Glu Val Tyr Arg Ala		
740	745	750
Asp Trp Asn Gly Thr Glu Val Ala Val Lys Lys Phe Leu Asp Gln Asp		
755	760	765
Phe Tyr Gly Asp Ala Leu Asp Glu Phe Arg Ser Glu Val Arg Ile Met		
770	775	780
Arg Arg Leu Arg His Pro Asn Ile Val Leu Phe Met Gly Ala Val Thr		
785	790	795
Arg Pro Pro Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Tyr Leu Pro Arg Gly Ser		
805	810	815
Leu Tyr Lys Ile Leu His Arg Pro Asn Cys Gln Ile Asp Glu Lys Arg		
820	825	830
Arg Ile Lys Met Ala Leu Asp Val Ala Lys Gly Met Asn Cys Leu His		
835	840	845
Ile Ser Val Pro Thr Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ser Pro Asn Leu		
850	855	860

Leu Val Asp Asn Asn Trp Asn Val Lys Val Cys Asp Phe Gly Leu Ser
865 870 875 880

Arg Leu Lys His Ser Thr Phe Leu Ser Ser Lys Ser Thr Ala Gly Thr
885 890 895

Pro Glu Trp Met Ala Pro Glu Val Leu Arg Asn Glu Gln Ser Asn Glu
900 905 910

Lys Cys Asp Val Tyr Ser Phe Gly Val Ile Leu Trp Glu Leu Ala Thr
915 920 925

Leu Arg Met Pro Trp Ser Gly Met Asn Pro Met Gln Val Val Gly Ala
930 935 940

Val Gly Phe Gln Asp Lys Arg Leu Asp Ile Pro Lys Glu Ile Asp Pro
945 950 955 960

Leu Val Ala Arg Ile Ile Trp Glu Cys Trp Gln Lys Asp Pro Asn Leu
965 970 975

Arg Pro Ser Phe Ala Gln Leu Thr Ser Ala Leu Lys Thr Val Gln Arg
980 985 990

Leu Val Thr Pro Ser His Gln Glu Ser Gln Ser Pro Pro Val Pro Gln
995 1000 1005

Glu Ile Trp Val Asn Ser Ser Thr Pro
1010 1015

<210> 4
<211> 1018
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 4
Met Lys Asn Leu Phe Lys Ser Lys Ile Lys Trp Gln His Arg Ser Asn
1 5 10 15

Asp Pro Ala Ser Ser Gln Gly Gln Gly Gln Gly Leu Pro Gln Gln Thr
20 25 30

Pro Pro Ser Pro Ser Pro Ala Ser Ser Pro Ser Gly Gly Pro Pro Ala
35 40 45

Leu Ser Val Ser Thr Val Ser Ser Ser Ser Pro Ser Ala Ala Ala Thr
50 55 60

Pro Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Thr
65 70 75 80

Gly Gly Glu Asp Tyr Met Leu Ser Glu Glu Glu Phe Gln Met Gln Leu
85 90 95

Ala Met Ala Leu Ser Ala Ser Asn Ser Glu Cys Val Gly Asp Leu Asp
100 105 110

Gly Glu Gln Ile Arg Lys Ala Lys Leu Ile Ser Leu Gly Arg Gly Asp
115 120 125

Arg Phe Ala Ala Val Arg Asp Asp Glu Gln Thr Ala Asp Ala Leu Ser
130 135 140

Arg Arg Tyr Arg Asp Tyr Asn Phe Leu Asp Tyr His Glu Lys Val Ile
145 150 155 160

Asp Gly Phe Tyr Asp Ile Phe Gly Pro Ser Met Glu Ser Ser Lys Gln
165 170 175

Gly Lys Met Pro Ser Leu Ala Asp Leu Gln Thr Gly Ile Gly Asp Leu
180 185 190

Gly Phe Glu Val Ile Val Ile Asn Arg Ala Ile Asp Thr Thr Leu Gln
195 200 205

Glu Met Glu Gln Val Ala Gln Cys Ile Leu Leu Asp Phe Pro Val Ala
210 215 220

Asn Ile Ala Ala Leu Val Gln Arg Ile Ala Glu Leu Val Thr Asp His
225 230 235 240

Met Gly Gly Pro Val Lys Asp Ala Asn Asp Met Leu Thr Arg Trp Leu
245 250 255

Glu Lys Ser Thr Glu Leu Arg Thr Ser Leu His Thr Ser Leu Leu Pro
260 265 270

Ile Gly Cys Ile Lys Ile Gly Leu Ser Arg His Arg Ala Leu Leu Phe
275 280 285

Lys Ile Leu Ala Asp Ser Val Gly Ile Pro Cys Lys Leu Val Lys Gly
290 295 300

Ser Asn Tyr Thr Gly Asp Asp Asp Asp Ala Ile Asn Ile Ile Lys Met
305 310 315 320

Asn Glu Arg Glu Phe Leu Val Asp Leu Met Ala Ala Pro Gly Thr Leu
325 330 335

Ile Pro Ser Asp Val Leu Ser Trp Lys Gly Asn Ser Leu Asn Ser Asn
340 345 350

Ala Arg Leu Thr Gln Asn Pro Leu Ala Gly Ser Ser Ser Thr Thr Asp

355	360	365
Ser Asn Leu Ser Ala Asn Ala Leu Pro Pro Gly His Lys Gly Gly Gln		
370	375	380
Leu Pro Leu Phe Ser Ser Gly Asp Trp Ile Ser Ala Ser Gln Ser Gly		
385	390	395 400
Tyr Glu Lys Asp Gly Ala Thr Thr Ser Ser Gln Ala Ser Ser Ser Gly		
	405	410 415
Thr Thr Ser Val Ala Ala Gly Ser Ala Phe Asp Ser Ser Trp Thr Leu		
	420	425 430
Val Ser His Gly Gln Ser Asp Asp Pro Ser Thr Ser Ala Gly Met Ser		
	435	440 445
Ala Gln Gln Lys Val Ile Leu Pro Gly Gly Glu His Pro Trp Asn Glu		
	450	455 460
Asn Ile Asn Ala Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Val Ser Asp Leu Gln		
465	470	475 480
Gly Asn Ser Glu Ser Ile Asn Leu Phe Ala Asp Leu Asn Pro Phe Gly		
	485	490 495
Gly Arg Glu Pro Lys Arg Thr Ser Val Pro Leu Asn Gly Pro Asp Asn		
	500	505 510
Arg Asn Asn Glu Leu Gln Arg Arg Arg Glu Asn Val Val Pro Ser Thr		
	515	520 525
Arg Arg Pro Gln Gln Arg Leu Val Met Lys Asn Trp Ser Pro Tyr Asn		
	530	535 540
Asp Val Ser Asn Asn Lys Gln Tyr Asn Tyr Val Glu Asp Ser Phe Ala		
545	550	555 560
Arg Arg Asn Ile Gly Asp Asn Ala Ala Ser Ser Ser Gln Val Pro Arg		
	565	570 575
Pro Ser Ala Lys Asn Thr Asn Leu Asn Val Val Val Arg Thr Asp Thr		
	580	585 590
Pro Tyr Met Ala Ala His Asn Tyr Asp Asn Ser Met Ala Gly Ser Ser		
	595	600 605
Ala Met Lys Met Thr Ser Thr Ala Gly Ile Gly Lys Val Pro Asp Lys		
	610	615 620
Val Leu Tyr Gly Asp Leu Asp Lys Gly Leu Thr Asn Ser Arg Leu Gly		
625	630	635 640

Asp Gln Pro Pro Ile Glu Arg His Lys Trp Gly Asn Ser Val Glu Gly
645 650 655

Arg Ile Pro Thr Gly Thr Val His Asn Gln Ala Lys Glu His Lys Glu
660 665 670

Asn Phe Asp Gly Lys Gln Asp Asn Lys Lys Leu His Pro Asp Pro Lys
675 680 685

Lys Ser Pro Leu Asp Arg Phe Met Asp Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn
690 695 700

Pro Glu Ser Val Ser Pro Ser Phe Ala Arg Ser His Lys Leu Asp Thr
705 710 715 720

Met Phe Asp Asp Val Ser Glu Cys Glu Ile His Trp Glu Asp Leu Val
725 730 735

Ile Gly Glu Arg Ile Gly Leu Gly Ser Tyr Gly Glu Val Tyr Arg Ala
740 745 750

Asp Trp Asn Gly Thr Glu Val Ala Val Lys Lys Phe Leu Asp Gln Asp
755 760 765

Phe Tyr Gly Asp Ala Leu Asp Glu Phe Arg Ser Glu Val Arg Ile Met
770 775 780

Arg Arg Leu Arg His Pro Asn Ile Val Leu Phe Met Gly Ala Val Thr
785 790 795 800

Arg Pro Pro Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Tyr Leu Pro Arg Gly Ser
805 810 815

Leu Tyr Lys Ile Leu His Arg Pro Asn Cys Gln Ile Asp Glu Lys Arg
820 825 830

Arg Ile Lys Met Ala Leu Asp Val Ala Lys Gly Met Asn Cys Leu His
835 840 845

Ile Ser Val Pro Thr Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ser Pro Asn Leu
850 855 860

Leu Val Asp Asn Asn Trp Asn Val Lys Val Cys Asp Phe Gly Leu Ser
865 870 875 880

Arg Leu Lys His Ser Thr Phe Leu Ser Ser Lys Ser Thr Ala Gly Thr
885 890 895

Pro Glu Trp Met Ala Pro Glu Val Leu Arg Asn Glu Gln Ser Asn Glu
900 905 910

Lys Cys Asp Val Tyr Ser Phe Gly Val Ile Leu Trp Glu Leu Ala Thr

915	920	925
Leu Arg Met Pro Trp Ser Gly Met Asn Pro Met Gln Val Val Gly Ala		
930	935	940
Val Gly Phe Gln Asp Lys Arg Leu Asp Ile Pro Lys Glu Ile Asp Pro		
945	950	955 960
Leu Val Ala Arg Ile Ile Trp Glu Cys Trp Gln Lys Asp Pro Asn Leu		
	965	970 975
Arg Pro Ser Phe Ala Gln Leu Thr Ser Ala Leu Lys Thr Val Gln Arg		
	980	985 990
Leu Val Thr Pro Ser His Gln Glu Ser Gln Ser Pro Pro Val Pro Gln		
	995	1000 1005
Glu Ile Trp Val Asn Ser Ser Thr Pro ***		
1010	1015	

<210> 5
 <211> 1970
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(1970)
 <223> promoter for OsEDR1 gene

<400> 5	
gtaccaatca atcgccaggt cgttttcttc ttctcttacc caatggaggg gattggagca	60
gttgccgcgt ccaaaaaaga tcagaaatct gctgtctcgt cgacatggat gcattggatc	120
atacagctac acaagctttc tccagtcgga ttggtagatt acacgcgtaa tcgccgacca	180
gatggagaga atcagagtgc taattcgctt cttcttcacc atgaacacga agctttctcat	240
gatcctgtcg ccgatagctt cgcttgaact actacaattt ctgtccattt tccttactgc	300
cgttcgtagc tgaaggttcc ggcctcacag gcagatatgt tcatttttat tcctgaaaaa	360
agtatggaga tttcataacg gaacgatacg aactcatatc gccatcagaa attaaaaatat	420
gaaattgaat tataatttgc agcgaaccaa gtgagccttg cacattgagg ggacacttcg	480
cttgtgatcg tgagttcact acttcacttg gctcttggtc taacatcagt ggtcgtatcg	540
gtacctgcac tactgtacca tcgccatgaa tgaaccaatc tccaggcacg cactctgaac	600

gactgatcgt gattagatta gaaagaaatg caaatgacat agtcagttta gtccactaac 660
 caaatggacc agtcaaagcg agtgttactg ttaccattag atgaacaaga gtaattccaa 720
 ttgctacctc gactagtttg ttgaaactcg atactatcac tatgctgcc a cttaaagctaa 780
 acattttaaa gaattacaat aatgacttat gattttatca aaaggccggt tgcaaattgg 840
 gctcatcgtg tacgggtaaa attactgttt tttttccttt taataaagcc atttgctact 900
 gttgtagtta tgtgaaatac caaacaagtt gtagtgaagc aatagtttcg atcaaataac 960
 tactctccca tcttcattca tgtctccaat aagtttattt tcgactaatc attgtaccga 1020
 agtttatgaa attagaagat aatccctccg tactcataaa aaaagtcgtt taggacaata 1080
 tttaaatcaa accttgggaa tatggaaatc atgaataact ctcaagttgt tgagtttgaa 1140
 aatgtaaaaa ttatataaat agatttgtct tgaaaaatac tttcatactt tcataaaagc 1200
 atatacatat atcacttttc aataaatatt tttatataaa caaagaagcc aaaattgtgt 1260
 ttttgagacc gtgtcgctgt ccaaaacgat ttcctttacg agtgcgaggt gagtaactgt 1320
 tttcaaaagt agctaaagag atgaataatt acattaggat ttttataaag tgagaatatt 1380
 aatattttta ccaacatgtg tgaaattggt gaaaaatatt tttaacagaa gggacagagt 1440
 ttatgaaatt tacgcgatga acatttatgt gagactggtg aagcgggccc aactgtcag 1500
 gattgcctcc ccggtgcatg cacacatcct cccactctgc acgccaactt accccacagg 1560
 gggagggagg gagggagggtg ggccacccca cgatcgacgg ctgcccgtcc tcccactcac 1620
 gtcacgtccc aatctccgcg cccccgcgc gtaatccgc gtccctccct cccgcttctg 1680
 ctacgctaaa cccacccgag tggttccctt cggtaatata ccccccaac tccacgcccc 1740
 cattaacaac taacccccca cccccgcgcg tacgttttgc agtctaacc ctcggaaact 1800
 tcctttcctt tccttcctcc cacgcttctt cttcttcttc ttttccctt tccccaacct 1860
 cgccgtcctt cgcttgctca cgcggccttc tccgatcgcg gcggcggcgg cggaggagga 1920
 ggagtacggg gaggggagcg cgaggatcga gcggagacgt ggttgacgag 1970

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer for S1 construct

<400> 6
gtaccaatca atcgccaggt cgtttt 26

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer for S2 construct

<400> 7
gcactctgaa cgactgatcg tga 23

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer for S3 construct

<400> 8
cataaaaagca tatacatata tca 23

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer for S4 construct

<400> 9
ccaacatgtg tgaaattggt ga 22

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer for S5 construct

<400> 10
tcctcccacg cttctttcttc tt 22

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer for AS construct

<400> 11
ctcgtcaacc acgtctccgc tcga 24