



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0062947

(43) 공개일자 2007년06월18일

(21) 출원번호 10-2007-0007266(분할)

(22) 출원일자 2007년01월23일

심사청구일자 2007년01월23일

(62) 원출원 특허10-2005-0122351

원출원일자 : 2005년12월13일

심사청구일자

2005년12월13일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 김정국

서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학

이정환

서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학

(74) 대리인 김선애

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 식물의 개화시기 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의개화시기 조절 방법

(57) 요약

본 발명은 벼 (*Oryza sativa*)에서 분리한 식물의 개화시기 조절 유전자 *OsFCA*(서열번호 1), 상기 유전자 염기서열에 의해 암호화되는 개화시기 조절 단백질 *OsFCA*(서열번호 2) 및 상기 유전자를 식물체에 과다 발현시킴으로써 식물의 개화시기를 조절하는 방법에 관한 것이다. 따라서 본 발명에서 분리된 *OsFCA* 유전자 및 상기 유전자로부터 발현되는 개화시기 조절 단백질은 식물체의 개화시기를 조절함으로써 식물체의 생산성 증대 및 타 식물체에서 개화시기 조절 유전자의 탐색 등에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도

도 1a

특허청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1의 염기서열을 갖는 식물의 개화시기 조절 유전자 *OsFCA*의 α1 전사체를 증폭하기 위한 서열번호 4 및 서열번호 5의 PCR용 프라이머.

청구항 2.

서열번호 1의 염기서열을 갖는 식물의 개화시기 조절 유전자 *OsFCA*의 α2 전사체를 증폭하기 위한 서열번호 6 및 서열번호 7의 PCR용 프라이머.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 벼 (*Oryza sativa*)에서 분리한 식물의 개화시기 조절 유전자 *OsFCA*, 상기 유전자 염기서열에 의해 암호화되는 개화시기 조절 단백질 (*OsFCA*) 및 상기 유전자를 식물체에 과다 발현시킴으로써 식물의 개화시기를 조절하는 방법에 관한 것이다.

식물의 정단 분열 조직이 영양 생장기에서 생식 생장기로 전환하는 것은 식물의 성공적인 번식을 위해 중요하며, 이는 내재적인 유전적 요소들과 외부의 여러 환경 신호들에 의해 조절되어진다.

많은 생리학적, 분자생물학적 연구들을 통해 애기장대에서 이러한 개화시기 조절 기작들이 밝혀졌다. 그 중에서 *fca*, *fld*, *fpa*, *flk*, *fve*, *fy*, *ld*와 같은 개화시기 돌연변이체들은 늦은 개화시기를 보이며, 광주기와 춘화처리에 의해 영향을 받는다. 이러한 돌연변이들에 관련된 유전자들은 식물의 내재적인 발달 신호의 인지에 관여되며, 특히 *FCA*와 *FVE* 유전자는 대기 온도의 변화의 인지에도 관여를 한다. *FCA*는 단백질-단백질 상호작용 부위를 가진 RNA 결합 단백질을 암호화하며, 아네닐중합체형성인자(polyadenylation factor)인 *FY* 단백질과 서로 상호작용을 한다.

또 다른 RNA 결합 단백질인 *FPA*와 *FLK*도 밝혀졌는데, 이는 개화시기 조절에 있어 전사 후 기작이 중요하다는 것을 보여준다. *LD* 유전자는 핵 단백질인 전사 조절 인자를 암호화한다. *FLD*와 *FVE*는 각각 포유류의 히스톤 탈아세틸화효소 복합체(histon deacetylase complex)의 한 성분과 망막모세포종(retinoblastoma) 관련 단백질을 암호화하는데, 이들은 히스톤의 변형을 통한 개화시기 조절 기작에 연관이 있는 것으로 보인다. 자발적 경로에 관여하는 돌연변이체들에서는 개화시기 억제 유전자인 *FLC*의 발현이 높은 것으로 보아 자발적 경로 유전자들은 *FLC* 발현의 억제를 통해 개화시기를 촉진한다. 또한, 작용 기작이 다른 여러 유전자들이 존재하기 때문에 자발적 경로는 단순한 일직선상의 관계가 아니라 여러 서브그룹(subgroup)들이 복합적으로 작용하는 신호전달 체계를 구성하는 것으로 보인다.

한편, 애기장대와 달리 벼는 단일 조건에서 개화가 촉진되는 단자엽 식물로서 이들의 개화시기 (출수기)는 광주기와 영양 생장기의 기간에 의해 영향을 받으며, 이러한 요인들은 벼가 다양한 경작지에서 생장하는데 관여하는 중요한 농업적 형질이다. 최근에 벼의 전체게놈에 대한 염기서열이 완료되고, 비교 유전체학에 대한 연구가 진행되면서 벼는 중요한 모델식물로서 주목을 받고 있다.

벼의 개화시기에 관련된 양적 형질을 찾기 위해 자포니카(japonica) 품종인 Nipponbare와 인디카(indica) 품종인 Kasalath간의 교배를 통해 광주기에 관련된 14개의 유전자위 (*Hd1*-*Hd14*)가 발견되었다. 이들 중에서 *Hd1/Se1*, *Hd3a*, *Hd6*, *SE5*가 각각 애기장대의 *CO*, *FT*, *CK2 α subunit*, *HY1* 유전자에 대한 기능적인 유사 유전자임을 밝혔으며, 또한 *OsGI*와 *OsSOC1*도 애기장대의 *GI*와 *SOC1*가 기능이 유사함을 밝혔다. 그러나, 광주기에 관련된 유전자들의 구조와 생화학적 기능들이 벼와 애기장대 간에 유사함에도 불구하고, 유전자들 간의 조절 기작은 차이가 있음이 보고되었다.

현재까지 벼의 게놈 내에 애기장대의 개화시기 조절 유전자들에 대한 유사 유전자들이 존재하지만, 광주기 경로(photoperiodic pathway)와의 자발적 경로(autonomous pathway) 같은 개화시기 조절 경로의 유전자의 기능에 대해서는 보고가 된 바가 없다. 따라서, 벼에서 개화시기 조절 유전자 및 그 기능에 대한 연구는 계속 요구되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기와 같은 문제점 및 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명자들은 단일 식물의 모델인 벼로부터 애기장대 FCA 유사 유전자를 벼에서 찾아 OsFCA 유전자를 분리하여 이를 이용하여 식물체의 개화시기를 조절할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 벼에서 분리된 신규한 개화시기 조절 유전자 및 이 유전자 염기서열에 의해 코딩되는 개화시기 조절 단백질을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합벡터에 의해 형질전환된 박테리아 및 애기장대를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 이용하여 식물체의 개화시기를 촉진하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 신규한 식물의 개화시기 조절 단백질을 OsFCA를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 단백질을 암호화하는 서열번호 1의 식물의 개화시기 조절 유전자 OsFCA를 제공한다.

또한, 본 발명은 또한 상기 유전자를 포함하는 재조합벡터, 상기 재조합벡터에 의해 형질전환된 박테리아 및 애기장대를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 식물체에서의 개화시기를 조절하는 방법을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명은 상기 유전자 및 단백질을 이용하여 식물의 개화시기 조절 유전자 또는 단백질을 탐색하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명의 구성에 대해 상세히 설명한다. 본 명세서에서 본 발명에 의한 벼 FCA의 영문표기와 관련하여 이탤릭체는 유전자를 보통글씨체는 단백질을 나타낸다.

1) *OsFCA* 유전자의 분리

본 발명자들은 벼 (*O. sativa*)의 FCA 유사 유전자를 찾기 위하여, 애기장대 FCA의 WW 도메인과 높은 유사성을 보이는 EST 클론(GenBank accession number: C74748)을 탐침으로 벼의 cDNA 도서관을 탐색하였고, *OsFCA* cDNA 전체클론(GenBank accession number: AY730687)을 분리하였다. 상기 유전자의 염기서열은 도 1a에 도시되어 있고, 서열번호 1을 부여하였다.

염기서열 분석결과, 벼 FCA 단백질은 두 개의 RNA 결합 도메인 (RBD 또는 RRM)과 한 개의 WW 도메인을 가진 738개의 아미노산으로 구성되어 있었다 (도 1b). 상기 아미노산 서열은 서열번호 2를 부여하였다. 애기장대 FCA 단백질 전체와 유사성을 비교했을 시에는 38%였지만, 두 개의 RBD 도메인과 한 개의 WW 도메인 부분에서만 아미노산 유사성을 비교했을 시에는 각각 78%와 93%의 높은 유사성을 보였다 (도 2a). 특히하게 *OsFCA* 단백질은 애기장대 FCA 단백질에는 없는 글라이신 풍부 지역이 단백질 N-말단에 존재하였다. 그리고, 본 발명에 의한 *OsFCA* 단백질의 글라이신 풍부 지역은 다른 단자엽 식물의 FCA 단백질 (GenBank accession number: AY230398)에서도 보존되어 있었다.

OsFCA 유전자 구조를 분석하기 위하여 *OsFCA* cDNA 전체클론을 탐침으로 벼 BAC 도서관을 탐색하였고, 11.5kb의 *HindIII* 유전자 단편을 얻어 염기서열을 분석하였다. *OsFCA* 유전자는 17개의 엑손과 16개의 인트론으로 구성되고, 애기장대나 콩에서와 마찬가지로 인트론 3의 길이가 2,503bp로 가장 길었다 (도 2b). 또한, 벼와 애기장대의 FCA 유전자들 간의 엑손-인트론 경계와 상대적 길이들은 상당히 유사하였다. 서던(Southern) 분석과 데이터베이스 검색 결과는 *OsFCA* 유전자는 애기장대 FCA와 마찬가지로 하나가 존재하지만, 보리 및 밀과 같은 다른 단자엽 식물에서는 여러 개가 존재한다는 것을 보여주었다 (도 3a와 3b).

2) *OsFCA* 유전자 내에서 인트론 3의 얼터너티브 스플라이싱(alternative splicing) 기작

OsFCA 유전자가 얼터너티브 스플라이싱(alternative splicing) 기작에 의해 여러 전사체들을 만드는지 확인하기 위하여 노던(Northern) 분석을 수행하였다. (도 4a). γ 전사체를 만드는 *OsFCA* cDNA 전체 클론을 탐침으로 사용했을 시에는 β 와 γ 전사체에 해당되는 밴드만 확인할 수 있었고, 다른 전사체들은 확인할 수 없었다. 벼 EST 데이터베이스를 분석해 본 결과, *OsFCA* β 전사체 [(GenBank accession number: BI813314), 엑손 2 일부분-엑손 3전체-375bp의 인트론 3-20bp의 polyA tail로 구성]를 확인할 수 있었다.

노던 분석에서 얻어진 3kb와 1kb 밴드가 각각 *OsFCA* γ 와 β 전사체에 해당되는 지 알아보기 위하여 γ -특이적 탐침과 β -특이적 탐침을 사용하여 실험을 수행한 결과 각 밴드가 해당 전사체임을 확인할 수 있었다. *FCA a* 전사체는 발현양이 1% 이하로 아주 적게 발현되기 때문에 도 4b에 표시된 프라이머들의 조합을 가지고 벼 cDNA pool에서 PCR을 통해 *OsFCA* 유전자의 *a* 전사체를 확인해 보았다. 도 4c에서 PCR 산물들을 확인한 후에 염기서열을 분석해 본 결과 인트론 3전체를 가진 *OsFCA* 유전자의 *a* 전사체를 확인할 수 있었다. 그러나, *OsFCA* 유전자의 δ 전사체를 확인하기 위하여 도 4b에 표시된 프라이머를 사용해 보았지만, 확인할 수가 없었다. 이 결과들을 종합하여 도 4d에 *OsFCA* 유전자의 얼터너티브 스플라이싱(alternative splicing) 기작에 의해 만들어지는 전사체들을 보여주었다.

3) *OsFCA* 유전자의 시간적, 공간적 발현양상 조사

OsFCA 유전자의 발현양상을 조사해보기 위하여 벼의 여러 조직과 발달 단계에서 전체 RNA를 추출하여 노던(Northern) 분석을 수행하였다 (도 5). *OsFCA* 유전자의 발현은 거의 모든 조직에서 관찰되었으며, 특히 화기 발달 단계의 초기에 강하게 발현되었다. 그리고, 어린 생장 단계의 모든 조직에서도 *OsFCA* 유전자의 발현이 관찰되었다 (도 4a).

4) 애기장대 *fca-1* 돌연변이체에서 *OsFCA* 유전자의 과다 발현

OsFCA 유전자가 실질적으로 개화시기 조절 기능을 가지고 있는지 확인하기 위하여 만기 개화 표현형을 보이는 애기장대 *fca-1* 돌연변이체에 35S 프로모터를 사용하여 *OsFCA* cDNA 전체 유전자를 과다 발현시켜 보았다. 형질전환 제1세대에서 일부 개체들 (전체 50 라인 중에 14 라인)이 심각하게 변형된 잎과 열리지 않는 꽃봉오리 표현형을 보였는데 이는 필요 이상의 *OsFCA* 단백질 발현이 식물생장에 해로운 영향을 준 것으로 보였다 (도 6).

그 외의 형질전환체에서는 다양한 수준으로 개화시기가 앞당겨졌고, 다음 2세대에서 항생제 저항성이 3:1로 분리되는 라인들에서 개화시기를 조사해본 결과 애기장대 *fca-1* 돌연변이체의 개화시기가 앞당겨졌음을 확인할 수 있었다 (도 7과 표 1). 형질전환여부는 형질전환 식물체에서 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하여 PCR로 도입된 *FCA* cDNA가 증폭되는 지로 확인하였다 (도 8).

또한, 형질전환체에서 개화시기의 변화가 *OsFCA* 유전자에 의한 애기장대 개화시기 조절 유전자의 발현양상의 변화에 의한 것인지 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행해 보았다(도 9a). *OsFCA* 유전자의 발현이 특히 증가된 개체들 (2번과 9번)에서는 개화시기 촉진자인 *SOC1* 유전자의 발현이 상당히 증가되어 있었고 이는 앞당겨진 개화시기와도 연관이 있었다. 그러나, 개화시기 억제자인 *FLC* 유전자의 발현은 감소가 되질 않았다. 또한, 다른 개화시기 촉진자인 *CO* 유전자의 발현양상 변화도 관찰이 되질 않았다 (도 10). *OsFCA* 유전자의 과다발현에 의해 애기장대 *FCA* 유전자의 γ/α 와 β 전사체의 상대적인 양이 조절되는 지 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행해 상대적인 양을 비교해 보았다 (도 9b). 애기장대 *FCA* 유전자의 전사체들간의 상대적인 양을 비교해 본 결과 비형질전환체와 별 차이가 없었다.

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의한 벼에 분리한 *OsFCA* 단백질은 개화시기를 조절하는 단백질인 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명의 유전자를 이용하여 식물체를 형질전환시킴으로써, 식물의 조기 개화 및 왜성 현상을 유도하여 생육기간을 단축하고 작물 생산량을 증대시킬 수 있다.

한편, 본 발명의 *OsFCA* 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자는 식물의 개화시기 조절 단백질 또는 유전자를 탐색 등에 유용하게 이용될 수 있다. 본 발명의 유전자와 결합하는 물질, 상기 *OsFCA* 유전자의 발현 억제 또는 활성화하는 물질을 탐색함으로써 식물의 개화 관련성을 탐색하는 용도로 사용될 수도 있다. 구체적으로 일반적으로 사용되는 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯 분석, 서던 블롯 분석, 효소 면역반응(ELISA) 및 2-D 겔 분석 등을 포함하는 다양한 방법으로 분석을 수행할 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1. *OsFCA* 유전자의 동정]

OsFCA cDNA 전체 클론(GenBank accession number: AY730687)은 일본의 Takuji Sasaki (National Institute of Agrobiological Resources, Japan)로부터 분양받은 클론(GenBank accession number: C74748)을 탐침으로 cDNA 유전자 도서관을 탐색하여 찾았다. 또한, *OsFCA* 전체 게놈 유전자는 미국의 CUGI (Clemson University Genomics Institute, USA)로부터 구입한 벼 BAC 도서관 필터(filter)를 *FCA* cDNA 전체 클론(GenBank accession number: AY730687)을 탐침으로 탐색하여 찾았다.

이들 유전자들의 전체 염기서열을 빅다이 터미네이터 사이클 시퀀싱 키트(BigDye terminator cycle sequencing kit; Applied Biosystems, USA)를 이용하여 DNA 시퀀싱(sequencing)으로 결정하였고, 다중서열 정렬(multiple amino acid sequence alignment)은 Neighbor 프로그램을 이용하여 실시하였다. 그 결과, 도 1a 및 도 1b에 본 발명에 의한 벼 *FCA* (*OsFCA*) 유전자의 cDNA 염기서열 및 벼 *FCA* 단백질의 아미노산 서열을 나타내었다. 또한, 도 2a에는 본 발명에 의한 벼 *FCA* 단백질의 아미노산 서열을 애기장대 *FCA* 단백질의 아미노산 서열과 비교하여 도시하고, 도 2b에는 본 발명에 의한 벼 *FCA* 유전자와 애기장대 *FCA* 유전자의 구조 및 도메인 구조를 비교하여 도시하였다.

[실시예 2. 노던(Northern)과 RT-PCR 분석]

전체 RNA (total RNA)를 TRI 시약(Molecular Research Center, USA)을 이용하여 여러 벼 조직으로 추출하였다. *OsFCA* 유전자의 β 와 γ 전사체를 확인하기 위하여, *OsFCA* cDNA 전체 클론, *OsFCA* cDNA의 C-terminal 부분 (*SacI*과 *SmaI*으로 처리된 750 bp), 그리고 *OsFCA* 유전자 인트론3의 일부분 (84에서 337 bp)이 탐침으로 사용되었다.

노던(Northern) 분석은 RNA를 포르말데히드(formaldehyde)가 포함된 아가로즈젤(agarose gel)에서 전기영동한 후 나일론막(nylon membrane; Amersham, UK)에 흡착시켜 이를 동위원소로 표지한(labeling) 탐침을 이용하여 혼성화(hybridization)하고 PhosphorImager(Fuji, Japan)로 검출(detection) 하였다.

OsFCA 유전자의 α 전사체를 확인하기 위하여 벼의 초기 화기조직으로부터 분리한 RNA로부터 M-MLV 역전사효소(Invitron, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이를 주형으로 5'-GGAGGTTCCACCCGTACC-3'(*OsEx1F*; 서열번호 3)과 oligo-dT₁₈ 프라이머들을 사용하여 첫 번째 PCR을 수행하였으며, 조건은 94도 30초, 55도 30초, 72도 2분의 프로그램을 30회 반복한 후 72도에서 7분간 반응을 계속하였다. 이 반응물을 희석하여 주형으로 *OsFCA* 유전자 $\alpha 1$ (2617bp)을 증폭하기 위하여 5'-CGGCGGAGGCTACAGAAG-3'(*OsEX1F*; 서열번호 4)과 5'-TCGTGAAATTCGACTCCACA-3'(*OsIn3R*; 서열번호 5) 프라이머들을 사용하였고, 또한 *OsFCA* 유전자 $\alpha 2$ (2109bp)를 증폭하기 위하여 5'-CATGAATGTTGCTGGCAGTT-3'(*OsIn3F*; 서열번호 6)과 5'-TTCCGAGTAACAGCTTACCAATTT-3'(*OsUR*; 서열번호 7) 프라이머들을 사용하였다. *OsFCA* 유전자 δ 전사체를 증폭하기 위해서는 5'-ATAGGTTATCTGGTCAGCTTCCTG-3'(*OsEx13F*; 서열번호 8)과 5'-TTCCGAGTAACAGCTTACCAATTT-3'(*OsUR*; 서열번호 7) 프라이머들을 사용하였다. 증폭산물은 2% 아가로즈젤(agarose gel)에서 전기영동하여 확인하였고, 또한 DNA 시퀀싱(sequencing)으로 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 도 4a 내지 도 4d에 도시하였다.

[실시예 4. 애기장대에서 *OsFCA* 유전자의 과다발현]

35S 프로모터를 이용한 *OsFCA* 형질전환 벡터를 만들기 위하여 *OsFCA* 전체 cDNA 클론을 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단한 후, pCGN18 벡터에 삽입하였다(Lee et al., 2000). 이 형질전환 벡터를 아그로박테리움 튜메페이스스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 형질전환한 후에 진공 침윤방법을 통해 애기장대 *fca-1* 식물체에 도입하였다(Bechtold et al., 1993). 형질전환 식물체에 *OsFCA* 유전자가 들어간 지를 확인하기 위하여 PCR을 통해 수행하였다. 그 결과는 도 6 내지 도 8에 나타나 있다.

다음의 표 1은 본 발명에 의한 벼 *FCA* 유전자를 과다 발현시킨 식물체의 개화시기를 보여주는 표이다. 개화시기는 전체 잎 수로 평가되었다.

[표 1]

식물체	장일조건에서의 전체 잎 수*	조사된 T ₂ 세대의 개체수
Ler (야생형)	9.6±1.1	12
fca-1	26.5±4.0	12
35S::OsFCA fca-1		
#2	16.9±4.4	42
#9	17.4±3.5	22
#28	19.2±5.2	18
#36	20.9±2.6	26

* 잎 수는 좌엽(rosette) 및 경생엽(cauline leaves) 모두를 포함하며, 식물체는 장일조건(16h light/8h dark)에서 생육됨.

[실시예 5. 양적 발현(Semi-quantitative) RT-PCR 분석]

전체 RNA를 장일조건에서 키운 애기장대 식물체에서 분리하여, cDNA를 합성한 후에 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 1.5% 아가로즈겔(agarose gel)에 전기영동한 후 나일론막(nylon membrane)에 흡착시켜 이를 동위원소로 표지한 (labeling) 탐침을 이용하여 혼성화(hybridization)하였다. PCR 조건은 94도 30초, 52-60도 30초, 72도 2분의 프로그램을 30회 반복한 후 72도에서 7분간 반응을 계속하였다.

여러 유전자들을 증폭하기 위해서 사용된 프라이머들은 다음과 같다. 벼 FCA 유전자, 5'-TGAGGAGCATGGAGATGTTG-3'(서열번호 9)과 5'-GGTTGTGAAGAGCTCTGATGG-3'(서열번호 10) 프라이머들; 애기장대 FCA β 유전자, 5'-TCAATTGTTGGAGCTCGGTA-3'(서열번호 11)과 5'-TGGAGAGGAAAATAGCGATG-3'(서열번호 12) 프라이머들; 애기장대 γ/α 유전자, 5'-AGCAACCAAACCAAAATTTACCAC-3'(서열번호 13)과 5'-CGGGTATATGTGTCCGAGCATAAT-3'(서열번호 14) 프라이머들; 애기장대 FLC 유전자, 5'-GTAGCCCACAAGTCACCTCTTCTCCA-3'(서열번호 15)과 5'-GAGATTTGTTCCAGCAGGTGACATCT-3'(서열번호 16) 프라이머들; 애기장대 SOC1 유전자, 5'-GGATCGAGTCAGCACCAAACC-3'(서열번호 17)과 5'-CCCAATGAACAATTGCGTCTC-3'(서열번호 18) 프라이머들; 애기장대 β-tubulin 유전자, 5'-CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA-3'(서열번호 19)과 5'-TCACCTTCTTCATCCGCAGTT-3'(서열번호 20) 프라이머들.

그 결과를 도 9a 내지 도 10에 나타내었다.

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 벼에서 분리한 OsFCA 단백질은 개화시기를 조절하는 단백질인 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명의 유전자를 이용하여 식물체의 개화시기를 조절함으로써 식물체의 생산성 증대 및 타 식물체에서 개화시기 조절 유전자의 탐색 등에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1a 및 도 1b는 본 발명에 의한 벼 FCA (OsFCA) 유전자의 cDNA 염기서열(서열번호 1) 및 벼 FCA 단백질의 아미노산 서열(서열번호 2)을 보여주는 도면.

도 2a는 본 발명에 의한 벼 FCA 단백질의 아미노산 서열을 애기장대 FCA 단백질의 아미노산 서열과 비교한 도면.

도 2b는 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자와 애기장대 FCA 유전자의 구조 및 도메인 구조를 비교한 도면.

도 3a는 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자의 서던 분석 결과를 보여주는 도면.

도 3b는 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자가 보리와 밀의 게놈에서 존재하는 것을 보여주는 서던 분석 결과 도면.

도 4a는 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자의 γ 와 β 전사체를 보여주는 어린 조직에서의 벼 FCA 유전자에 대한 노던 분석 결과 도면.

A1-A3 : aerials, R1-R3 : 뿌리, 25S rDNA : 전체 RNA의 동일 양 로딩을 확인하기 위해 사용된 대조군

도 4b는 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자의 α 전사체를 확인하기 위해 사용된 프라이머들의 위치를 보여주는 도면.

도 4c는 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자의 α 전사체를 PCR로 확인한 것을 보여주는 도면.

M : 마커, 레인 1 및 3 : 각각 프라이머 OsEx1F(서열번호 4)/OsIn3R(서열번호 5) 및 OsIn3F(서열번호 6)/OsUR(서열번호 7)로 증폭된 벼 RNA로부터의 RT-PCR 산물, 레인 2 및 4 : 각각 레인 1 및 3에 대한 음성 대조군

도 4d는 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자의 얼터너티브 스플라이싱(alternative splicing) 기작에 의해 만들어지는 여러 전사체들을 보여주는 도면.

오픈 박스(open box)는 엑손(exon), 박스 사이의 선들은 인트론(intron), 그리고 화살표는 δ 전사체 검출을 위한 한 쌍의 PCR 프라이머를 나타냄

도 5는 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자의 시간적, 공간적 발현양상을 보여주는 노던 분석 결과 도면.

P1-P8 : 유수(panicle) 발달 단계, L : 성숙한 잎 조직, R : 성숙한 뿌리 조직, 25S rDNA : 전체 RNA의 동일 양 로딩을 확인하기 위해 사용된 대조군

도 6은 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자를 과다 발현시킨 일부 식물체에서 비정상적인 표현형을 보여주는 사진.

A : 심각하게 변형된 잎의 표현형, B : 열리지 않은 꽃봉우리 표현형

도 7은 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자를 과다 발현시킨 식물체에서 개화시기의 회복을 보여주는 사진.

A : 야생형 애기장대, B : 애기장대 *fca-1* 돌연변이체, C : 애기장대 *fca-1* 식물체가 35S :: sense OsFCA에 의해 형질전환되어 벼 FCA cDNA가 과다발현된 형질전환체

도 8은 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자를 과다 발현시킨 식물체에서 벼 FCA 유전자의 존재를 보여주는 벼 FCA cDNA에 대한 PCR 결과 도면.

Ler : 야생형, *fca-1* : *fca-1* 돌연변이체, 2-13 ~ 36-33 : 벼 FCA 유전자에 의한 형질전환체

도 9a는 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자를 과다 발현시킨 식물체에서 개화시기 조절 유전자들의 발현을 보여주는 도면.

Ler : 야생형, *fca-1* : *fca-1* 돌연변이체, 2-13 ~ 36-33 : 벼 FCA 유전자에 의한 형질전환체, TUBULIN : 대조군으로 증폭된 β -Tubulin RNA

도 9b는 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자를 과다 발현시킨 식물체에서 애기장대 FCA γ/α 전사체와 β 전사체의 상대적인 발현양을 보여주는 도면.

도 10은 본 발명에 의한 벼 FCA 유전자를 과다 발현시킨 식물체에서 개화시기 조절 유전자인 CO의 발현양상을 보여주는 도면.

도면

도면1a

```

BGCACBAGCTGCTGCTGCAAAACCTAGCCACCTCCCTCCACCCACATGCACGGGGGGGACCGCTCCACCGACCCGCTGCTCCGGCCCGGGG
CCGGTTCCTGGGGGGGGGGGACGGCGGATTGGCGGGGGCCCTTCTGCTGGTGGTCCGGGGTGGGGGGGGGGTAGCGGCGAGCCACCCACCGCTTC
TCCCGTGGTGGGGTGGGGGGGGGGGACGGTGGCGGAGCGGAGGTGGAGGGGGAGGTTCCACCGTACCGTGGCCGTCGGACCACTCCGGGGGGGG
AGGCTACAGAGCGGGGGGGGGGACGGTACGGGGGAGCGGGTAGCGGGGGGAGGTTCCACCGTACCGTGGCCGTCGGACCACTCCGGGGGGGG
GAAACAACTATGTTAACTTTTATTGGGTGAGTTCCAAGGACAGCGACTGAGGATGATGCTGCTTTATTGAGGAGCATGGAGATGTTGTTGAAGTT
GCTTTGATCAAGGATAGGAAGACTGGTGAACAGCAAGGTTGTTGTTTGTAAATATGCTACTTCTGAAGAGGCTGAGCGAGCCATCAGAGCTCTTCACAA
CCAGTACACTTTACCTGGGCAATGGGCCCTATTCAAGTCAGATATGCTGATGGTGAAGGGAACGCCATGGGGCTATTGAGCAAGCTGTTGTTGCGCAT
CACTCAATAAGCAAGCTACTGCGAAGGAGATTGAAGAGATTGTCGCGCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
CGAGGTTGTCGCTTGTCAAATTCTCATCAGAGAACCGCGCTGGCAGCCATGAGTGTCTGAGTGGGAATTATGTAATGAGGGGGTGGGAGCAACCAATT
AATAATTGCTGCTGATCCTAAGAGACCTAGACCTGGAGAATCAAGGGTGGTCTGCTTTGAGGTCCTGGTTTTCAGTCCACATCTGATGAGCTC
TTGTTATCAGGGCGACCGCAACCTTGATGAACCAAGGGTGGCATATGCTCTGACTTTGGCATCCATCAAGCCCAAGGTGAGCACTCATCAGTTT
AATAACTTTGGATCTGACAATCCTATGCTCCGAAAGGAGTACTGTTACATCAACAACAGATACGGCCACTTTTCGACCTCAGATGTTCAAGGGAATGG
CTCTTTGTCAGGCAAGAGCTGTGCGAAGTTGCTGACATATGGGATGAACCTCTCCCATGGCACAAGGCCATCATCTGGAGGCCAGCAGATCCCA
CTTTGCAAAAGCTACCAAGGTTGCTCAGAAATTTCCCTGTTCAATTGCAGAAATATCAGCTGGGACAACCTTTGAGGGTCTGCTCAACAGATTTGGTCAG
CTTCAAGTTCCACAATCTATGGGCTCTGTTCTTTGGCCAGAATAGGTTATCTGCTGAGCTTCTGCTGTCACAGCGGTTGATGCAACAAATGCTTCCGT
CAGCGCTGTGAGGTTGCTTCAGCGCTGTGCAATTCATGCAAGCTATTCCGGGCAACAGCATCTTCCCTCAAATGTTGACCAACAAATGCTTCAGCAGC
CAGTGCAGCAGATGCCATCGCAAGCACCACAATTGCTACTCCAACAGCAAGCTGCTTTGCAATCCAGTTATCAATCTTCAGCAGGCAATTTATCAGCTT
CAACAACAGCTGCAACTAATGCAGCAGCAGCAATGCAATCTAAACCATCAACAACCCACAGGTCAGCCAGTCAATCTAGTAACCTGGTGCCCC
AAATGCCATTATTCCATCAAGATTAAACAATTCGCCAGCAGGCTACTTCAGCTGAGTTCTTTAACTGCAATGGACTGAACATAGTCTGCTGAAG
GTTTTAAATCTACTACAATAGCATAACTCGAGAGAGTAAGTGGGTAAGGCTGAAGAGTATGCTGTATGAGCAACAGCAACAGCAGCAACAGCAG
AACTACTTTTGTTCACAGCAGCAACAAAACCTTGCCATGCAGCAACTCAGTCACACCTCAGGCTCAGACACATCCAGCAATGCAACCTGTCCAACA
AATTCTCAGGCACAAACAGGACAGCAAAATGCAGATGAACAGCAGGAATTGAATTATCTCAGCTACAGACTCCTGGTGTATTGATCCCAAGTAGGA
TACAACAGGCAATCAATCTGCACAAGAGCTGCTTGBAAAAGTTGAGACTGAAGGTGAATGATAAATGCTAAGCTGTTACTCGGAATGGCTCCACTCA
ACCTGCTGCTCCATCAATGCTTGCAGTGGCTGATGCTGAGTGGTGCAAGCGGCCATGCCATGCTGTAAGTCTGAGATAGCTTAGATTGATGT
CTAAAAAGTTGAGCTCCAATCCGTGTAATGTTTGCAGTCTAGGCTTGTACCGCTGTAACATTTCTGCTGATTAGAATGTTGGCTTTCTCTGATATAA
AA

```

도면1b

```

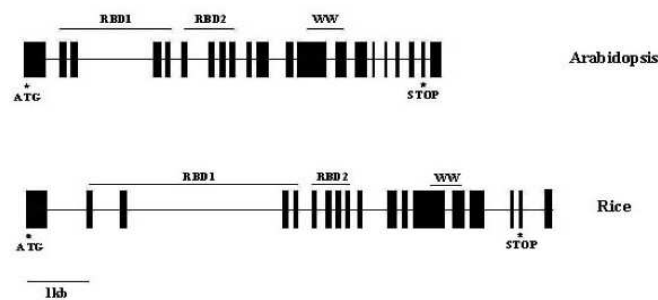
MHRGDRSTDPSSGPAPGSRGGGGRFGRGPRWSSGGGGGGGSPPHRFSRGGGGGGGGGGGGGGGRFHPYRGPDSHSGGGGYRSGGGGEYGPSSGP
RHRYGSRGGRGSHDNRNNYKLFIGSVPRATEDDVRPLFEHGDVVEVALIKDRKTGEQGGCFVKYATSEEAERIRALHNQYTLPGAMGPIQVRYAD
GERERHGAIEHKL FVASLNKQATAKEIEEIFAPYGHVEDVYIMKDGMRGSRGCGFVKFSSREPALAAMSALSGNYVMRGCEQLIRFADPKRPPRGESRG
GPAFGPGFSPRSDAALVIRPTANLDEPRGRHMPDSSHPSRSPRAPHQNNFGSDNPMAPKGSVTSTTDTATFRPDMFSGNGLSSQTAVPSSHHMGN
PPPMAGHHLGGQIPIPLQKLPGLPQNFVQLQNLQPLQGPAGQIGQLQVPGSMGPGSFQGNRLSGQLPVSQPLMQNANVSQVQPSAVNSMQAIIP
GQHLPSNVAPQMLQOPVQMPQAPQLLLQQQAALQSSYQSSQQAIIYQLGQQLQMLQQQQSNLNHQPTGQGPVQSSNPQAPNAIIPSNINTIPQQAATS
PAVPLTCNTEHTSPEGFKYNNISITRESKNDKPEEYVLYEQQQQQQQQQLLLLQQHQQLAMQQLQSPQQAQTHPAMQPVQQIPQAQQQQQQMMKQQE
LNYTQLQTPGADPSRIQQGIQAGERAUKS

```

도면2a

OsFCA	MHRGGDRSTDPSSGPAFGSRGGGDRFGRGPRWSSGGGGGGSGSPPHRFSGGGGGGGGGGGGGGRFHPYR	75
FCA	MNGPPDRVDFKPMGPHHGGSFPMGFAYDDGFRPMGPNGGVGGEGTRSIVGARYNYPKYPPESESPDRRRFIGKA	75
Consensus	M...DR...GP...G...R...GG.G...RF...	
OsFCA	GPSDHSGGGYRSGGGGEYGEPSGPRHRYGSGRGDHSDDNRN...VVKLFVGSVPRTATEDDVRPLFEHGDVVE	15C
FCA	MESDYSVRPTTPPVQQPLSGQKRGYPISDHGSFTG-TDVSRRSS-TVKLFVGSVPRTATEEIRPYFEQHGNVLE	14B
Consensus	..SD...P...GS..G...D...VKLF.GSVPRTATE...RP.FE.HG.V.E	
OsFCA	VALIKDRKTGEQQGCCFVKYATSEEAERAIRALHNQYTLPGAMGPIQVRYADGERERHGATEHKLFVASLNKQAT	225
FCA	VALIKDKRTGQQGCCFVKYATSKDADRAIRALHNQITLPGGTGPVQVRYADGERERIGTLEFKLFVGS LNKQAT	223
Consensus	VALIKD..TG.QQGCCFVKYATS..A.RAIRALHNQ.TLPG..GP.QVRYADGERER.G..E.KLFV.SLNKQAT	
OsFCA	AKEIEEFAPYGHVEDVYIMKDGMRQSRGCGFVKFSSREPALAAMSALSGNYVMRGCEQLIIRFADPKRPRPGE	30C
FCA	EKEVEEIFLQFGHVEDVYLMRDEYRQSRGCGFVKYSSKETAMAAIDGLNGTYTMRGCNQPLIVRFAEPKRKPGE	29B
Consensus	.KE.EEIF...GHVEDVY.M.D..RQSRGCGFVK.SS.E.A.AA...L.G.Y.MRGC.QPLI.RFA.PKR.PGE	
OsFCA	SRGGPAFGGPGFSRSDAALVIRPTANLDEPRGRHMPDSDWHPSSPRSAHQFNNFGSDNPMAPKGSTVTSTTDT	37E
FCA	SREMAPVGLGSGPR-FQASGPRPTSNFGDSSGDVSHTNWRPATS RNVPSPSN---TG-IRGAGSDFPPKPGQ	367
Consensus	SR.....G.G..PR...A...RPT.N.....G.....W.P..R.....N.....GS.....	
OsFCA	ATFRPQMFGSGNGLSSQTAVPSSSHMGMNPPMAQGHHLGGQIIPPLQKLPGLPQNFVQLQNNQLGQLQGPQA	45C
FCA	ATLPSNQGGLGGYGVPLNPLVPVGVSSSATLQQQNRAGQHITPLKKPLHSPQGLPLPLRPQTNPFGAQAPLQ	442
Consensus	AT.....G.....P.....Q.....GQ.I.PL.K....PQ..P..L.....Q.P.Q	
OsFCA	QIGQLQVPQSMGPGSFGQNRSLGQLFVSQPLMQNAS-VSAVQVPSAVNSMQAIPGQQLHPSNVAPQMLQQPVQ	524
FCA	NP-----YAYSSQLPTSQPLPQQNISRATAPQTPLNINLRPTTVSSATVQFPFRSQQQLQKMQ	501
Consensus	S..QLP.SQ...QQN.S...A.Q.P.....Q...Q..Q	
OsFCA	QMPSQAPQLLLQQQAALQSSYQSSQAIYQLQQQLQLMQQQQSNLNHQPTQGPVQSSNPGAPNAIIPSNINT	595
FCA	HPPSELAQLLSQQTQSLQATFQSSQQAISQLQQQVQSMQPNQNLPLSQNGRAGKQQWAGSAIPRVASTTGSTPV	576
Consensus	..PS...QLL.QQ...LQ...QSSQQA.I..QLQQQ.Q.MQ...Q....Q....G.....A.....	
OsFCA	IPQQATSPAVP-----LTCNWTHTSPGFKYYNSITRESKWDKPEEYVLYEQQQQQQQQK-----	657
FCA	SYVQTAAPAVSQSVGSKVTWTEHTSPDGFKYYNGLTGESKWEKPEEMIVFEREQKQQHQEKPTIQSQSTQL	651
Consensus	...Q...PAV.....C.WTEHTSP.GFKYYN..T.ESKW.KPEE...E..QQ.QQQ.....	
OsFCA	---LLLLQHQQLAMQQQLQSPQAQTHP-----AMQPVQQIPQAQQGQQQMOMKQQLNLTQLQTPGAI	715
FCA	QPLQQQPQVQQYQGGQLQPPYSSLYPTPGASHNTQYPSLPVGNQSPFMSGIGQNAQDYARTHIPVGAASMN	726
Consensus	QQ.QQ...QQLQ.P.....P.....PV.Q..Q.....	
OsFCA	DPSRIQQGIQSAQERAWKS--	738
FCA	DISRTPOSRQSPQELMWKKA	747
Consensus	D.SR..Q..QS.QE..WK...	

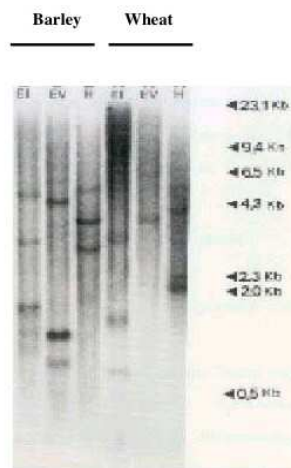
도면2b



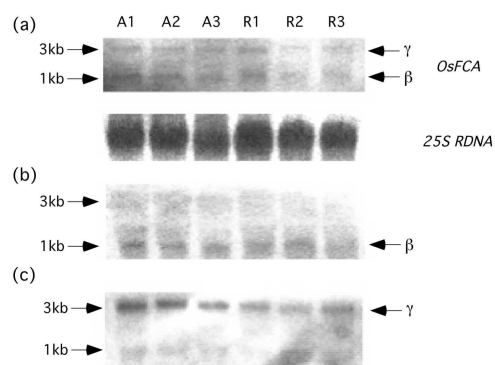
도면3a



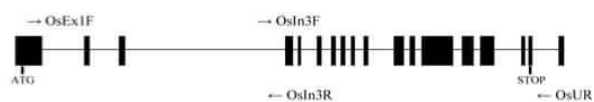
도면3b



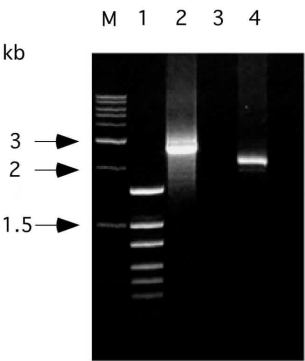
도면4a



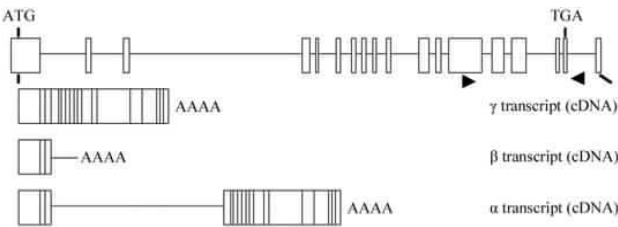
도면4b



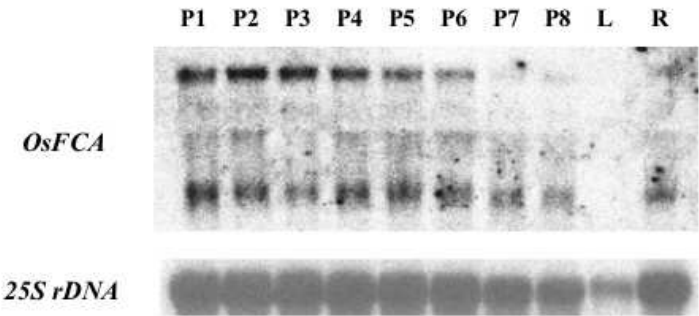
도면4c



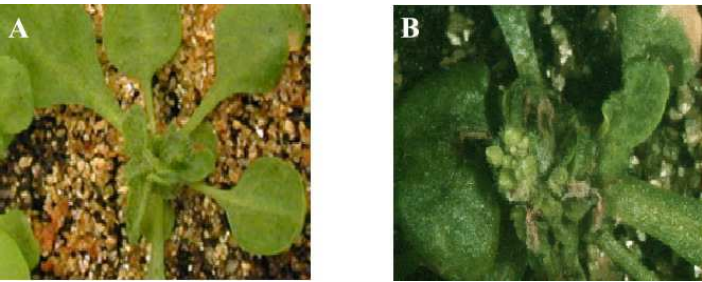
도면4d



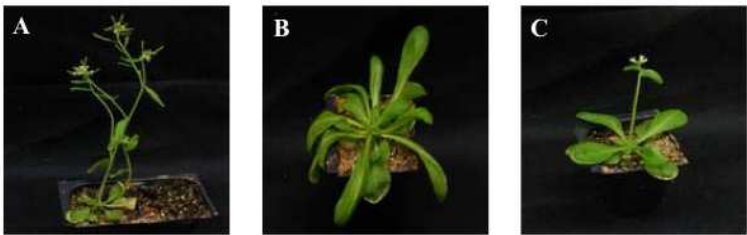
도면5



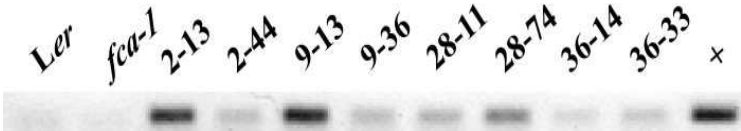
도면6



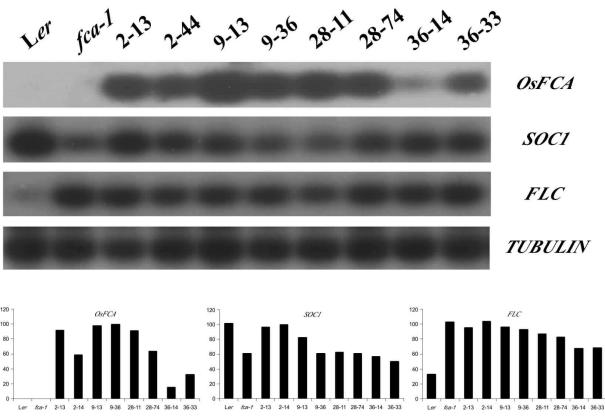
도면7



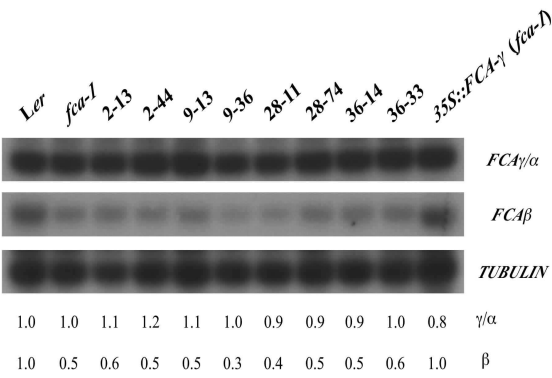
도면8



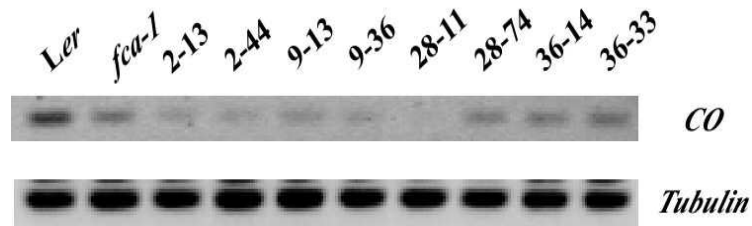
도면9a



도면9b



도면10



서열목록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
 <120> Gene controlling flowering time of plants and method for manipulating flowering time of plant using the same
 <130> P11-051108-01
 <160> 20
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 2527
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<400> 1
 ggcacgagct cgtgctctcg caaaacccta gccacactcc cctccaccc acatgcaccg 60
 cggcggcgac cgctccaccg acccctcttc cgcccccgcg cccggttctc gcggcgggcg 120
 ggacggccga ttcggccgcg gcccttctcg ctggtcgtcc ggcggtggcg gcggcggtag 180
 cggcagccca cccacccgct tctcccgtag tgggggtggg ggcggcggcg acggtggcg 240
 aggcggaggt ggagggcgga ggttccaccc gtaccgtggc cgtcggacc actccggcg 300
 cggaggctac agaagcggcg gcggcggcga gtacggggag ccgggtagcg ggccgagaca 360
 ccgctacggc agtggccgtg gtgaccactc agatcatgat aacagaaaca actatgttaa 420
 actttttatt gggtcagttc caaggacagc gactgaggat gatgtacgtc ctttatttga 480
 ggagcatgga gatgttggtg aagttgcttt gatcaaggat aggaagactg gtgaacagca 540
 aggttggtgt tttgttaa atgtacttct tgaagaggct gagcgagcca tcagagctct 600
 tcacaaccag tacactttac ctggggcaat gggccctatt caagtcagat atgctgatgg 660
 tgaaagggaa cgccatgggg ctattgagca caagctgttt gtcgcatcac tcaataagca 720

agctactgcg aaggagattg aagagatddd tgccgccgtat ggtcatgtgg aagatgtcta	780
cattatgaaa gatggcatga ggcagagccg aggttgtggc tttgtcaaat tctcatcacg	840
agaaccggcg ctggcagcca tgagtgtctt gagtgggaat tatgtaatga ggggggtgca	900
gcaaccatta ataattcggg tcgctgatcc taagagacct agacctggag aatcaagggg	960
tggtcctgca tttggagggtc ctggtttcag tccacgatct gatgcagctc ttgttatcag	1020
gccgaccgcc aaccttgatg aaccaagggg tcggcatatg cctcctgact cttggcatcc	1080
atcaagccca aggtcagcac ctcatcagtt taataacttt ggatctgaca atcctatggc	1140
tccgaaaggg agtactgtta catcaacaac agatacggcc acttttcgac ctcagatgtt	1200
cagcggaaat ggctctttgt caagccaaac agctgtgcc aagttcgtcac atatgggcat	1260
gaaccctcct cccatggcac aaggccatca tctgggaggc cagcagatcc cacctttgca	1320
aaagctacca gggttgcctc agaatttccc tgttcaattg cagaataatc agctgggaca	1380
acccttgcat ggtcctgtct aacagattgg tcagcttcaa gttccacaat ctatgggtcc	1440
tggttctttt ggccagaata ggttatctgg tcagcttcct gtgtcacagc cgttgatgca	1500
acaaaatgct tccgtcagcg ctgtgcaggt gccttcagcc gtgtccaatt ccatgcaagc	1560
tattcccggg caacagcatc ttccctcaaa tgttgcacca caaatgcttc agcagccagt	1620
gcagcagatg ccatcgcaag caccacaatt gctactcaa cagcaagctg ctttgcaatc	1680
cagttatcaa tcttcacagc aggcaattta tcagcttcaa caacagctgc aactaatgca	1740
gcagcagcag caatcgaatc taaaccatca acaaccaca cagggtcagc cagtgcattc	1800
tagtaaccct ggtgccccaa atgccattat tccatcaaac attaatataa ttccccagca	1860
ggctacttca cctgcagttc ctttaacctg caattggact gaacatacgt ctctgaagg	1920
ttttaaatat tactacaata gcataactcg agagagtaag tgggataagc ctgaagagta	1980
tgtgctgtat gagcaacagc aacagcagca gcaacagcag aaactacttt tgcttcaaca	2040
gcaccaacaa aaacttgcca tgcagcaact tcagtcacca cctcaggctc agacacatcc	2100
agcaatgcaa cctgtccaac aaattcctca ggcacaacaa ggacagcaac aatgcagat	2160
gaaacagcag gaattgaatt atactcagct acagactcct ggtgctattg atcccagtag	2220
gatacaacag ggcattccat ctgcacaaga acgtgcttgg aaaagttgag actgaagggtg	2280

aatgataaat tggtaagctg ttactcggaa atggctccac tcaacctgct gcctccatca 2340
aatgccttga cggtgcctga tgcctgagtg gtgccaagcg gccatgccga tcgttgtaac 2400
tctggatata gcttagattg atgtctaaaa agttgtagct ccaatccgtg taaaatgttt 2460
gcagtctagg ccttgtaccg ctgtaacatt tctgctgatt agaatgttcg ctttccttgc 2520
ataaaaaa 2527

<210> 2
<211> 738
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 2
Met His Arg Gly Gly Asp Arg Ser Thr Asp Pro Ser Ser Gly Pro Ala
1 5 10 15
Pro Gly Ser Arg Gly Gly Gly Asp Gly Arg Phe Gly Arg Gly Pro Ser
20 25 30
Arg Trp Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Pro Pro His
35 40 45
Arg Phe Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Gly Gly Gly Gly Gly Arg Phe His Pro Tyr Arg Gly Pro Ser Asp His
65 70 75 80
Ser Gly Gly Gly Gly Tyr Arg Ser Gly Gly Gly Gly Glu Tyr Gly Glu
85 90 95
Pro Gly Ser Gly Pro Arg His Arg Tyr Gly Ser Gly Arg Gly Asp His
100 105 110
Ser Asp His Asp Asn Arg Asn Asn Tyr Val Lys Leu Phe Ile Gly Ser
115 120 125
Val Pro Arg Thr Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg Pro Leu Phe Glu Glu
130 135 140
His Gly Asp Val Val Glu Val Ala Leu Ile Lys Asp Arg Lys Thr Gly
145 150 155 160
Glu Gln Gln Gly Cys Cys Phe Val Lys Tyr Ala Thr Ser Glu Glu Ala
165 170 175
Glu Arg Ala Ile Arg Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr Leu Pro Gly Ala
180 185 190

Met Gly Pro Ile Gln Val Arg Tyr Ala Asp Gly Glu Arg Glu Arg His
195 200 205

Gly Ala Ile Glu His Lys Leu Phe Val Ala Ser Leu Asn Lys Gln Ala
210 215 220

Thr Ala Lys Glu Ile Glu Glu Ile Phe Ala Pro Tyr Gly His Val Glu
225 230 235 240

Asp Val Tyr Ile Met Lys Asp Gly Met Arg Gln Ser Arg Gly Cys Gly
245 250 255

Phe Val Lys Phe Ser Ser Arg Glu Pro Ala Leu Ala Ala Met Ser Ala
260 265 270

Leu Ser Gly Asn Tyr Val Met Arg Gly Cys Glu Gln Pro Leu Ile Ile
275 280 285

Arg Phe Ala Asp Pro Lys Arg Pro Arg Pro Gly Glu Ser Arg Gly Gly
290 295 300

Pro Ala Phe Gly Gly Pro Gly Phe Ser Pro Arg Ser Asp Ala Ala Leu
305 310 315 320

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

Pro Pro Asp Ser Trp His Pro Ser Ser Pro Arg Ser Ala Pro His Gln
340 345 350

Phe Asn Asn Phe Gly Ser Asp Asn Pro Met Ala Pro Lys Gly Ser Thr
355 360 365

Val Thr Ser Thr Thr Asp Thr Ala Thr Phe Arg Pro Gln Met Phe Ser
370 375 380

Gly Asn Gly Ser Leu Ser Ser Gln Thr Ala Val Pro Ser Ser Ser His
385 390 395 400

Met Gly Met Asn Pro Pro Pro Met Ala Gln Gly His His Leu Gly Gly
405 410 415

Gln Gln Ile Pro Pro Leu Gln Lys Leu Pro Gly Leu Pro Gln Asn Phe
420 425 430

Pro Val Gln Leu Gln Asn Asn Gln Leu Gly Gln Pro Leu Gln Gly Pro
435 440 445

Ala Gln Gln Ile Gly Gln Leu Gln Val Pro Gln Ser Met Gly Pro Gly
450 455 460

Ser Phe Gly Gln Asn Arg Leu Ser Gly Gln Leu Pro Val Ser Gln Pro

465		470		475		480
Leu Met Gln Gln Asn Ala Ser Val Ser Ala Val Gln Val Pro Ser Ala						
	485		490		495	
Val Ser Asn Ser Met Gln Ala Ile Pro Gly Gln Gln His Leu Pro Ser						
	500		505		510	
Asn Val Ala Pro Gln Met Leu Gln Gln Pro Val Gln Gln Met Pro Ser						
	515		520		525	
Gln Ala Pro Gln Leu Leu Leu Gln Gln Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ser						
	530		535		540	
Tyr Gln Ser Ser Gln Gln Ala Ile Tyr Gln Leu Gln Gln Gln Leu Gln						
545		550		555		560
Leu Met Gln Gln Gln Gln Gln Ser Asn Leu Asn His Gln Gln Pro Thr						
	565		570		575	
Gln Gly Gln Pro Val Gln Ser Ser Asn Pro Gly Ala Pro Asn Ala Ile						
	580		585		590	
Ile Pro Ser Asn Ile Asn Thr Ile Pro Gln Gln Ala Thr Ser Pro Ala						
	595		600		605	
Val Pro Leu Thr Cys Asn Trp Thr Glu His Thr Ser Pro Glu Gly Phe						
	610		615		620	
Lys Tyr Tyr Tyr Asn Ser Ile Thr Arg Glu Ser Lys Trp Asp Lys Pro						
625		630		635		640
Glu Glu Tyr Val Leu Tyr Glu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln						
	645		650		655	
Lys Leu Leu Leu Leu Gln Gln His Gln Gln Lys Leu Ala Met Gln Gln						
	660		665		670	
Leu Gln Ser Pro Pro Gln Ala Gln Thr His Pro Ala Met Gln Pro Val						
	675		680		685	
Gln Gln Ile Pro Gln Ala Gln Gln Gly Gln Gln Gln Met Gln Met Lys						
	690		695		700	
Gln Gln Glu Leu Asn Tyr Thr Gln Leu Gln Thr Pro Gly Ala Ile Asp						
705		710		715		720
Pro Ser Arg Ile Gln Gln Gly Ile Gln Ser Ala Gln Glu Arg Ala Trp						
	725		730		735	
Lys Ser						

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 3
 ggaggttcca cccgtacc 18

<210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 4
 cggcggaggc tacagaag 18

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 5
 tcgtgaaatt cgactccaca 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 6
 catgaatgtt gctggcagtt 20

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 7
 ttccgagtaa cagcttacca attt 24

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 8
 atagggtatc tggtcagctt cctg 24

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 9
 tgaggagcat ggagatgttg 20

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 10
 ggttgtgaag agctctgatg g 21

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 11
 tcaattgttg gagctcggta 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 12
 tggagaggaa aatagcgatg 20

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 13
 agcaaccaaa caaaattta ccac 24

<210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 14
 cgggtatatg tgtccgagca taat 24

<210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 15
 gtagcccaca agtcacctct tctcca 26

<210> 16
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 16
 gagatttggt ccagcaggtg acatct 26

<210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 17
 ggatcgagtc agcaccaaac c 21

<210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 18
 cccaatgaac aattgctgt c 21

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 19
 ctcaagaggt tctcagcagt a 21

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 20
 tcaccttctt catccgcagt t 21