



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0049127

(43) 공개일자

2014년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0113573

(22) 출원일자

2012년10월12일

심사청구일자

없음

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

정기홍

경기 수원시 영통구 봉영로1517번길 73, 923동 1504호 (영통동, 벽적골9단지아파트)

문선옥

경기도 용인시 기흥구 영덕동 기흥데시아파트 204동 801호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **있, 줄기 또는 이들 모두에 특이적 프로모터, 이를 포함하는 발현 벡터, 이에 의한 형질 전환 식물체 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 **있, 줄기 또는 이들 모두에 특이적으로 발현하는 프로모터**, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 프로모터는 **벼의 있, 줄기 또는 이들 모두의 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 특이적으로 조절함**으로써, 벼를 포함하는 주요 곡물의 **있이나 줄기에 대한 병 저항성이나 환경 스트레스 내성 증진**을 위한 연구 및 광합성 효율 증진을 통한 바이오매스 연구 등에 사용될 수 있다.

대표도 - 도8

R B	LOC_Os06g49160 의 프로모터	GUS	Tnos	P35S	HPH	T7te L B
--------	--------------------------	-----	------	------	-----	----------------

(72) 발명자

고현정

경기 용인시 처인구 동부로 719-12, (해곡동)

유요한

전북 익산시 동서로61길 34, 205동 1006호 (어양동, 부영2차아파트)

안진홍

경기도 용인시 기흥구 공세동 133-8번지 대주피오레아파트 210동 1703호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009110

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 융합오믹스 연구 기반 구축을 통한 수량성 증진 유용 유전자 대량 발굴 및 기작 규명

기 여 율 1/1

주관기관 국립식량과학원

연구기간 2011.05.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 잎, 줄기 또는 이들 모두에 특이적으로 발현되는 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 3

제2항의 벡터에 의해 형질 전환된 형질전환세포.

청구항 4

제2항에 따른 벡터 또는 제3항에 따른 형질전환세포로 형질 전환된 형질전환 단자엽 식물체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 형질전환 단자엽 식물체는 벼(Oryza sativa)인 형질전환 단자엽 식물체.

청구항 6

제2항의 벡터로 단자엽 식물을 형질 전환시켜 상기 외래 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 단자엽 식물의 형질 전환 방법.

청구항 7

하기의 단계들을 포함하는 벼의 잎, 줄기 또는 이들 모두에 특이적으로 발현되는 벼 형질전환체의 제조방법:

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;

벼에 상기 벡터를 도입하는 단계; 및

상기 벡터가 도입되어 벼의 잎, 줄기 또는 이들 모두에 특이적으로 유전자가 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 잎, 줄기 또는 이들 모두에 특이적으로 발현하는 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 벼(Oryza sativa)는 세계에서 가장 중요한 식량작물의 하나로 과거 20여년 동안 꾸준히 수량 증대에 힘써왔으나 현재 인구증가 추세로 볼 때 2020년이면 현재의 70%이상에 달하는 수량을 더 생산해야만 될 형편에 놓여있다. 그러나 벼가 재배되는 농지는 세계 각국의 공업화현상으로 갈수록 줄어들고 육종의 소재가 되는 새로운 유전자원은 고갈되어 외래 유용유전자의 도입이 요구되고 있다. 다행히 분자생물학의 발달로 외래 유용유전자의 분리 및 조작이 가능하게 되어 유용 유전자를 벼를 비롯한 많은 식물세포에 형질전환하여 새로운 유전자가 조합된 형질전환체를 얻음으로서 여러 가지 생명현상을 규명하는 유전자발현 연구는 물론 육종의 좋은 소재가 되고 있다. 이러한 형질전환을 이용한 신품종 생산은 앞으로 다가오는 21세기에는 고부가가치 산업으로 대두함은 물론이며 인류의 가장 큰 문제점으로 부각되는 식량문제를 어느 정도는 해결할 수 있으리라 생각된다.

[0003] 현재까지 알려진 형질전환 방법은 80년대에는 원형질체에 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol(PEG))과 전기충격법(electroporation)으로 많은 형질전환체를 획득하였으며, 90년대 후반에는 유전자총 이용법이 보편화되었

으며 최근에는 쌍자엽식물에서 널리 이용되어 왔던 아그로박테리움(Agrobacterium) 이용법도 많이 이용되고있다. 그밖에 화분법(pollen pathway), 미세주사(microinjection) 방법 등이 있다.

[0004] 프로모터는 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신 또는 특별한 조직에만 국한시켜 형질전환 목적을 달성할 수 있으며, 그 기능에 따라서 다음과 같이 분류할 수 있다.

[0005] 첫째로 전신발현 유도 프로모터를 들 수 있다. 식물 전신발현 유도 프로모터로는 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 쌍떡잎식물용 프로모터로 사용되고 있다. 벼 등의 외떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자 프로모터들이 주로 이용되어 왔으며, 최근 벼 시토크롬 C유전자(Os0c1)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다(참조: 등록번호 10-0429335). 이들은 식물형질전환 기본 운반체 내에 선발마커로 이용되는 항생제나 제초제 저항성 유전자 및 리포터 유전자의 발현을 유도하기 위해 이미 내재되어 있으며, 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체내 기능을 밝히고자 시도할 때 우선적으로 고려되는 프로모터들이다. 이러한 프로모터들은 조직-선택성 또는 기관-선택성이 결여되어 있기 때문에 형질전환시킨 선발마커 등이 전체 식물에서 발현됨으로써, 식물체 생장을 지연시키는 결과를 초래한다. 또한 프로모터의 특성상 도입한 유전자의 발현을 목적하는 기관에 국한되어 충분히 발현시키지 못하므로 형질전환체의 경제성이 떨어지게 된다.

[0006] 둘째로, 종자 특이적 프로모터를 들 수 있다. 대표적인 예로서 벼 주요 저장 단백질 유전자의 프로모터들로서 황금쌀(golden rice) 개발에 사용된 벼 글루테린(glutelin) 프로모터가 현재까지 외떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는 경우에 많이 사용되고 있고, 쌍떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는데 주로 사용되는 프로모터로는 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 및 애기장대의 종자에서 감마 토코페롤 메틸기 전이효소(γ -tocopherol methyl transferase: γ -TMT) 유전자 발현을 유도함으로써 비타민 E 생성을 증진시킨 연구에 사용된 당근 유래 DC-3 프로모터, 들깨 유래 올레오신(oleosin) 프로모터의 종자 특이발현 유도 특허출원(참조: 특허출원번호 10-2006-0000783) 사례가 있다. 상기 종자 특이적 프로모터들은 주로 종자 자체가 식량이나 식품 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 작물에서 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 주로 사용되고 있다.

[0007] 셋째로 뿌리 특이 발현 프로모터이다. 아직 상용화된 사례는 없으나 애기장대 퍼옥시다제(peroxidase, prxEa)가 분리되어 뿌리 특이적 발현을 확인하였고, 최근 고구마 유래의 매즈 유전자(ibMADS)와 당 유도성 에이디피 글루코즈 파이로포스파타제(ADP-glucose pyrophosphatase, AGPase) 유전자가 분리되어 해당 프로모터가 뿌리에서 특이 발현을 유도하며 당근, 무에서 뿌리 특이적 일시적 발현을 유도함을 확인하여 특허 등록(대한민국 등록번호 제10-0604186호, 제10-0604191호)된 바 있다.

[0008] 넷째로, 잎 등의 기타 조직 특이 프로모터를 들 수 있다. 잎 등의 광합성 조직에서만 강력한 유전자의 발현을 유도하는 벼와 옥수수 유래의 알비씨에스(rbcS: ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 프로모터, 아그로박테리움 유래의 식물 뿌리 발현을 유도하는 RoID 프로모터, 감자 유래 괴경 특이 발현 유도 파타틴(patatin) 프로모터, 토마토 유래의 과실 성숙 특이 발현 유도 피디에스(PDS: phytoene synthase) 프로모터 등이 있다.

[0009] 그 외에도 현재 개발이 계속 진행 중이지만, 개발자의 의도에 따라 보다 정밀하게 유전자 발현의 장소를 조절할 수 있는 새로운 프로모터, 예컨대 특정한 기관(꽃잎, 뿌리, 잎, 줄기 등)에서만 발현되어야 하는 유전자(예, 화색, 응성 불임, 화형, 특정 대사관련 물질, 방어물질 등)를 형질 전환시킬 경우, 특정 기관이나 시기에만 작동하는 프로모터들이 앞으로도 계속 개발될 필요성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 10-2009-0029296

(특허문헌 0002) KR 10-2008-0007421

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신이 아닌 잎과 줄기에만 국한하여 발현시킬 수 있는 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 식물의 조직 또는 기관 특이적인 유전자 발현을 조절할 수 있는 프로모터들을 발굴함으로써, 식물의 특정 조직 또는 기관에 국한시켜 목적 유전자를 특이적으로 발현 또는 저해할 수 있는 시스템을 확립하고자 하였다. 이 과정에서 벼의 LOC_Os06g49160의 프로모터가 꽃잎, 자방, 뿌리, 수술, 암술, 종자 등에서는 발현되지 않고 잎 또는 줄기에서 특이적으로 발현을 유도함을 확인하고, 이에 따라 상기 프로모터를 확보하여 이를 포함하는 발현벡터를 제조한 후 이를 식물에 도입하여 형질전환시킨 형질전환체에서 잎, 줄기 또는 이들 모두에 특이적으로 리포터 유전자가 발현됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 보다 상세하게 본 발명자들은 공개된 벼 에피메트릭스(affymetrix) 자료 983종을 수집하였고, 이들을 17개 기관별로 재분류를 하였다. 에피메트릭스 어레이(affymetrix array)는 한 번의 실험으로 57000 종의 프로브에 의해서 대변되는 유전자 발현을 분석 가능케 하며, 대규모로 수집된 에피메트릭스 어레이(affymetrix array) 자료의 재구성을 통해서 만들어진 기관별 발현 양상은 상당히 높은 재현성을 보여 주었다. 이 자료의 발현 패턴별 분석을 통해서 다양한 기관 및 조직 특이적 유전자들이 분리되었다. 그 중에서 본 발명자들은 잎이나 줄기에서 중요한 형질 발현에 필요한 프로모터 발굴에 관심을 가졌다.

[0014] 상기 방법을 통해서, 547 종의 유전자가 다른 유전자들과 대비하여 잎과 줄기에서 높은 발현 양상을 보여 주었다.

[0015] 이러한 유전자에 의해서 조절되는 유전자 발현양상은 이들 프로모터 3' 방향에서 GUS reporter 유전자를 발현시켜 그 활성을 식물체 내에서 측정함으로써 정밀하게 분석되었다. 프로모터 활성 검증을 위한 벡터의 벼 형질전환은 많은 시간이 소요되는 어려움이 있기 때문에, 본 발명자들은 기존에 이용되는 방법과 다른 방법으로 최근에 활발하게 시도되고 있는 융합 옴믹스 분석 기법을 활용하였다.

[0016] 프로모터 탐색용 벡터인 pGA2707, pGA2715, pGA2717, pGA2772의 T-DNA 오른쪽 말단에는 프로모터가 없는 GUS 유전자가 이웃해 있기 때문에, T-DNA가 정방향으로 프로모터 3' 방향에 삽입이 되면 GUS 발현을 통해서 프로모터 활성을 측정할 수 있다. 또한, 이러한 프로모터 trap 계통은 대규모 T-DNA 삽입 위치를 게놈 DNA PCR과 염기서열 분석을 통해 확인할 수 있기 때문에, 데이터베이스에서 유전자 locus id를 색인하여 관련 계통의 탐색이 가능하다.

[0017] 분리된 547개 잎과 줄기 특이적 유전자는 관련 프로모터 탐색 계통을 통해 250 종 유전자에 대한 280여개의 계통으로 선별되었다. 이들 계통의 종자를 살균 후 영양배지에서 7일 동안 벼 유묘 전체를 GUS 분석에 사용하였다.

[0018] 그 결과, 실험군 2D-10589는 기존의 유전자와 상동성이 없는 LOC_Os06g49160의 세 번째 인트론에 T-DNA가 삽입되었으며, GUS 발현 분석과 게놈 DNA PCR를 통해 이 계통에서 GUS 발현이 이 유전자의 프로모터 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0019] 염기서열 해독 정보를 참고로 하여 LOC_Os06g49160의 ATG 앞 2kb까지의 프로모터를 게놈 DNA PCR를 통해서 분리하고 pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다.

[0020] 이렇게 분리된 프로모터를 활용한 식물의 잎과 줄기 특이적 유전자 발현 양상 조절에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

[0021] 본 발명은 벼의 LOC_Os06g49160의 프로모터로서, 외래 유전자의 발현이 잎, 줄기 또는 이들 모두에 특이적으로 이루어지도록 유도하는 잎, 줄기 또는 이들 모두에 특이적인 프로모터(이하 '본 발명의 프로모터'라 함)를 제공한다.

[0022] LOC_Os06g49160의 게놈 DNA 크기는 1580 bp이며 coding sequence의 크기는 720 bp로 239개의 아미노산으로 번역되어 thylakoid lumenal 16.5 kDa protein을 만들 것으로 예상된다. 또한 미시건 주립대학이 주관하는 벼 유전자 기능 할당 과제를 통해서 제공되는 Gene Ontology분석을 통해서 추정된 세포내 소기관에서의 위치 정보는 thylakoid이며, 현재 thylakoid lumenal 16.5 kDa protein에 대한 구체적인 기능은 알려져 있지 않으나 광합성과 연관된 기능을 할 것으로 추정된다.

[0023] LOC_Os06g49160의 단백질 서열과 비교해서 애기장대의 ortholog인 AT4G02530는 71%, Sorghum에서의 ortholog인

Sb10g029300는 82 %의 상동성을 보였다.

- [0024] 즉, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열인 벼의 LOC_Os06g49160의 프로모터를 포함하는, 외래 유전자의 일, 줄기 또는 이들 모두에 대한 특이적 발현을 위한 프로모터를 제공한다.
- [0025] 프로모터는 유전자의 환경적, 시기적 및 조직적 발현을 조절하는 필수적인 요소로서, 본 발명에 따른 일, 줄기 또는 이들 모두에 특이적인 프로모터를 사용하여 식물체 내에서 외래 유용 유전자의 발현을 일, 줄기 또는 이들 모두에 특이적으로 유도할 수 있다.
- [0026] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열인 벼의 LOC_Os06g49160의 프로모터를 포함하는 일 및 줄기에 특이적으로 발현되는 프로모터를 제공한다.
- [0027] 또한 본 발명은 상기 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는, 일, 줄기 또는 이들 모두에 특이적인 발현용 벡터를 제공한다.
- [0028] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며, DNA를 복제하고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘 다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서 발현 벡터는 재조합 DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입 시 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제가능 한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 계통 내에 통합되는 것들을 포함한다.
- [0029] 상기 통상의 벡터는 본 발명의 프로모터를 도입할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하나, 바람직하게는 pCambia계열 또는 pGA계열의 벡터, 예컨대, pGA3383, pCambia1381, pCambia1391, pGWB3와 같이 Ti-plasmid에서 파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 보다 바람직하게는 pGA3383가 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 발현 벡터는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편을 포함한다.
- [0031] "본 발명의 프로모터"와 "기능적으로 동등한 절편"은 본 발명의 프로모터와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분을 의미한다. 이러한 핵산 절편은 서열번호 1에 기재된 염기서열과 비교하여 99% 이상의 서열 상동성을 가지며, 이러한 핵산 절편은 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 발현 벡터는 3' 방향에 목적 단백질에 대한 유전자가 발현되도록 한다.
- [0033] 바람직하게는 상기 발현벡터는 일 및 줄기에 특이적으로 발현시키고자 하는 유용한 외래 유전자를 포함할 수 있다.
- [0034] 상기 외래 유전자는 일 및 줄기의 색깔, 발달, 광합성 등과 같은 일 및 줄기의 특성과 관련된 것이면 무엇이든 무방하며, 바람직하게는 발달과 관련된 유전자로서 예컨대 애기장대 CONSTANS-LIKE, KNOX, Tic21, Toc33, Tic40 Toc75, CIA2, GLK, Stroma 70-kD Heat Shock Protein, Glutamine Phosphoribosyl Pyrophosphate Amidotransferase, Chloroplastic Adenylate Kinase, Differential development Of Vascular associated cells 1, Phosphoenolpyruvate-Phosphate Translocator, Carbamoyl Phosphate Synthase subunit, 광합성과 관련된 유전자로서 예컨대 PEP carboxylase, Magnesium Chelatase H subunit, Magnesium Chelatase I subunit, Magnesium Chelatase D subunit, Chlide a monooxygenase, glutamyl-tRNA reductase, NADPH:Pchlide oxidoreductase, glutamic acid l-semialdehyde aminotransferase, Uro-III decarboxylase, Mg-Proto-IX reductase, Pchlide a reductase, Chlide areductase, Chl a reductase, ProtoGen-IX oxidases, PASA, PSAB 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 이용할 수 있다.
- [0035] 상기 발현벡터는 통상의 벡터에 본 발명의 프로모터를 도입한 것일 수 있으며, 이처럼 본 발명의 프로모터를 도입하여 발현벡터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공지의 방법에 따라 용이하게 실시 가능하다.
- [0036] 또한 본 발명은 상기 벡터에 의해 형질 전환된 형질 전환 세포를 제공한다.
- [0037] 상기한 재조합 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양

된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 임의의 식물 세포가 이용가능하다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 가능하다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 줄기, 잎, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다.

[0039] 또한 본 발명은 상기 벡터 또는 상기 형질전환 세포로 형질 전환된 형질전환 단자엽 식물체를 제공한다.

[0040] 이러한 형질 전환 단자엽 식물체는 도입된 외래 유전자가 잎과 줄기에 특이적으로 발현되는 특성을 나타낸다.

[0041] "본 발명의 형질전환 단자엽 식물체"와 "기능적으로 동등한 형질전환 식물체"는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 변이체와 비교하여 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 이용하여 제조된 형질전환 단자엽 식물체로써, 잎 및 줄기에서의 특이적 프로모터 효과가 실질적으로 동등한 특징을 가지는 형질전환 단자엽 식물체이다.

[0042] 본 발명의 식물체의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키기 위한 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 예를 들어, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen.Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코딩된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.

[0043] 본 발명에서 형질전환되는 단자엽 식물체는 본 실시예에서 사용된 벼(Oryza sativa L.)를 포함한 단자엽식물을 제한 없이 사용할 수 있다.

[0044] 바람직하게는, 단자엽 식물, 더욱 바람직하게는 벼(Oryza sativa L.)가 사용된다.

[0045] 이러한 변이체는 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.

[0046] 또한 본 발명은 상기 벡터로 단자엽 식물을 형질 전환시켜 상기 외래 유전자를 식물체의 잎, 줄기 또는 이들 모두에 특이적으로 발현시키는 단계를 포함하는 단자엽 식물의 형질 전환 방법을 제공한다.

[0047] 바람직하게, 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 벼에 상기 발현벡터를 도입하는 단계; 및 상기 발현벡터가 도입되어 벼의 잎, 줄기 또는 이들 모두에 특이적으로 외래유전자가 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 식물의 형질 전환 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 프로모터는 잎, 줄기 또는 이들 모두에 특이적 발현을 유도하는 프로모터로써, 잎 및 줄기의 형질 개선에 필요한 유전자를 잎, 줄기 또는 이들 모두에서 특이적으로 발현시켜 벼를 포함하는 주요 곡물의 잎이나 줄기에 대한 병 저항성이나 환경 스트레스 내성 증진을 위한 연구 및 광합성 효율 증진을 통한 바이오매스 연구 등에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 히트맵(heatmap)으로 잎과 줄기에서 우선적 발현을 보이는 분리된 유전자와 그 발현 양상을 나타내는 도이다.

도 2는 본 발명의 프로모터 활성 확인을 위한 T-DNA 삽입 위치를 나타내는 도이다.

도 3은 2D-10589 계통이 LOC_0s06g49160 유전자에 co-segregation 것을 나타내는 GUS 염색 결과와 PCR 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 2D-10589 계통의 잎 우선적 발현을 나타내는 도이다.

도 5는 엽육조직(mesophyll) 전반에서의 발현을 나타내는 성숙한 지엽의 단면을 나타내는 도이다.

도 6은 LOC_0s06g49160 유전자의 잎과 줄기에서 우선적 발현을 나타내는 마이크로 어레이 결과를 나타내는 도이다.

도 7은 LOC_0s06g49160 유전자의 ATG앞 2Kb 프로모터를 나타내는 도이다.

도 8은 LOC_0s06g49160 프로모터 GUS 식물체 제조를 위해 사용한 벡터의 다이어그램을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 아래의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0051] <실시예 1> 잎 또는 줄기에 특이적으로 발현되는 벼 유전자 대량 선별

[0052] 잎 또는 줄기에 특이적으로 발현하는 유전자를 선별하기 위하여, 공개된 마이크로어레이 데이터베이스인 NCBI GEO(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)에서 수집된 983종의 벼 에피메트릭스 마이크로어레이(affymetrix microarray) 자료를 17개 기관별/조직별로 재구성하여 유전자 발현 분석용 데이터베이스를 구축하였다.

[0053] 이를 표 1에 나타내었다.

[0054] 표 1. 기관별/조직별로 재구성된 유전자 발현 분석용 데이터베이스

순서	기관/조직	샘플숫자
1	캘러스 /현탁 세포	42
2	잎	129
3	끝잎	121
4	뿌리	150
5	순(shoot)	164
6	줄기	8
7	전체 절간(Whole internode)	9
8	쌈(SAM)	27
9	원주꽃차례(Panicle)	112
10	성장중인 꽃밥(Developing anther)	86
11	성숙된 꽃밥(Mature anther)	37
12	씨방/암술머리	17
13	내화류 외화영(Palea lemma)	4
14	씨앗	32
15	배(Embryo)	3
16	배낭(Embryo sac)	27
17	내배유(Endosperm)	15

[0055]

[0056] K-means clustering 분석 방법을 이용하여, 상기 표 1에 제시된 유전자 발현 분석용 데이터베이스 중 잎 및 줄기에서 발현이 높은 유전자 그룹을 분리하였다.

[0057] 이는 마이크로어레이 자료 분석용 소프트웨어인 MeV의 K-means clustering 분석 방법을 사용하여 수행하였으며, 기관별/조직별 발현 분석용 데이터베이스 중 잎과 줄기에서 발현이 우선적인 547 종의 유전자가 분리되었다.

[0058] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0059] 도 1에 나타낸 바와 같이, 노란색에 가까울수록 우선적 발현을 보이는 유전자에 해당하며 파란색에 가까울수록 우선성이 낮아지게 된다. 즉, 17개의 재구성된 유전자 데이터베이스 중 잎, 끝잎, 순 및 줄기에서 우선적 발현이 높은 547종의 유전자를 확인할 수 있었다.

[0060] <실시예 2> 잎 및 줄기에 우선적인 유전자에 대한 프로모터 trap 계통의 확인

[0061] 프로모터 탐색용 vector인 pGA2707, pGA2715, pGA2717, pGA2772의 T-DNA 오른쪽 말단에 프로모터가 없는 GUS 유전자가 이웃해 있기 때문에, T-DNA가 유전자가 발현되는 방향과 정방향으로 프로모터 후미에 삽입이 되면 GUS 발현을 통해서 프로모터 활성을 알 수 있다.

- [0062] 상기 방법을 통하여, T-DNA가 삽입된 벼 계통에 대한 inverse-PCR 및 염기서열 분석을 하여 대규모로 T-DNA 삽입 위치가 벼 염색체 상에서 결정이 되었으며, 본교(경희대학교)에서 보유하고 있는 대략 벼 계통의 1/2에 해당되는 T-DNA 색인 돌연변이 정보를 통해서 이를 분석하였다.
- [0063] 그 결과, 상기 547종의 잎과 줄기 우선적 유전자로부터 locus id 이름을 가지며 잠재적으로 프로모터가 trap된 계통을 탐색할 수 있었다. 이를 통해서, 250종의 유전자에 대한 280개의 프로모터 trap 계통이 선별되었다.
- [0064] **<실시예 3> GUS 염색법을 통한 잎 및 줄기 우선적 발현 유전자의 기관 특이적 발현 분석**
- [0065] 선별된 유전자의 기관 특이성을 확인하기 위하여, 잎과 줄기에서 우선적으로 발현되는 250개 유전자들에 대한 280여 프로모터 trap 계통들의 종자를 10개씩 28℃에서 7일간 배양한 후 모든 개체를 GUS 염색 처리 하였다.
- [0066] GUS 용액은 0.5M sodium phosphate buffer 200ml, 12.5mM potassium ferricyanide 100ml, 12.5mM potassium ferrocyanide 100ml, 0.5M EDTA 20ml, 10% Triton X-100 50ml, 10ml 의 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 X-gluc 1g과 Methanol 200ml을 넣고 증류수로 1L의 부피를 맞추어 제조되었다. 각 계통의 식물체를 모두 15ml의 GUS 염색액에 24시간 처리 한 후 70% 에탄올과 100% 에탄올을 순차적으로 이용하여 상온에서 탈색하였다.
- [0067] 그 결과, GUS염색을 실시한 280여개 계통 가운데 36계통에서 GUS 발현이 확인되었다. 그 중, T-DNA의 삽입이 정방향으로 이루어진 25계통을 선별하였다.
- [0068] **<실시예 4> 잎 및 줄기 우선적 발현을 보이는 계통들의 GUS 발현과 T-DNA 표지의 co-segregation 검증**
- [0069] 상기 선별된 25 계통의 벼 종자를 MSO 배지에 28℃에서 7일간 배양하였다. 이렇게 배양한 7일 개체들의 잎 100mg을 채취하여 액체질소에 급냉각한 후 분쇄하고 잎의 일부는 GUS 염색에 사용하였다. 분쇄 된 잎에서 CTAB buffer (CTAB 10g, NaCl 40.91g, 0.5M EDTA(pH8.0) 20ml, PVP 10g과 ascorbic acid 0.44g을 넣고 물로 500ml을 맞춰 조제하였다)를 이용하여 DNA를 추출하였다.
- [0070] 선별된 25 계통의 벼 종자에서 DNA를 추출하였으며, 그 중 실험군 2D-10589는 LOC_0s06g49160 유전자의 세 번째 인트론에 GUS reporter 유전자가 결합된 계통으로 T-DNA 삽입 위치 앞뒤에서 만들어진 프라이머(서열번호 2와 3)와 NGUS1 프라이머(서열번호 4)를 이용하여 PCR로 유전형 분석을 하였으며 삽입 위치는 도 2에 나타내었으며 사용된 프라이머는 하기 표 2에 나타내었다.
- [0071] 표 2. 2D-10589의 프라이머
- | 프라이머정보 | 서열(5'-3') |
|-------------------|----------------------|
| 2D-10589-F(서열번호2) | TCCATTGAGTTCTTTTGGGG |
| 2D-10589-R(서열번호3) | CATGCCAGGAAAAAGTAGCC |
| NGUS1(서열번호4) | AACGCTGATCAATTCCACAG |
- [0072]
- [0073] 도 2의 1은 서열번호 5의 뉴클레오티드 148번 내지 541번이며, 2는 서열번호 5의 뉴클레오티드 653번 내지 794번이며, T-DNA는 서열번호 5의 463번 내지 990번이며, 3은 서열번호 5의 뉴클레오티드 906번 내지 979번이며, 4는 서열번호 5의 뉴클레오티드 1122 내지 1232이다. 도2의 1내지 4에 해당하는 이들 각각은 엑손에 해당하는 서열이다.
- [0074] PCR 반응은 95℃에서 5분 후, 95℃에서 30초, 57℃에서 30초, 72℃에서 1분30초를 37회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 5분을 진행하였다. PCR 반응 산물은 4℃에 보관하였으며 이의 일부를 전기영동으로 확인하였다.
- [0075] 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0076] 도 3에 나타난 바와 같이, 실험군 2D-10589의 PCR 결과와 GUS염색 결과가 일치하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0077] 도 3의 A는 2D-10589의 일주일 된 개체 5개에 대한 GUS염색 결과를 나타내며, 도 3의 B는 도 3의 A 실험에 사용된 개체의 유전형 분석 결과이다.
- [0078] 도 3의 B에서 상단의 밴드는 LOC_0s06g49160 의 gene specific primer(서열번호 2와 3)의 PCR 산물이며 하단의 밴드는 서열번호 3과 T-DNA의 RB(right border) 상의 NGUS1(서열번호 4)의 PCR 산물이다. 두 산물의 결과를 비교하면 해당 식물체의 유전형분석이 가능하다.
- [0079] 서열번호 2와 3의 산물만 증폭 된 경우는 야생형(wt)이며 서열번호 2와 3의 산물과 서열번호 3과 4의 산물이 모두 증폭 된 경우는 잡종(he)이다.

- [0080] 야생형에서는 T-DNA 삽입이 없으므로 GUS 발현이 나타나지 않고 잡종에서는 T-DNA상의 GUS 발현이 나타나므로 파랗게 염색된 것을 볼 수 있다.
- [0081] 즉, 2D-10589 계통은 LOC_Os06g49160 유전자에 co-segregation 된 것이 확인되었다.
- [0082] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 2D-10589 계통의 7일 간 개체 염색 결과에서도 뿌리에서 GUS발현은 보이지 않지만, 잎에서 특이적으로 발현 되는 것을 확인 할 수 있었다.
- [0083] 잎에서의 발현 양상을 확인하기 위해 hand section을 통해 성숙한 지엽(flag leaf)의 단면을 살펴보았다.
- [0084] 눈에 전개 된 2D-10589 계통의 성숙한 등숙기 지엽을 1-3cm의 크기로 여러 개 잘라 GUS 염색액에 담가 24시간 염색 후 탈색하였다. 탈색이 완료된 지엽의 염색부분을 양날 면도날을 이용해 손으로 0.5mm 이내로 잘랐으며, 슬라이드 글라스 위에 놓고 커버글라스로 고정한 후 광학현미경에서 20-40배율로 단면을 관찰하였다.
- [0085] 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0086] 도 5에 나타난 바와 같이, 잎 가운데 엽육조직(mesophyll) 전반에서 발현되는 양상을 확인 할 수 있었다.
- [0087] 마지막으로, 마이크로어레이 데이터베이스 분석을 통한 LOC_Os06g49160 유전자의 조직별 발현 양상을 분석하였으며 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0088] 도 6에 나타난 바와 같이, 잎과 줄기에서 노란색을 띄는 것을 확인 할 수 있으며 이는 잎과 줄기에서의 발현이 우선적임을 의미한다.
- [0089] 상기 도 3 내지 도 6의 결과를 토대로 LOC_Os06g49160 유전자의 세 번째 인트론에 GUS reporter 유전자가 결합된 계통인 실험군 2D-10589가 잎과 줄기에서 우선적인 발현을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0090] <실시예 5> 잎과 줄기 우선적 발현을 위한 프로모터의 클로닝

- [0091] LOC_Os06g49160 의 프로모터를 클로닝하기 위하여 작성된 프라이머들과 동진 벼 (*Oryza sativa* L. japonica cultivar-group) 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 실시하였다. 주형 DNA는 100 ng을 사용하였고, 각 프라이머는 5 pmol로 사용하였다. PCR 조건은 95℃, 5분 → (95℃, 30초 → 55℃, 30초 → 68℃, 5분00초), 5회 반복 → (95℃, 30초 → 62℃, 30초 → 68℃, 5분00초), 35회 반복 68℃, 10분으로 실시하였다.
- [0092] 프로모터 클로닝용 프라이머는 아래 표 3에 나타내었다.
- [0093] 표 3. LOC_Os06g49160의 프로모터 클로닝용 프라이머

[0094]

프라이머 정보	서열 (5'-3')	비고
LOC_Os06g49160 pro bamh1 F(서열번호 6)	GGATCCATGCACTGCACACTG ACGAA	벼 염색체 6의 PAC genomic sequence (P0018H04)
LOC_Os06g49160 pro xho1 R(서열번호 7)	CTCGAGAGTTCAGCCTGGTTA GACTG	

- [0095] PCR 산물은 전기영동하여 크기를 확인하고, pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다. 클로닝한 DNA를 BamH1과 Xho1으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단된 pGA3383 벡터(promoter-GUS cloning 용 벡터)와 라이게이션을 14℃에서 12시간 진행하였다. 라이게이션 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 50μl와 혼합하여 1.5ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 15분 방치하였다. 이어서 37℃ 오븐에 1분을 다시 방치한 후 1ml의 LB 액체배지를 추가로 튜브에 넣은 다음 3시간 동안 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체배지에 도말하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1ml의 LB 액체배지에서 세포 배양 후 미니 프랩하였다. 미니 프랩으로 얻은 DNA를 제한효소 BanmH1과 Xho1을 사용하여 절단 후 전기영동에서 아가로스 젤로 분리한 후 밴드를 확인 하였다. 이렇게 해서 얻어진 클로닝 DNA를 다시 염기 서열 분석을 하여 에러가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다. 이렇게 만들어진 LOC_Os06g49160 프로모터 GUS 식물체 제조를 위해 사용한 벡터의 다이어그램을 도 8에 나타내었다. 3730XL DNA analyzer(AB,USA)와 BigDye v3.1(AB,USA)을 이용하여 염기서열 분석을 수행하였고 NGUS1, RB(right border), 그리고 프로모터 내 서열을 이용한 프라이머들을 사용하였으며 이를 표 4에 나타내었다.

표 4. 염기 서열 분석을 위한 프라이머

프라이머 정보	서열 (5'-3')
NGUS1(서열번호 4)	AACGCTGATCAATTCCACAG
RB_backbone-F2(서열번호 8)	TCGCACGGAATGCCAAGCA
Os06g49160_seq_1(서열번호 9)	GTCTAGAGATGGAGAAGTTCGATGTTTCG
Os06g49160_seq_2(서열번호 10)	CTCGAGGTAGAAATGTTTGAGCAGCA

상기 분석 결과를 도 7 및 서열목록 1에 나타내었으며, LOC_Os06g49160 유전자의 ATG 앞에 2Kb 프로모터 서열에 해당하는 프로모터가 잎과 줄기에 우선적으로 발현하는 프로모터에 해당한다.

LOC_Os06g49160 유전자의 앞에서 우선적 발현을 나타내는 RNA-seq 발현분석 결과를 표 5에 나타내었다.

표5. LOC_Os06g49160의 앞에서 우선적 발현을 보이는 RNA-seq 발현 분석 결과

RNA-Seq FPKM Expression Values			
Library Name	Library Description	Rice Genotype	FPKM
OSN_AA	Leaves-20 days	Nipponbare	176.442
OSN_AB	Post-emergence inflorescence	Nipponbare	60.681
OSN_AC	Pre-emergence inflorescence	Nipponbare	15.0372
OSN_AD	Anther	Nipponbare	1.37705
OSN_AE	Pistil	Nipponbare	27.3179
OSN_AF	Seed-5 DAP	Nipponbare	21.9586
OSN_AG	Embryo- 25 DAP	Nipponbare	3.11404
OSN_AH	Endosperm- 25 DAP	Nipponbare	0
OSN_AK	Seed- 10 DAP	Nipponbare	0.733172
OSN_BH	Endosperm- 25 DAP (replicate)	Nipponbare	0
OSN_CA	Leaves- 20 days (replicate)	Nipponbare	128.981
SRX042529	Shoots	Nipponbare	61.4522
SRX016113	Seedling four-leaf stage	F1 93-11/Nipp	130.626
SRX016112	Seedling four-leaf stage	F1 Nipp/93-11	131.639
SRX016111	Seedling four-leaf stage	93-11	101.525
SRX016110	Seedling four-leaf stage	Nipponbare	96.5066

상기 자료는 미시건 주립대학, Rice Genome Annotation Project 팀에서 제공하는 유전자 발현 분석 서비스 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/expression.shtml>)를 이용한 것으로 발현분석에 사용된 자료는 차세대염기서열 분석 기술에 기반을 둔 RNA 염기서열 (RNA-seq) 분석 결과이다. 표5에 나열된 library 별로 확인된 RNA-seq의 빈도로 조사한 유전자의 발현 정도를 나타낸다. RNA-seq 분석 결과에 의한 이 유전자는 20일 된 잎이나 4엽 단계(four leaf stage)의 유묘 (seedling)에서 가장 높은 수준의 발현을 보였다. 다른 기관과의 발현 비교에서도 잎 조직에서 발현이 높게 확인되었다. 이는 마이크로어레이에서 확인한 발현양상을 다시 확인시켜 준다.

<실시예 6> 형질전환 세포의 제작

상기 실시예 5에서 제작한 식물 발현용 벡터를 추출하였다.

아그로박테리움 컴피턴트 셀(Agrobacterium tumefaciens LB4404) 50 μ l와 2 μ g의 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 액체질소에 75초 넣은 후, 37도 오븐에 5분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 넣은 다음 3시간 동안 28도 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프랩 한 후, XbaI과 XhoI을 사용하여 효소 절단 후 사이즈를 확인 하였다.

상기 생성된 형질전환 된 아그로박테리움을 이용하여 벼의 형질 전환 실험에서 사용하였다.

<실시예 7> 형질전환 식물체의 제작

N6D 고체 배지에서 동진벼 종자를 7일 정도 28℃ 생장실에서 키워서 벼의 캘러스를 생성하였다. 생성된 캘러스를 상기 실시예 6에서 얻은 식물발현용벡터로 형질 전환된 아그로박테리움을 72시간 키운 세포와 혼합하여 N6D-Acetosyringone 을 포함한 배지에서 22℃ 암처리 생장실에 방치하였다.

아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 행구어 낸 다음 N6D 고체 배지에서 hygromycin 선발을 1차(hygromycin 30 mg/L), 2차 (hygromycin 40 mg/L)에 걸쳐서 계대 배양을 통해 진행하였다. 선발은 28℃ 생장실에서 각각 2주 씩 합해서 4 주 동안 이루어졌다. 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR (hygromycin 40 mg/L) 고체배지에 옮겨 4주 28℃ 광조건 생장실에서 재분화를 유도한 후, 식물체를 MS 고체 배

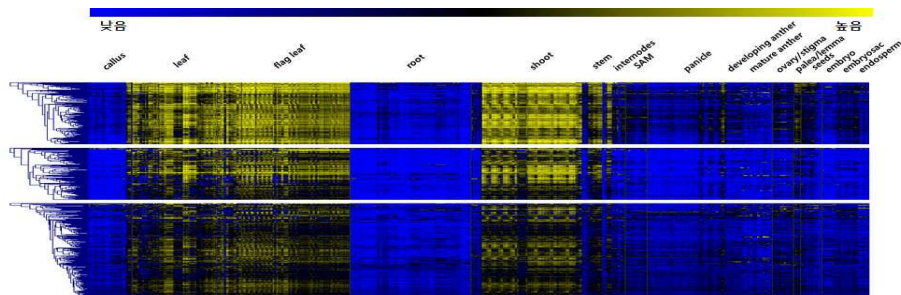
지로 옮기고 7일 28℃ 광조건 생장실에서 키우고 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

[0110] <실시예 8> 형질전환 식물체를 이용한 잎과 줄기 우선적 발현 검증

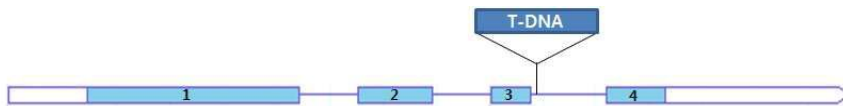
[0111] 재분화된 식물체의 기관 특이적 GUS 발현을 확인하기 위하여, 수확한 종자를 10개씩 28℃에서 7일간 배양한 후 모든 개체를 GUS 염색 처리하였다.

도면

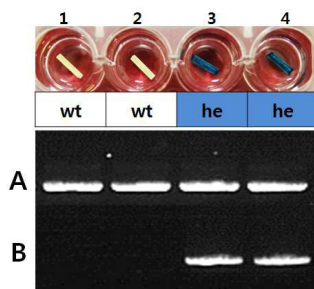
도면1



도면2



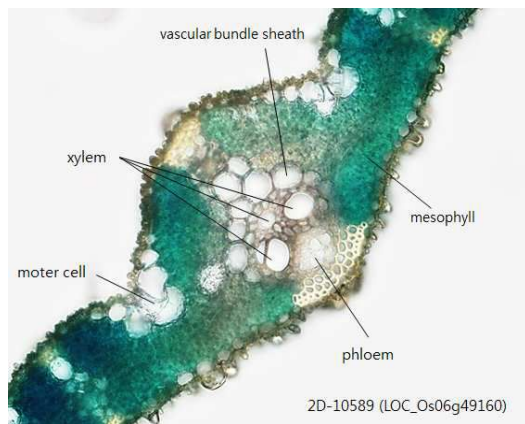
도면3



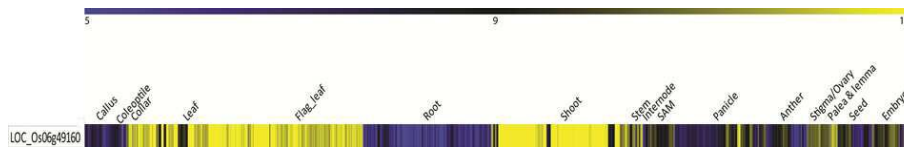
도면4



도면5



도면6



도면7



도면8

R	LOC_Os06g49160 의 프로모터	GUS	Tnos	P35S	HPH	T7te	L
B							B

서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Leaf-, stem- or both- specific promoter, expression vector
comprising the same, transformed plants thereby and method for
preparation thereof
- <130> p12-075-khu
- <160> 10
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 2005
- <212> DNA
- <213> Oryza sativa
- <220><221> promoter

<222> (1)..(2005)

<223> Promoter of LOC Os06g49160

<400> 1

cgcgccctct gccatgggtgg gcttcgtgcc ccggatgcac tggcttgctg acccggtatg	60
cacaaatgca ctgcacactg acgaacattt ctgaatgttt tggatcatca tgagtaatat	120
ctcgctgaat ttttgggtgca tcataagtaa tctgcacatt aatttatattt tgaaagacca	180
catgatacgt atactaattg aggatgacta cacatgggtg gctacttctt ggtgtaattg	240
ctgaatttta ttgaggaagt tagttatgcc aattggagtg tctgcttctg cagggaagta	300
atgcaaagga atacagatat ggaagctggt ggtcagtttg gtggacaggg acttatagca	360
tggttctctc caaagcaagt tttttccaca ggcagtactt ggatctgtat accattcgca	420
tgcttccgtc tattcgtgat tatgtgaatg aaaacagggtg agattcatat cttactagtt	480
actaccgcaa catttcttca gaaagtttct tcagctgcgg gtattattat gctatctgaa	540
taatctgatg gtcatttttg tagtatacta gtaagtctta ccattttaac tgattattga	600
taggaattgc gaggatattg caatgtcctt tcttgtggca aatgtaactg gatctccacc	660
aatatgggtt caaggctcagt aatcatcctt gtgcagcaat gaaatcattt tcagatcgag	720
aaacttgtag acccctattt agttcaatta gtcacacatc atgcaacgac actttgcatt	780
tcttccagat atiggagaat ttcctcttgg agtatgagca gcagcaaacc aatgtagttg	840
tctgaaactt tgctatcctt ttatatgctt gtcagttttt gtgatacctt ctgtattacc	900
ttgaatcagc aagaaccatg tggaagcact gtctaaattc atgtgacaaa ccaacaacga	960
agatcaataa aataagagta taagatgatt tgctatttag cctgctgcta ttgttgtcag	1020
gaggccatac tgaagttccc tttcgtgatg ttactgcagg aaggatatc gagattggat	1080
caagcggcat tagcagtttg aaaggccatg atttacagag atcaaaatgt ctcaatacat	1140
tttctgcat gtatgggcat atgcctcttg tagccaccac agtcaaagct gttgatagcc	1200
gcacaagctg gttctggtga tggttctgtt ttgccttccc ttaggtgctg cctgcctatt	1260
tgccatagca atattataag gctagtgtaa tcatgtgcat gattcatcaa cagctaataga	1320
caaggattat attgtacaaa ctgattcttt ggaggagata ttgtacacct gaaactaaag	1380
gctttgattg attttctaatt caattgataa atgagattta tgtggctaag tacttgcct	1440
aactgttttg aaacgtgcac atctgggggt tcataacgga aggcaaatgt acctacaaa	1500
tcactaaagt gagttcatca tatggcgtgt tacgtgtaca tgtgtctaga gtttgaaatt	1560
tagttttttt tttctcaatt tctttcttct tgaaatacat cacattatgt gttctcctat	1620
ggataattgc ttcatccatg tataaatggc aagaaataaa agagtaagtt taaatagggc	1680

caacaaaaaa caaactaaat tgagttttaa tttcacccaa atttatttct acgaaattta 1740

aatttatcag gaattaagtt caattctaac ttcaaaattt acaaacttcg tttcccgtaa 1800

tttttatatt tgttcttttc aaatgtcgaa cgtgatggt gtccatggct aactcgtgtg 1860

tggctgcgac gggtgcacca agattgtgag gataaggaga gctttgctcc agtctaacca 1920

ggctgaactg ccacgtcac acccttctcc tctcctctg ctatctgctg ctgctgctga 1980

aaaattctct cgaatcgatc gcccg 2005

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of 2D-10589

<400>

> 2

tccattgagt tcttttgggg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of 2D-10589

<400> 3

catgccagga aaaagtagcc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer of NGUS1

<400> 4

aacgctgac aattccacag 20

<210> 5

<211> 1580

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220><221> gene

<222> (1)..(1580)

<223> LOC_Os06g49160

<400> 5

gtgtggctgc gacggttgca ccaagattgt gaggataagg agagctttgc tccagtctaa 60
ccaggctgaa ctgccacgct cacacccttc tctctctct ctgctatctg ctgctgctgc 120
tgaaaaattc tctcgaatcg atcgcccgat ggtgggtggcc atcgctaccg aagcgtgggc 180
gctcgccgga tgcggcgcg cgccaagtc ggcgcccgcg gcggcgagg aggcgcgggt 240
gcagctgcag cagcatagtc tttctgcagc caggccaag aaaccgattt cgttcagagc 300

ggtggcgcg gcggcggtca gtagccaatg ccaccaagaa cgcgcgccg tcgtcgtcgg 360
gagacgcagc ggcatggcgt cctgcctgct cgccgccgtc gctgcctccc tctccggcgc 420
cgggtgaagc cgggcccgcg tctggaggc cgacgacgac atcgagctcc tggagcgcgt 480
caaggaggac aggaagaagc ggctccagaa gcaggcgctc atcagctcct ctggcaccga 540
gacaggtcgg ctcatcatc atcagagcaa tttcatctag ctaatttctt caatgattat 600
cgattaatct ctcttgtct gttaattgc actctagttt taattacaag ccacagggta 660
cttcaggat ctcatctaca agctgagcaa gtagggcaa gccattgaca agaatacct 720

ccctgctgca agcagtgtcc taggccccaa ctctgacgct cagtgggttc agaacaatcaa 780
ttagctttc accaaggctt cattctcca tctggactc agtttcttct gaataattatt 840
tgataatttc ttgtcaagtt gtgtagttta tttcatctga ttcagaacca ctgtttgcat 900
gcaacagttt agctctagcc cagaggagaa gaacatggc gatagcttca attctcctt 960
ggcctccttg attacatctg gtacactggc tcttgttctt cttctgttct ctagaatctg 1020
aacttacct tttctgtcta aaaaaggaag attctctcag tgatttttct gttatgcaa 1080
tctgaatctg aaacactgca tgtatgtatc atcttgttgc agtgaacaag agtgatgttg 1140

attcatcaa gtcggcggtt gtgtcgtcag ccacaacgct ggagaaatgg atagcttcag 1200
ccggtttgag tggcagctc aaaggattct aaatttctga cgccaattga atctgaatcg 1260
cctgacaagt acatgatcg agtagcattt ccttgaagca atggctata tataatgcgt 1320
caataccagt aagaatgttt tgtccaagaa aaagaatttg aagatatgga ttcggctgct 1380
gtgaatcttc gaagagggta ttgtaactga atcttcagtt cagacagaat atgtgataat 1440
agccatggct ctgttttttc tctctctccg tgggaagtaa attgcatcat ttcgtatata 1500
acgagattct ttgcaatgca gaagaaaatt tagcaaagtt tctttgtttt catgtctata 1560

tagctttcgt ttgcaagcaa 1580

<210> 6

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer of LOC_Os06g49160 Bamh1
 <400> 6
 ggatccatgc actgcacact gacgaa 26
 <210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer of LOC_Os06g49160 Xho1
 <400> 7
 ctcgagagtt cagcctgggtt agactg 26

 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer of RB_backbone_F2
 <400> 8
 tcgcacggaa tgccaagca 19
 <210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer of Os06g49160_seq1
 <400> 9
 gtctagagat ggagaagtcg atgttcg 27
 <210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer of Os06g49160_seq2
 <400> 10

ctcgaggtag aaatgtttga gcagca

26