

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0130834 (43) 공개일자 2014년11월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/63</i> (2006.01) <i>A01H 5/00</i> (2006.01) <i>C12N 15/29</i> (2006.01) <i>C12N 15/82</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0049300 (22) 출원일자 2013년05월02일 심사청구일자 2013년05월02일	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동) (72) 발명자 한창덕 경상남도 진주시 가좌안골길21번길 5 제일풍경채 아파트 101동 1405호 김태호 경기도 수원시 장안구 화산로 85 천천푸르지오아파트 111동 2104호 황진 경남 진주시 진주대로 501, 공동실험실습관 6동 326호 (가좌동, 경상대학교) (74) 대리인 최규환

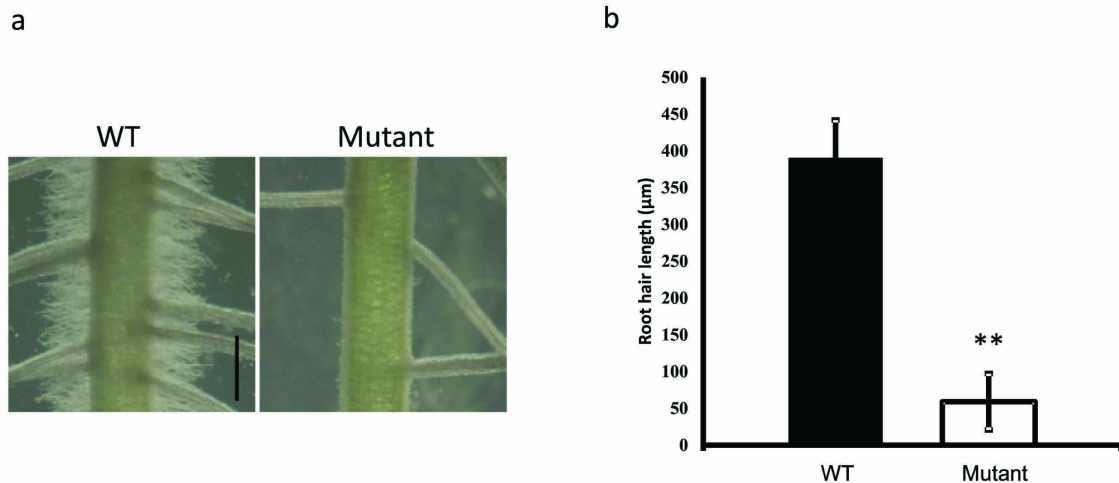
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **OsFH1 유전자를 이용한 식물체의 뿌리털 신장을 조절하는 방법 및 그에 따른 식물체**

(57) 요약

본 발명은 벼 유래 OsFH1(*Oryza sativa* Formin homology 1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환시켜 OsFH1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 뿌리털 신장을 조절하는 방법, 상기 OsFH1 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 뿌리털의 신장이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 뿌리털의 신장이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 상기 OsFH1 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물체의 뿌리털 신장 조절용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008168
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	GM작물실용화사업단
연구사업명	차세대바이오그린21 사업
연구과제명	작물 초형과 등숙 관련 글로벌 고유유전자 발굴 및 GM 작물 개발
기 여 율	1/2
주관기관	경상대학교
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	PJ008215
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	차세대유전체사업단
연구사업명	차세대바이오그린21 사업
연구과제명	벼 재염기서열분석 및 변이집단을 이용한 농업형질 유전자 대량 개발
기 여 율	1/2
주관기관	경상대학교
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

벼 유래 OsFH1(*Oryza sativa* Formin homology 1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 OsFH1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 뿌리털 신장을 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 OsFH1 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 식물체의 뿌리털 신장을 조절하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 *OsFH1* 유전자의 발현을 저해하여 식물체의 뿌리털 신장을 저해시키는 것을 특징으로 하는 식물체의 뿌리털 신장을 조절하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 뿌리털 신장의 저해는 *OsFH1* 유전자의 발현이 저해된 형질전환된 식물체를 침수 조건에서 성장시키는 것을 특징으로 하는 식물체의 뿌리털 신장을 조절하는 방법.

청구항 5

벼 유래 OsFH1(*Oryza sativa* Formin homology 1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화하는 단계를 포함하는 식물체의 뿌리털의 신장이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 OsFH1 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 *OsFH1* 유전자의 발현을 저해하여 식물체의 뿌리털 신장을 저해하는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 뿌리털 신장의 저해는 *OsFH1* 유전자의 발현이 저해된 형질전환된 식물체를 침수 조건에서 성장시키는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 뿌리털의 신장이 조절된 형질전환 식물체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 식물체는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 11

제9항에 따른 식물체의 종자.

청구항 12

벼 유래 OsFH1(*Oryza sativa* Formin homology 1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는, 식물체의 뿌리털 신장 조절용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 OsFH1 유전자를 이용한 식물체의 뿌리털 신장을 조절하는 방법 및 그에 따른 식물체에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 벼 유래 OsFH1(*Oryza sativa* Formin homology 1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 OsFH1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 뿌리털 신장을 조절하는 방법, 상기 OsFH1 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 뿌리털의 신장이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 뿌리털의 신장이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 상기 OsFH1 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물체의 뿌리털 신장 조절용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 벼(*Oryza sativa*)는 세계 인구의 절반 이상이 식량 자원으로 이용하는 가장 중요한 작물 중 하나이다. 논에서 자라는 벼의 재배 조건은 밀 또는 옥수수과 같은 주요 발작물들의 재배 조건과 다르며 이는 벼의 뿌리털이 밭에서 재배되는 식물체들의 뿌리털과 다른 물리화학적 조건들에 노출됨을 의미한다.

[0003] 뿌리털은 뿌리의 표피세포가 외부로 자란 것이다. 뿌리털의 발달은 뿌리의 종축을 따라 연속적으로 근단으로부터 기부(상부) 구간에 이르기까지 세포의 특수화, 뿌리털의 개시 및 근단의 신장에 의한 뿌리털 신장으로 진행된다. 뿌리털 형성을 결정하는 유전적 조절 기작은 애기장대 식물체에서 광범위하게 연구되었다. 애기장대의 뿌리에 있어 뿌리털 및 비뿌리털 세포의 운명은 리셉터 유사 키나아제(receptor-like kinase), WD40 단백질/bHLH(basic-helix-loop-helix) 전사인자/MYB 전사인자 복합체 및 MYB 유사 단백질의 위치 의존적 활성화에 의해 결정되며, 상기 인자들은 주로 뿌리의 분열조직 및 신장대의 표피조직에서 활성을 보인다. 뿌리털의 형태형성은 다른 일반적인 세포의 형태형성 관련 유전자와 협력해야 하나, 근본적으로는 모원세포(trichoblast) 특이적 유전자의 활동으로 인한 것이다.

[0004] 뿌리털 형성을 결정하는 유전적 조절 기작과 함께 각종 호르몬, 영양분 및 물리적 처리와 같은 외부적인 요인들에 의해 뿌리털의 생장 및 신장은 영향을 받는다. 뿌리털의 개시는 에틸렌 또는 에틸렌 합성 저해제 처리에 의해 영향을 받으며, 옥신 호르몬의 적용은 뿌리털 발달을 조절할 수 있다. 외인성의 영양분과 뿌리털 발달 사이의 관계를 설명하기 위해서 강력한 유전적 돌연변이 분석을 수행하여, 철과 무기인 성분이 뿌리털의 밀도와 길이에 영향을 미치는 것을 알았다. 야생형 타입의 식물체 뿌리를 배지로부터 물리적으로 분리시켰을 때 뿌리털 형성에 영향을 미쳤다. 또한, 애기장대 *rhl*(root hairless)와 *rhd6*(root-hair defective 6) 유전자의 돌연변이체는 뿌리가 공기 중에 노출되었을 때 정상적인 뿌리털을 형성하였다.

[0005] 소포 트래픽킹(vesicle trafficking), 세포골격 재편성 그리고 세포벽 이완 및 합성은 뿌리털 신장의 주요 원동력이다. 포민(formin) 단백질은 다중 도메인 단백질군으로 효모, 식물 및 동물에 존재하고 선형의 액틴 중합체 조립에 관여한다. 포민 단백질은 매우 보존된 FH2(formin homology 2) 도메인으로 정의되어 지며, 대부분의 식물 포민 단백질은 보다 가변적인 FH1(formin homology1) 도메인을 가지고 있다. 애기장대에는 최소 21개의 포민 유전자들이 있고, 벼 게놈에는 16개의 포민 유전자들이 있으며, 현재까지 식물 포민 단백질은 정단 생장, 세포 분할 및 세포 팽창을 조절하는 것으로 보고되었다.

[0006] 한국등록특허 제0788439호에는 '뿌리 및 뿌리털의 신장을 유도하는 유전자 및 이 유전자에 의한 형질전환 식물체'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1202615호에서는 '옥신수송체 발현을 통한 식물체의 뿌리털 신장을 조절하는 방법 및 그에 따른 식물체'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 OsFH1에 의한 식물체의 뿌리털 신장을 조절하는 방법 및 그에 따른 식물체에 관해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 벼의 뿌리털 발달이 저해된 돌연변이체를 선별하고, 이로부터 OsFH1 단백질을 코딩하는 유전자의 돌연변이체를 침수 조건에서 생장시켜 야생형에 비해 뿌리

틸 신장이 현저히 저해되는 것을 확인하였다. 이를 통하여 OsFH1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 조절은 벼 식물체의 뿌리틸 신장 조절을 가능하게 하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 벼 유래 OsFH1(*Oryza sativa* Formin homology 1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 OsFH1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 뿌리틸 신장을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 OsFH1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 뿌리틸의 신장이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 뿌리틸의 신장이 조절된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 식물체의 종자를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 OsFH1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물체의 뿌리틸 신장 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에서 분리된 OsFH1 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 유전자로부터 발현되는 단백질은 식물체의 뿌리틸 신장과 관련된 형질의 개선 및 타 식물체에서 뿌리틸의 신장을 조절하는 유전자의 탐색 등에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 유전자를 이용하여 식물체의 뿌리틸 신장이 조절된 식물체를 창출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 OsFH1 단백질 코딩 유전자의 돌연변이 식물체의 뿌리틸 신장이 저해된 표현형을 확인한 사진(a)과 이를 도표화 한 것(b)이다. WT; 야생형, Mutant; 돌연변이 식물체, bar; 500 μ m, **P<0.01.
- 도 2는 야생형과 돌연변이형 *OsFH1* 유전자의 게놈 DNA와 cDNA 서열을 비교한 그림(a)과 OsFH1 단백질의 기능적인 도메인을 표시한 그림(b)이다. WT; 야생형, Mutant; 돌연변이 식물체, 영문 대문자; 엑손 내의 염기, 영문 소문자; 인트론 내의 염기, SP; 신호 펩티드, RRR; 프롤린 리치 영역, TMD; 막전위 도메인, FH1; formin homology 1, FH2; formin homology 2, 아라비아 숫자; 각 도메인의 처음과 마지막 아미노산의 번호.
- 도 3은 두 종의 T-DNA 삽입 OsFH1 돌연변이 식물체의 뿌리틸 신장이 저해된 표현형을 확인한 사진(a)과 이를 도표화 한 것(b)이다. WT; 야생형, Mutant; 돌연변이 식물체, bar; 500 μ m, **P<0.01.
- 도 4는 뿌리 성장 과정 중 성장 배지의 종류 및 배지의 형상에 따른 OsFH1 단백질 코딩 유전자 돌연변이 식물체의 뿌리틸 표현형을 확인해 본 결과이다. a는 야생형과 돌연변이 식물체를 1/2 MS(Murashige & skoog) 배지에서 수용액 상태와 한천을 첨가하여 고체화한 상태에서 생장시켜 뿌리틸 신장을 관찰한 사진이고, b는 a의 결과를 도표화 한 것이다. c는 야생형과 돌연변이 식물체를 증류수에서 수용액 상태와 아가로스를 첨가하여 고체화한 상태에서 생장시켜 뿌리틸 신장을 관찰한 사진이고, d는 c의 결과를 도표화 한 것이다. OsFH1-1; 야생형, Osfh1-1; 돌연변이 식물체, bar; 500 μ m, **P<0.01.
- 도 5는 뿌리 성장 과정 중 호기적 조건에 따른 OsFH1 단백질 코딩 유전자 돌연변이 식물체의 뿌리틸 표현형을 확인해 본 결과이다. a는 1/2 MS 배지로 적신 종이 타올 위에서 3일간, b는 1/2 MS 배지에 잠근 채로 3일간 그리고 c와 d는 1/2 MS 배지에 잠근 채로 1.5 일간 두었다가(c) 1/2 MS 배지로 적신 종이 타올 위로 옮겨 다시 1.5일간 둔(d) 야생형과 돌연변이 식물체의 뿌리틸 신장을 확인한 결과이다. W; 야생형, M; 돌연변이 식물체, **P<0.01.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼 유래 OsFH1(*Oryza sativa* Formin homology 1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 OsFH1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 뿌리틸의 신장을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 벼 유래 OsFH1 단백질을 코딩 유전자의 발현을 저해하여 식물체의 뿌리틸 신장을 저해할 수 있으며, 상기 뿌리틸 신장의 저해는 *OsFH1* 유전자의 발현이 저해된 형질전환된 식물체를 침수

조건에서 생장시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 OsFH1 단백질 코딩 유전자의 발현의 저해는 예를 들면, OsFH1 단백질 코딩 유전자의 돌연변이에 의해 수행될 수 있으며, 바람직하게는 OsFH1 단백질 코딩 유전자의 미성숙 종결(premature termination)에 의해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기에서 "유전자 돌연변이"란 하나의 유전자좌의 범위 내에서 유전자의 염기배열에 어떤 이상(치환, 부가, 결실, 역위, 전좌등)이 발생한 것을 말하며, 이러한 돌연변이에는 DNA 상의 하나의 염기의 변화에 의한 점 돌연변이와 염기의 삽입 또는 결실에 의해 서열 전체가 변화되는 해독틀 돌연변이가 있으며, 발생 원인에 따라 자연적으로 발생하는 자연 돌연변이와 인위적인 환경의 작용 또는 화학물질에 의해 유도되는 유도성 돌연변이가 있다.

[0018] 본 발명에 따른 OsFH1 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체의 뿌리털의 신장을 조절하는 활성을 의미한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 OsFH1 단백질을 암호화하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 유전자는 OsFH1 단백질을 암호화하는 게놈 DNA(서열번호 45)와 cDNA(서열번호 1)를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명은 본 발명에 따른 벼 유래 OsFH1(*Oryza sativa* Formin homology 1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화하는 단계를 포함하는 식물체의 뿌리털의 신장이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 벼 유래 OsFH1 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해하여 식물체의 뿌리털 신장을 저해할 수 있으며, 상기 뿌리털 신장의 저해는 *OsFH1* 유전자의 발현이 저해된 형질전환된 식물체를 침수 조건에서 생장시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0023] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0024] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

- [0025] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.
- [0027] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.
- [0028] 본 발명의 벡터를 진행 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포(예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다.
- [0029] 상기 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물이다.
- [0030] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 뿌리털 신장이 조절된 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [0032] 상기 본 발명에 따른 방법이 적용될 수 있는 식물체로는 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물이 포함된다. 상기 단자엽 식물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 벼, 밀, 보리, 죽순, 옥수수, 토란, 아스파라거스, 양파, 마늘, 파, 부추, 달래, 마 및 생강이 있다. 쌍자엽 식물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두가 있다. 상기 식물체는 바람직하게는 벼(*Oryza sativa*)이다.
- [0033] 또한, 본 발명은 벼 유래 OsFH1(*Oryza sativa* Formin homology 1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는, 식물체의 뿌리털 신장 조절용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 OsFH1 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 함유하며, 상기 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 뿌리털의 신장을 조절할 수 있는 것이다.
- [0034] 본 발명은 삽입변이 유도 체계인 Ac/Ds 태깅 시스템(tagging system)을 통하여 벼에서의 뿌리털에 생성 및 성장에 연관된 유전자를 선발하였고, 유전자에 대한 분자학적 연구를 통하여 유전자의 뿌리털 특이적 발현 특성을 구명함으로써 완성된 것이다.
- [0035] 전술한 바와 같이, 본 발명은 벼에서의 뿌리털에 생성 및 성장에 연관된 단백질 및 *OsFHI* 유전자에 관한 것이다. 즉, 본 발명자들이 개발한 벼에서의 삽입 변이 유도체계인 Ac/Ds 태깅 시스템(Kim et al., 2004 Plant J. 39: 252-263)을 통해 식물 변이체를 얻었으며 그로부터 기능 분석을 실시하였다. Ac/Ds 태깅 시스템은 옥수수의 전이인자인 Ac와 Ds를 유전자조작한 후 벼의 게놈상에 형질전환 방법으로 삽입시켜 확립했다. Ds는 Ac가 같은 게놈상에 존재할 때 전이된다는 사실에 착안하여 시스템을 구축하였다. 이 태깅 시스템은 유전자의 기능을 변이를 통해 동정하고 동시에 형질발현을 리포터 유전자를 통해 관찰할 수 있는 매우 강력한 연구 방법이다.
- [0036] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의

내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 실시예 1: 뿌리털의 발달이 미숙한 변이체의 선별 및 변이된 유전자의 분석

[0038] 자포니카 품종인 동진벼를 연구에 사용하였다. 벼에서 뿌리털 발달을 조절하는 유전자를 확인하기 위해서, 삽입 변이 유도체계인 Ac/Ds 태깅 시스템을 통해 짧은 뿌리털 또는 뿌리털이 없는 표현형을 가진 식물 변이체를 스크리닝하였다.

[0039] 선별된 짧은 뿌리털 또는 뿌리털이 없는 표현형을 가진 변이체에서 돌연변이 유전자를 분리하기 위해 유전체지도 기반 클로닝을 수행하였다. 짧은 뿌리털 또는 뿌리털이 없는 표현형을 가진 선별된 변이체를 인디카 품종의 밀양23호 벼와 교배하였고, F2 세대를 얻어 짧은 뿌리털 표현형을 가지는 식물체로부터 게놈 DNA를 추출하여 다형성 마커를 확인하였다. 유전체지도 기반 클로닝에 사용된 프라이머의 정보는 다음 표와 같다.

표 1

유전체지도 기반 클로닝에 사용된 프라이머.

Marker	Forward (서열번호)	Reverse (서열번호)
S01054	GCGAAGCCTGCTTTTGTAT (3)	CGGAGATTTTCCCTAAAACAA (4)
R1M30	AAGGGGCCCTAATTTATCTAG (5)	TGTTTACTTTGTCTTGACTG (6)
R1M471	AATAGAATTACTGATGAAACCTTA (7)	GCCCGTTACCGCTTATGT (8)
RM6696	GACGAAGATGAAGGATGGC (9)	AGCGTCGATATTGACGTAG (10)
RM1988	AGATGGTACCACCATGTAC (11)	TATAGTACTCTGATACGTACG (12)
RM152-154-1	GTCGTGCAAACGCGCAAC (13)	GCCCTTAACGCCCTTTG (14)
RM152-154-3	ATAGAAGGGATGGGTAGGG (15)	CGTTGTCTCTGATATTGACG (16)
RM154.6-1	TGGCCTACCACATGTTTAC (17)	GGAAGAAAATCAAGTCGGTG (18)
RM154.6-2	TAGAGTCTATATCCATAGCAC (19)	AGTCCCTTTGAACAATCTATC (20)
RM154.6-3	CGTCATGTGTACTACCCAC (21)	TAGGTGAGAATGATTGGAGG (22)
RM154.8-1	GAAAAAATTTGGTGAAAGGGTC (23)	CCAAGGAATATGAAAAGCC (24)
RM154.8-7	CGCAAAAGAAAACGCGTAG (25)	TCTAACGGTTCTTTTCCTCG (26)
RM154.8-8	TACTCCTAATCAATCGGGAC (27)	TTAAGCAGACCAAGGCAGC (28)
RM155-157-1	AACAACACCTGAACGGGTG (29)	GATCACTGAGCCGTTTACG (30)
RM155-157-2	GGATGATGCAGTCAACTGG (31)	CGACATCCACTCGAGCTG (32)
RM157.6-1	GTTTGATTTCGTACGTATGC (33)	GTATACATATACGTGTGTGC (34)
RM157.6-2	GCATGTCAATTCAACTGCAC (35)	GTGCATGGTTTGTGAGAC (36)
RM158-1	ACAAGTCTGGGATGTCCAG (37)	GGAGTAACTCAACTCTGCG (38)
RM160-1	CCTCTCGCAAAGTGACTTC (39)	TCGCTTCCCAATTAGATGG (40)
RM160-2	TGGTATATGAGTTACTCTC (41)	ACCAAACCCGGTTCACATC (42)
RM160-3	ATCGACTGTAGCCATCCAG (43)	CATTTCGCACAACATGTTC (44)

[0040]

[0041] 정교한 매핑(mapping) 후, 짧은 뿌리털 또는 뿌리털이 없는 표현형을 가진 변이체의 돌연변이된 유전자를 확인하였다. 포민-유사 단백질 1(OsFH1)을 암호화하는 유전자와 위에 하나의 염기가 구아닌에서 아데닌으로 치환된 것을 확인하였다(도 2). 이 치환은 유전자의 첫번째 인트론의 3' 말단의 스플라이싱 수용 자리에 발생한 것으로, 치환된 염기는 근접한 염기와 함께 새로운 스플라이싱 수용 자리를 만들었다. 스플라이싱 변경은 Os01g67240의 코딩 영역의 프레임 쉬프트(frame shift)를 생성하였다. 결과 돌연변이 유전자는 단백질 번역 과정에서 미성숙 종결(early termination)을 일으켜 절단된 단백질을 생산하게 된다.

[0042] 실시예 2: 뿌리털 길이의 측정

[0043] 선별된 OsFH1 단백질 코딩 유전자 돌연변이 식물체를 발아 후 5일 동안 1/2 MS 용액에서 키운 후, 돌연변이체 식물의 뿌리털의 길이를 야생형과 비교하였다. 식물의 뿌리털은 올림푸스 SZX12 입체현미경을 사용하여 관찰하고 이미지를 촬영하였다. 촬영한 이미지는 ImgJ(<http://www.rsweb.nih.gov/ij/>) 프로그램을 사용하여 길이 측정 분석을 수행하였다. 그 결과 야생형에 비해 돌연변이체 식물의 뿌리털의 길이가 85% 짧은 것을 확인하였다(도 1).

[0044] 두 종의 T-DNA 삽입 OsFH1 단백질 코딩 유전자 돌연변이 식물체 역시 동일한 방법으로 뿌리털의 길이를 야생형과 비교 분석하였다. 그 결과 두 종의 T-DNA 삽입 OsFH1 단백질 코딩 유전자 돌연변이 식물체 역시 야생형에 비

해 뿌리털의 길이가 현저히 짧은 것을 확인하였다(도 3).

[0045] 이들 세 종의 OsFH1 단백질 코딩 유전자 돌연변이체의 일관된 뿌리털 신장이 저해된 표현형 관찰을 통해, 상기 OsFH1 단백질을 코딩하는 유전자가 벼의 뿌리털 발달에 관여함을 확인하였다.

[0046] **실시예 3: OsFH1 단백질 코딩 유전자 돌연변이 식물체의 뿌리털 신장에 있어 성장 조건들이 미치는 영향 분석**

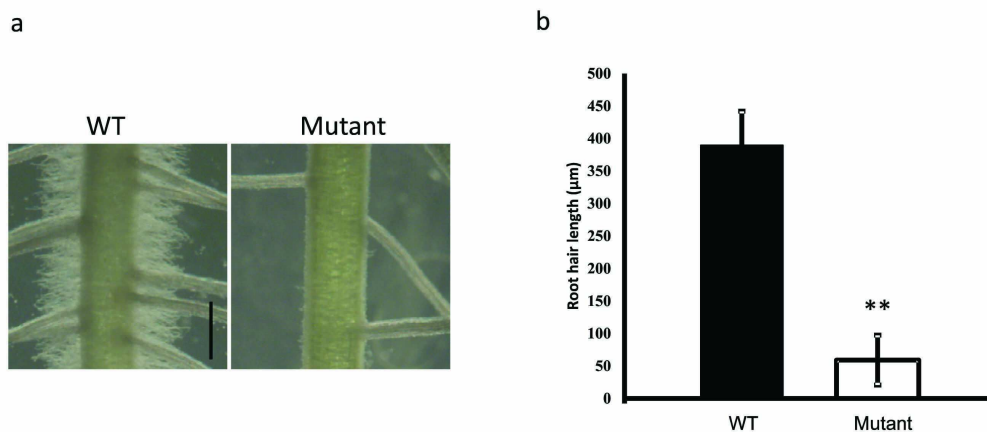
[0047] OsFH1 단백질 코딩 유전자 돌연변이 식물체의 뿌리털 신장에 있어서 성장 조건들이 미치는 영향을 알아보기 위해 해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0048] 먼저 (1)수용액 상태에서 뿌리를 성장시키기 위해서 발아된 종자를 수용액 배지와 접촉한 비닐 망 위에 올려놓고 그리고 (2)공기 중에서 뿌리를 성장시키기 위해서는 발아된 종자를 파이토-아가와 아가로스를 포함한 고체 지지대 위에 올려놓고 성장시킨 후 뿌리털의 신장을 분석하였다. 고체 지지대로 종이 타올을 사용할 경우에는 타올의 상태를 젖은 상태로 유지시켰다. 식물체의 뿌리가 고체 지지대 위에서 자라난 조건에서는 OsFH1 단백질 코딩 유전자 돌연변이 식물체의 뿌리털이 야생형 식물체의 뿌리털의 길이와 유사하였으나, 수용액 상태에서 자라난 뿌리에서는 OsFH1 단백질 코딩 유전자 돌연변이 식물체의 뿌리털이 야생형 식물체의 뿌리털의 길이보다 현저하게 짧았다. 그리고 발아된 종자와 접촉한 수용액의 종류는 OsFH1 단백질을 코딩하는 유전자 돌연변이 식물체의 뿌리털 신장에 큰 영향이 없었다(도 4).

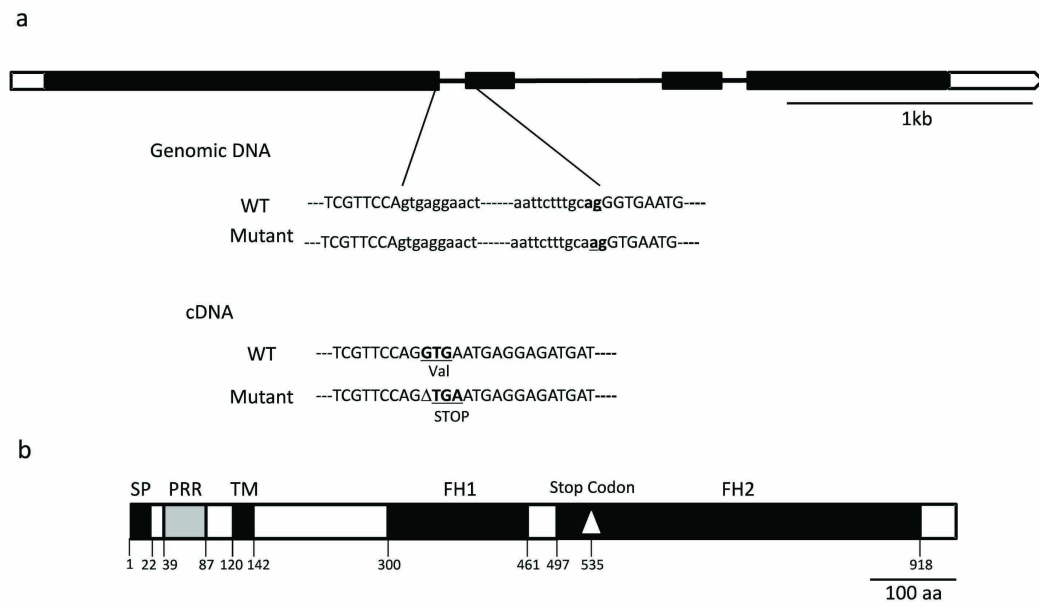
[0049] 또한 뿌리털 신장에 있어 호기적 조건이 미치는 영향을 알아보기 위해 야생형 및 세 종의 OsFH1 단백질 코딩 유전자 돌연변이 식물체의 묘목들을 (1)공기 조건 - 1/2 MS 배지로 적신 종이 타올 위에서 3일간, (2)침수 조건 - 1/2 MS 배지에 담근 채로 3일간 그리고 (3)교차 조건 - 공기 조건에서 1.5일간 둔 후 침수 조건으로 다시 1.5일을 더 둔 묘목들에서 뿌리털의 신장을 분석하였다. 그 결과, 오직 침수 조건에서 키운 OsFH1 단백질을 코딩하는 유전자 돌연변이체의 묘목들만 뿌리털이 야생형 식물체의 뿌리털보다 길이가 짧았다(도 5). 이를 통해 OsFH1 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체는 성장 조건이 침수 환경일 경우 특이적으로 뿌리털의 신장이 저해되는 표현형을 보임을 확인하였다.

도면

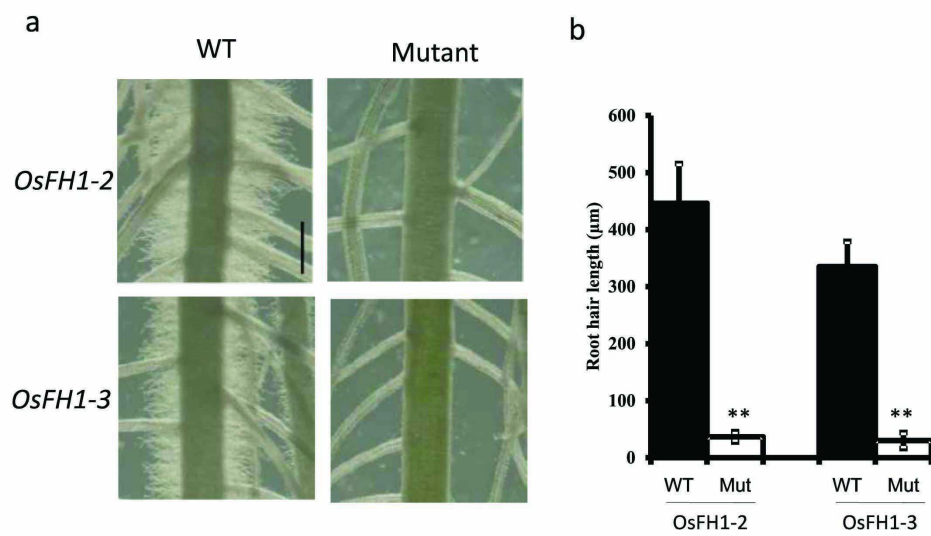
도면1



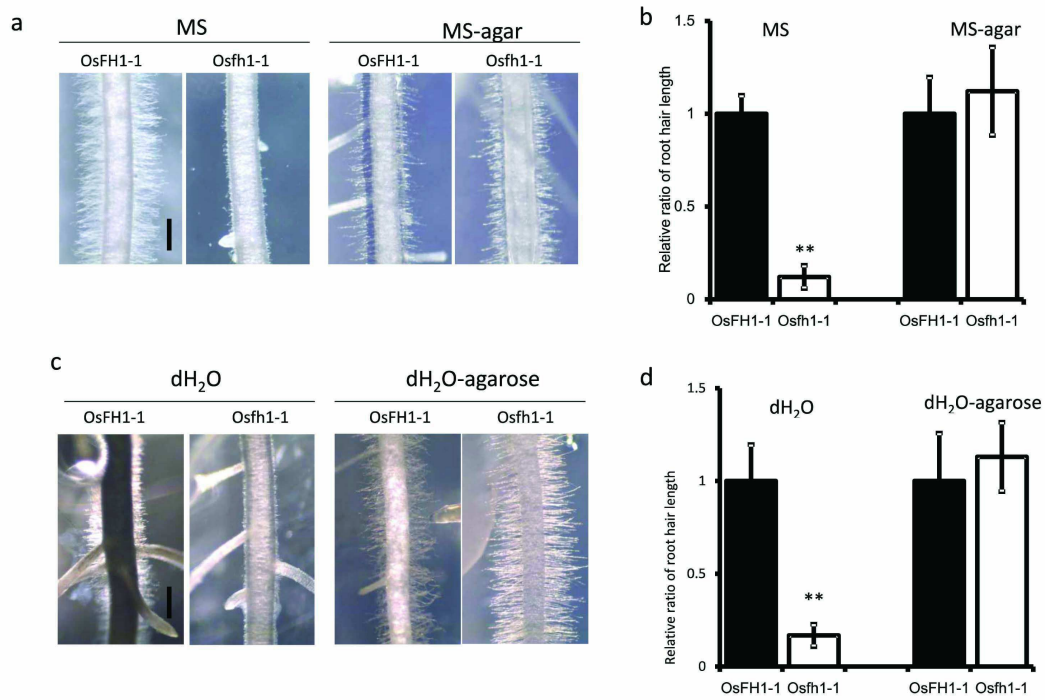
도면2



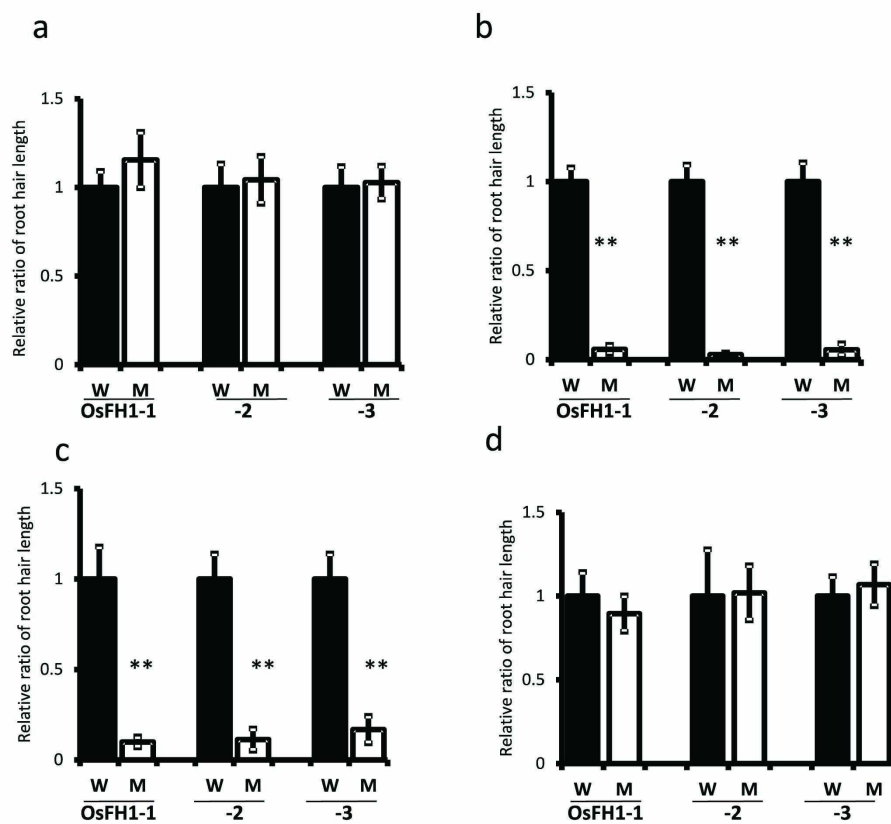
도면3



도면4



도면5



서열목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Method for controlling root hair elongation of plant using OsFH1
gene and the plant thereof

<130> PN13101

<160> 45

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2883

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

atgccgtctc tccggcgatt cttggagttg gtggtggttg ggattgttgt gtgtggtgtc 60
aatggcggga gtgatggttt ggaggttgcg gtggcgagga ggcagctgca ccagccgttc 120
ttcccggatc agtcgtcgtc gccgccgacg ccggcgccgc ccggccccgc tccgccgttc 180

ttcccggcgc tgcgggtgcc gccgccgccg ccggcgacgg cggggcagga gcagccgacg 240
taccgcgcc tcgtgtgcc caacaccggc gccggtggcg cggcgccgac gcccgctccg 300
gatggaggtg gtggtggttg tgggtggggcg aggaagtcca agagcagcgc gtccaagctt 360
gtcccggcga ttgtgtgcc gctgtcacg gtggccgtgc tcgggctgtc catcgcttc 420
ttcttcacgc accggcgtgg gaatgcggcg cgcgggggag gaggaggcgg cgggtgcgtc 480
ggtggcgggg acgccaagtt cttgcaccg gagaggcgga gcctcttcgc gcgcgacgag 540
ttcggcggga gcggcgccgc cgccgcgccg ccggcccgcg cgatggatta ccgctacgtg 600

gggaacgccg gcatcgggcg gatggacgag aagagcagcg agacgacgtc gtcgggcgac 660
gaggcgtccc ggagcacccg cggatcgccg gagctccgcc cgctgccgcc gctgtggcg 720
cggcaatcgc ggccgatggg cgcgaggagc cccggcagcg gcgtcgccgg gttcgctcg 780
ccgtcgtccg gcgacgagga attctactcg ccgcaaggat catccaagat gtcgacctcg 840
cacagaacgc tcgccgcgc ggtcgaagcc gctgtggccg cgcgcgacg ctccaagagc 900
ccctcggccg gctcgatcgt gagcacccg tcgtaccgt cctcgcccgg cgcgacgatg 960
tccccggcgc ccgcctcgcc gcctctcttc tccagccccg gccagtcggg ccgcgctcc 1020

gtcaagtcaa gatccgatag cgtgcgcacc ttggccaac caccggcgcc tccaccacca 1080
cctcccttcg cgcgcgacgt gccaccgcg cctccgcctc gccggaaacc gccgtcgcca 1140
tcaccgccct cctccccact catcgagaac acgtcggcgc tcagatccac caccaccacc 1200
gacaccacca tccaagaaa cccattcgta caaccaccac cccaccgac acacaccac 1260
ggaccaccac cgcgcgcgc gccgcgcct ccgccgcgg tgggctactg ggagagccgc 1320

gtgcggaagc ctggcacccg aacgtccaaa gaaacccggt ccccgcgct gtcgccgccg	1380
ccgcaggccg ccagcttcaa gacgggtcta cccaccgacg cgttccccgg ccgcctcgcg	1440
gacaatgctg accacgcgcg cggcccgcg gccggcggcg gccgcgacaa gtcggaggag	1500
acgacgccg gccgaagct gaagccgctg cactgggaca aggtccgggc aagctccgac	1560
cgcgtcatgg tgtgggata gctcaaatcc agctcgttcc aggtgaatga ggagatgac	1620
gagacattgt tcattctcaa tccggcgaac tcggcgccac cgaaggagcc agcaacgagg	1680
aggccggtgc tgccgacgcc caagacggac aacaaggtgc ttgatccaaa gaagtcgcag	1740
aacatcgcca tcttgctgcg agctctgaat gtatccaagg agcaggtctg cgacgcgctc	1800
tgcgaaggta acacagagaa ctttggagca gaattgttgg agaccttgct aaagatggct	1860
cctaccaagg aagaggagat caaattgaga gaattcaaag aggagacatc tcctattaag	1920
cttggctctg ctgagaaatt ccttaaggca gtccttgata tccatttgc tttcaaaaga	1980
gtagacgcaa tgctttacat tgctaacttt gaatcagagg ttaattacct gaagaagtcc	2040
tttgagacc ttgagactgc ttgtgacgag cttagaaaca gcaggtgtt tctgaagcta	2100
cttgaagctg tctgaagac tggcaacagg atgaatgttg gaacaaatcg cggcgatgca	2160
cacgcgttca agcttgatac tctactcaaa ttggttgatg tcaaaggcac tgatggcaag	2220
actacacttt tgcattttgt cgtgcaggag attatccgaa cggagggtc ccacctctct	2280
gctagcaacc aatcaactcc acgaactcag gcaaaccctt tacgggacga gtcgagtgc	2340
aaaaagcttg gcctccaggt agtggtggc ctcggaacg agctcagcaa tgtcaagaag	2400
gcagctgcca tggactccga cgtgctaagc agctatgtct cgaaacttgc tggaggaata	2460
gagaagatca ctgaggtgtt gcggttgaat gaagaagtca agtccaggga agatgcatgg	2520
aggttccatg attcaatgca gaagttcttg aagagggtg atgacgacat catcagggtt	2580
caggctcagg agagcgttgc gctatcactt gtgaaggaga tcaccgagta cttccatggt	2640
gactctgcga aagaggaagc tcacctttc aggatcttca tgggtggtcag ggatttcctc	2700
tcagtcttg atcaagtctg caaggaagt ggaggatca atgaccgcac gatcgctagc	2760
tcggtgcgcc atttcccagt acccgtaac ccaatgatgc cacagttgtt cccaggatt	2820
catgctttga gagctggaat ctcatgatg gaaagttcag ccacttcagc atcatcacct	2880
tga	2883
<210> 2	
<211> 960	
<212> PRT	
<213> Oryza sativa	

<400> 2

Met Pro Ser Leu Arg Arg Phe Leu Glu Leu Val Val Val Gly Ile Val
1 5 10 15

Val Cys Gly Val Asn Gly Gly Ser Asp Gly Leu Glu Val Ala Val Ala
20 25 30

Arg Arg Gln Leu His Gln Pro Phe Phe Pro Asp Gln Ser Ser Ser Pro
35 40 45

Pro Thr Pro Ala Pro Pro Gly Pro Ala Pro Pro Phe Phe Pro Ala Leu
50 55 60

Pro Val Pro Pro Pro Pro Pro Ala Thr Ala Gly Gln Glu Gln Pro Thr
65 70 75 80

Tyr Pro Ala Leu Val Leu Pro Asn Thr Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala
85 90 95

Thr Ala Ala Pro Asp Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Arg Lys
100 105 110

Ser Lys Ser Ser Ala Ser Lys Leu Val Pro Ala Ile Val Leu Pro Leu
115 120 125

Leu Thr Val Ala Val Leu Gly Leu Ser Ile Ala Phe Phe Phe Thr His
130 135 140

Arg Arg Gly Asn Ala Ala Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Asp Ala Lys Phe Leu His Pro Glu Arg Ala Ser Leu Phe
165 170 175

Ala Arg Asp Glu Phe Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ala Ala Pro Pro Ala
180 185 190

Ala Ala Met Asp Tyr Arg Tyr Val Gly Asn Ala Gly Ile Gly Arg Met
195 200 205

Asp Glu Lys Ser Ser Glu Thr Thr Ser Ser Gly Asp Glu Ala Ser Arg
210 215 220

Ser Thr Gly Gly Ser Pro Glu Leu Arg Pro Leu Pro Pro Leu Leu Ala
225 230 235 240

Arg Gln Cys Gly Pro Met Gly Ala Arg Ser Pro Gly Ser Gly Val Gly
 245 250 255
 Gly Phe Ala Ser Pro Ser Ser Gly Asp Glu Glu Phe Tyr Ser Pro Gln
 260 265 270
 Gly Ser Ser Lys Met Ser Thr Ser His Arg Thr Leu Ala Ala Ala Val
 275 280 285
 Glu Ala Ala Val Ala Ala Arg Asp Arg Ser Lys Ser Pro Ser Pro Gly
 290 295 300

 Ser Ile Val Ser Thr Pro Ser Tyr Pro Ser Ser Pro Gly Ala Thr Met
 305 310 315 320
 Ser Pro Ala Pro Ala Ser Pro Pro Leu Phe Ser Ser Pro Gly Gln Ser
 325 330 335
 Gly Arg Arg Ser Val Lys Ser Arg Ser Asp Ser Val Arg Thr Phe Gly
 340 345 350
 Gln Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Phe Ala Pro Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Pro Pro Pro Pro Arg Arg Lys Pro Pro Ser Pro Ser Pro Pro Ser

 370 375 380
 Ser Pro Leu Ile Glu Asn Thr Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Thr Thr
 385 390 395 400
 Asp Thr Thr Ile Pro Arg Asn Pro Phe Val Gln Pro Pro Pro Pro Pro
 405 410 415
 Thr His Thr His Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 420 425 430
 Pro Val Gly Tyr Trp Glu Ser Arg Val Arg Lys Pro Gly Thr Gly Thr
 435 440 445

 Ser Lys Glu Thr Arg Ser Pro Ala Leu Ser Pro Pro Pro Gln Ala Ala
 450 455 460
 Ser Phe Lys Ser Gly Leu Pro Thr Asp Ala Phe Pro Gly Arg Leu Ala
 465 470 475 480
 Asp Asn Ala Asp His Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Asp
 485 490 495

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

740 745 750
 Arg Thr Glu Gly Ser His Leu Ser Ala Ser Asn Gln Ser Thr Pro Arg
 755 760 765
 Thr Gln Ala Asn Pro Leu Arg Asp Glu Leu Glu Cys Lys Lys Leu Gly
 770 775 780
 Leu Gln Val Val Ala Gly Leu Gly Asn Glu Leu Ser Asn Val Lys Lys
 785 790 795 800
 Ala Ala Ala Met Asp Ser Asp Val Leu Ser Ser Tyr Val Ser Lys Leu

805 810 815
 Ala Gly Gly Ile Glu Lys Ile Thr Glu Val Leu Arg Leu Asn Glu Glu
 820 825 830
 Val Lys Ser Arg Glu Asp Ala Trp Arg Phe His Asp Ser Met Gln Lys
 835 840 845
 Phe Leu Lys Arg Ala Asp Asp Asp Ile Ile Arg Val Gln Ala Gln Glu
 850 855 860
 Ser Val Ala Leu Ser Leu Val Lys Glu Ile Thr Glu Tyr Phe His Gly
 865 870 875 880

Asp Ser Ala Lys Glu Glu Ala His Pro Phe Arg Ile Phe Met Val Val
 885 890 895
 Arg Asp Phe Leu Ser Val Leu Asp Gln Val Cys Lys Glu Val Gly Arg
 900 905 910
 Ile Asn Asp Arg Thr Ile Ala Ser Ser Val Arg His Phe Pro Val Pro
 915 920 925
 Val Asn Pro Met Met Pro Gln Leu Phe Pro Arg Ile His Ala Leu Arg
 930 935 940
 Ala Gly Ile Ser Asp Asp Glu Ser Ser Ala Thr Ser Ala Ser Ser Pro

945 950 955 960
 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400>	3	
gcgaagcctg ctttttgat		19
<210>	4	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
cggagatttt tccctaaaac aa		22
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	5	
aaggggccct aatttatcta g		21
<210>	6	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	6	
tgtttacttt gttcttggac tg		22
<210>	7	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	7	
aatagaatta ctgatgaaac ctt		24
<210>	8	
<211>	18	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	8	
	gcccgttacc gcttatgt	18
<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	9	
	gacgaagatg aaggatggc	19
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	10	
	agcgctcgata ttgacgtag	19
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
	agatggtacc accatgtac	19
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
	tatagtactc tgatacgtac g	21
<210>	13	
<211>	18	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 gtcgtcgaaa cgcgcaac 18

<210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 gccccctaac gccctttg 18

<210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 atagaaggga tgggtaggg 19

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 cgttgtctct gatattgacg 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 tggcctacca catgttttac 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 ggaagaaaat caagtcggtg 20
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 tagagtctat atccatagca c 21

 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 agtccctttg aacaatctat c 21
 <210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 cgtcatgtgt actaccac 19
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22

taggtgagaa tgattggagg	20
<210> 23	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 23	
gaaaaaattg gtgaaagggt c	21
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 24	
ccaaggaact atgaaaagcc	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 25	
cgcaaaagaa aacacgctag	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 26	
tctaacggtt ctttcctcg	20
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 27
 tactcctaata caatcgggac 20
 <210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 28
 ttaagcagac caaggcagc 19

 <210> 29
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 29
 aacaacaccta gaacgggtg 19
 <210> 30
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 30
 gatcactgag ccgtttacg 19
 <210> 31
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 31
 ggatgatgca gtcaactgg 19

 <210> 32
 <211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 32
 cgacatccac tcgagctg 18
 <210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 33
 gtttgtattt cgtacgtatg c 21
 <210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 34
 gtatacatat acgtgtgtgt c 21

 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 35
 gcatgtcaat tcaactgcac 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 36
 gtgcatggtt tttgtgagac 20
 <210> 37

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 37
 acaagtctgg gatgtccag 19

<210> 38
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 38
 ggagtaactc aactctgcg 19

<210> 39
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 39
 cctctcgcaa agtgacttc 19

<210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 40
 tcgcttccca aattagatgg 20

<210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 41

tggtatatga gttacactct c	21
<210> 42	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 42	
accaaaccg gttcacatc	19
<210> 43	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 43	
atcgactgta gccatccag	19
<210> 44	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 44	
catttcgcac aacatgttcc	20
<210> 45	
<211> 4193	
<212> DNA	
<213> Oryza sativa	
<400> 45	
aagctgtatc caccacgacg acgtccactc ctcttcttcc tectctectc ctctctctct	60
cttcttttctc tctctctcgcg agatctgtgg cgtcactgac ctagcttggt cttgctagct	120
gctgctgctg cttcggcggt ggcggtgtgt gtggcaatgc cgtctctccg gcgattcttg	180
gagttgggtg tggttgggat tgttgtgtgt ggtgtcaatg gcgggagtga tggtttggag	240
gttgcggtgg cgaggaggca gctgcaccag ccgttcttcc cggatcagtc gtcgtcgccg	300
ccgacgccgg cgccgccggg ccccgctccg ccgttcttcc cggcgtgcc ggtgccgccg	360

ccgccgccgg cgacggcggg gcaggagcag ccgacgtacc ccgccctcgt gctgccaac	420
accggcgccg gtggcgcgcc ggcgacggcc gctccggatg gaggtgggtg tgggtgggt	480
ggggcgagga agtcgaagag cagcgctcg aagcttctcc cggcgattgt gctgccgtg	540
ctcacggtgg ccgtgctcgg gctgtccatc gcgttcttct tcacgcaccg gcgtgggaat	600
gcggcgcgcg ggggaggagg aggcggcggg tgcgtcgggt gcggggacgc caagtcttg	660
cacccggaga ggcgagcct cttcgcgcgc gacgagttcg gcgggagcgg cggcgccgcc	720
gcgccgccgg ccgcggcgat ggattaccgc tacgtgggga acgccggcat cggcgcgatg	780
gacgagaaga gcagcgagac gacgtcgtcg ggcgacgagg cgtcccgag caccggcgga	840
tcgccggagc tccgccgct gccgccgtg ctggcgcgcc aatgcgggcc gatggcgcg	900
aggagccccg gcagcgcggt cggcgggttc gcgtcgccgt cgtccggcga cgaggaattc	960
tactcgccg aaggatcacc caagatgtcg acctcgaca gaacgctcgc cgcccggtc	1020
gaagcgctg tggccgcgcg cgaccgctcc aagagcccct cgcccggtc gatcgtgagc	1080
acgcgtcgt accgctctc gcccggcgcg acgatgtccc cggcgcccgc ctcgccgct	1140
ctcttctcca gcccggcca gtcgggcgcg cgtccgtca agtcaagatc cgatagcgtg	1200
cgcaccttcg gccaaccacc ggcgctcca ccaccctc ccttcgcgc gacgtgcca	1260
ccgcgcctc cgcctcgccg gaaaccgcg tcgcatcac cgcctctc cccactcacc	1320
gagaacacgt cggcgctcag atccaccacc accaccgaca ccaccatccc aagaaacca	1380
ttcgtacaac caccacccc accgacacac acccaggac caccaccgc gcccgcccg	1440
ccgctcgc cgccggtggg ctactgggag agccgctgc ggaagcctgg caccggaacg	1500
tcaaagaaa ccggtcccc ggcgctgtcg ccgccgcgc aggcgccag cttcaagagc	1560
ggtctacca ccgacgctt ccccgccgc ctcgcgaca atgcggacca cgcgcgcc	1620
gccgcggccg gcggcgccg cgacaagtgc gaggagacga cgcgcggcc gaagctgaag	1680
ccgtgcact gggacaaggt ccgggcaagc tccgaccgc tcatggtgtg ggatcagctc	1740
aatccagct cgttcagtg agaactccac ccaaatccac aacctatc agttcttgat	1800
ctgttttct tttgtctaa atcattttgt ggtgaattct ttgcagggtg aatgaggaga	1860
tgatcgagac attgttacc tgcaatccgg cgaactcggc gccaccgaag gagccagcaa	1920
cgaggaggcc ggtgctgcc acgccaaga cggacaacaa ggtgcttgat ccaaagaagt	1980
cgcagaacat cgccatcttg ctgcgagctc tgaatgtatc caaggagcag gtctgcgacg	2040
cgctctgcga aggtgaagaa catgatcttt ctcttaactt actcatcaca attttgccag	2100
tttctgatga actgcatact gcattgagtt ggggatTTTT ttgagatgt tgcagcagta	2160
tctgaattga tgatacttc taactaattg gattcatttt tctcgtggtt cttggttgaa	2220

cacacatgga gcttgtgaat cgagatgttt gtccgtagaa tttggttggg ctttaaatac	2280
attgtctgaa gaagtgaatg ccagcataca cccgttgggtg gtcgttgctg aatttagccg	2340
tttttaagct gaaactgact agtaattgct tctggatgac tgaattaggt gcatagagtt	2400
atacttgcgg tgaagatggt tagagatacc attgttctga tgtgaaaacc agtctttcga	2460
tctactagta ttactaccgt agttgcttga tatagtatta ctacttctct gcacatagtc	2520
ttgacttggg tgcaataaat tgcaagatag ttgcattatt gcaccaagtt tctagtcaag	2580
tcaatgagat tgatccttcc tatagtatta tccttactaa cgtggtagca attcactgag	2640
caggtaacac agagaacttt ggagcagaat tgttggagac cttgctaaag atggctccta	2700
ccaaggaaga ggagatcaaa ttgagagaat tcaaagagga gacatctcct attaagcttg	2760
gtcctgctga gaaattcctt aaggcagtc ttagatatccc atttgctttc aaaagagtag	2820
acgcaatgct ttacattgct aactttgaat cagaggttaa ttacctgaag aagtcctttg	2880
agacccttga ggtgagaatt atcgtttccg agtttctttt catacttatt attatatga	2940
catcttacct ataactaagt acatgaaact ttctttaaca gactgcttgt gacgagctta	3000
gaaacagcag gctgtttctg aagctacttg aagctgtcct gaagactggc aacaggatga	3060
atgttgaac aaatcgcggc gatgcacacg cgttcaagct tgatactcta ctcaaattgg	3120
ttgatgtcaa aggcactgat ggcaagacta cacttttgca ttttgcgtg caggagatta	3180
tccgaacgga gggctccac ctctctgcta gcaaccaatc aactccacga actcaggcaa	3240
accctttacg ggacgagctc gactgcaaaa agcttggcct ccaggtagtg gctggcctcg	3300
gaaacgagct cagcaatgct aagaaggcag ctgccatgga ctccgacgtg ctaagcagct	3360
atgtctcgaa acttgctgga ggaatagaga agatcactga ggtgttgcgg ttgaatgaag	3420
aagtcaagtc cagggaagat gcatggaggt tccatgattc aatgcagaag ttcttgaaga	3480
gggctgatga cgacatcatc agggttcagg ctgaggagag cgttgcgcta tcacttgtga	3540
aggagatcac cgagtacttc catggtgact ctgcgaaaga ggaagctcac ctttcagga	3600
tcttcatggt ggtcagggat ttctctcag ttcttgatca agtctgcaag gaagttggca	3660
ggatcaatga ccgcacgac gctagctcgg tgcgccatct cccagtaccc gtcaacccaa	3720
tgatgccaca gttgttcccc aggattcatg ctttgagagc tggaatctca gatgatgaaa	3780
gttcagccac ttcagcatca tcaccttgat caccagtagt ctgccaatag aaatttttcg	3840
cagagtactg tgggaaacct ccatagggca gagggagacc aacggcgacg ggggtgtcaaa	3900
tttttttttg aaccttttgt acctgtagat tatagaatgt aagaagtttt ttgcaaata	3960

tttatttcta tatataagag gagataaaat ctagatcaga ggaggaaata agcagttcat	4020
gtgtttgtca tcttcagtct gtacatgaca cgaggtagtg aaacagcctg tacaatgtac	4080
taacaatttc aagtatggcc agtctgcaga attcaaaggt aagctgaact cagatgtact	4140
tggaacagaa aacaaaatac attgaatcct agtgctggac tgctggtggt gcc	4193