(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년12월21일
(11) 등록번호 10-0787999
(24) 등록일자 2007년12월14일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0126720
(22) 출원일자 2006년12월13일
심사청구일자 2006년12월13일
(56) 선행기술조사문헌
한국공개특허공보 제2003-70755호
한국공개특허공보 제2002-76719호

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
조형택
대전 유성구 가정동 KIT 교수아파트 15-102
최상봉
경기 성남시 분당구 수내동 77, 푸른마을쌍용아파트 605-403
(74) 대리인
김원준

전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 김기연

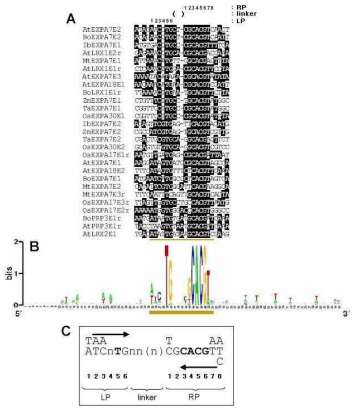
(54) 근모-특이적 유전자 발현 촉진인자 및 이를 이용한 뿌리형질의 개선 방법

(57) 요 약

본 발명은 식물의 근모-특이적 유전자 발현 촉진인자(RHE, Root Hair cis-Element)에 관한 것이다.

본 발명은, (A) 6개의 염기로 이루어진 좌측부(LP) 서열 및 8개의 염기로 이루어진 우측부(RP) 서열, 상기 좌측부(LP) 서열과 우측부(RP) 서열을 연결하는 2 내지 3개의 염기로 이루어진 링커 서열로 구성되며; (B) 좌측부(LP) 서열의 5번째 염기가 T, 우측부(RP) 서열의 3 내지 6번째 염기가 CACG인 근모-특이적 유전자 발현 촉진인자(RHE) 및 이를 내재하는 프로모터 및 유전자, 상기 촉진인자를 이용하여 비 근모 유전자나 외래 유전자를 식물체 뿌리(근모)에서만 발현되도록 하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도8a



특허청구의 범위

청구항 1

(A) 6개의 염기로 이루어진 좌측부(LP) 서열 및 8개의 염기로 이루어진 우측부(RP) 서열, 상기 좌측부(LP) 서열과 우측부(RP) 서열을 연결하는 2 내지 3개의 염기로 이루어진 링커 서열로 구성되며;

(B) 좌측부(LP) 서열의 5번째 염기가 T, 우측부(RP) 서열의 3 내지 6번째 염기가 CACG;

인 것을 특징으로 하는 피자식물 범용의 근모-특이적 유전자 발현 촉진인자(RHE; Root Hair cis-Element).

청구항 2

제 1 항에 있어서,

좌측부(LP) 서열의 6번째 염기 및 우측부(RP) 서열의 2번째 염기가 G인 것을 특징으로 하는 근모-특이적 유전자 발현 촉진인자.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

좌측부(LP) 서열의 1번째 염기가 A 또는 T, 2번째 염기가 T 또는 A, 3번째 염기가 C 또는 A 또는 G이고;

우측부(RP) 서열의 1번째 염기가 C 또는 T 또는 G, 7번째 염기가 T 또는 A, 8번째 염기가 T 또는 A 또는 C;

인 것을 특징으로 하는 근모-특이적 유전자 발현 촉진인자.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 의한 촉진인자를 내재하는 식물체 형질전환용 플라스미드.

청구항 6

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<23> 본 발명은 근모-특이적 유전자 발현 촉진인자(RHE), 이를 내재하는 프로모터 및 유전자 및 상기 촉진인자를 이용하여 비 근모 유전자나 외래 유전자를 식물체 뿌리(근모)에서만 발현되도록 하는 방법에 관한 것이다.

<24> 근모는 뿌리 표피세포가 관상(tubular)으로 외연생장(outgrowth)한 것이다. 근모는 뿌리 표면적의 대부분을 이루기 때문에 흡수와 부착, 토양 미생물 상호작용 등 주요한 뿌리 기능에 기여하는 것으로 여겨진다(Grierson and Schiefelbein, 2002 and reviews in it).

<25> 근모세포와 비근모세포의 운명-결정 및 근모 분포 패턴은 애기장대를 대상으로 활발히 연구되었다. 애기장대에서는 하나의 피층세포 위(N 세포 위치)에 비근모세포가 위치함에 반하여 두 개의 하부 피층세포 위(H 세포 위치)에 근모세포가 위치하고 있다. 이러한 위치-의존적 근모세포의 발생으로 근모세포가 뿌리의 축을 길이방향으로 열을 이루게 되는데, 이러한 패턴은 배추과(科)를 포함한 다른 진정 쌍자엽류 식물에서 발견된다(Cormack, 1947; Clowes, 2000; Dolan and Costa, 2001). 이러한 줄무늬 형상의 패턴을 유형 3의 근모세포 분포패턴이라 한다(Leavitt, 1904; Cormack, 1937 and 1947; Cutter and Feldmann, 1970; Cutter and Hung, 1972; Dolan, 1996; Clowes, 2000; Dolan and Costa, 2001; 도 1a) 도 1a에서 유형 2 및 유형 3에서 진하게

염색되는 근원모세포를 진하게 표시하였다. 작은 원은 근모를 나타낸다.

<26> 유형 1에서는 임의의 표피세포에서 근모세포가 분화될 수 있다. 대부분의 쌍자엽 식물, 많은 단자엽 식물, 대부분의 양치류는 유형 1에 속한다.

<27> 유형 2에서 뿌리 표피는 뿌리의 길이 방향으로 장형과 단형의 두 종류 크기의 세포로 구성되며, 단형세포만이 근모세포로 분화된다. 이러한 유형 2는 하등 양치류, 단자엽 식물 및 하등 피자식물 과(family)에서 볼 수 있다(도 1b). 도면에서 유형 2를 포함한 분류군(目, order)은 적색으로, 유형 3을 포함하는 분류군은 청색으로 표시하였다. 유관속 식물의 계통발생수는 Judd 등(1999)의 것을 수정하여 사용하였다. 분류군의 근모 분포 유형은 Clowes(2000)의 연구를 참조하였다.

<28> 이들 기본패턴 이외에도 피층에서 유래하는 근모유형(Pinkerton, 1936), H 세포에서는 긴 근모가, N 세포에서는 짧은 근모가 발생하는 유형 3의 변형(Tsai et al., 2003) 등이 알려져 있다.

<29> 근모 분포 패턴의 차이는 패턴 유형들 사이에 상이한 세포 운명-결정 시스템이 작동됨을 나타낸다. 애기장대의 근모세포를 레이저로 제거하고 H 위치에 인접한 비근모세포를 이동시키면 그 비근모세포가 근모를 분화시키는데(Berger et al., 1998), 이는 세포의 위치가 유형 3의 운명을 결정함을 보여준다. 유형 3의 운명-결정을 뒷받침하는 전사조절 네트워크가 애기장대에서 밝혀졌다. 간단히 말하자면, GLABRA2 (GL2, homoeodomain 전사인자의 일종)의 발현은 MYB/bHLH/WD40 복합체(Schiefelbein and Lee, 2006 참조) 또는 위치-의존적 방식에서의 염색질 리모델링(Costa and Shaw, 2006)에 의해 조절된다. GL2는 N 위치에서 근모의 분화에 필요한 유전자를 억제한다(Ohashi et al., 2003).

<30> 위치-의존적인 유형 3과는 달리, 유형 2 패턴은 비대칭 세포분열에 의존한다. 유형 2 뿌리에서 근모 형성세포(trichoblast)는 표피 줄기세포의 비대칭 횡분열에서 유래된다(Cormack, 1944; Clowes, 2000). 분열된 두 딸세포 중 단형세포가 세포질이 매우 풍부하고 염색이 잘되는 근모 형성세포로 된다. 비대칭 분열은, 세균, 이스트, 선충, 곤충 및 식물(Scheres and Benfey, 1999; Betschinger and Knoblich, 2004 Haecker et al., 2004) 등 다양한 생명체에서 발견되는 것처럼 세포 운명-결정인자를 불균일하게 분포시키는 것일 수 있다. 유형 1은 유형 2나 유형 3의 조상형이거나 퇴화형일 수 있다(Dolan and Costa, 2001).

<31> 애기장대에서 *AtPRP3* (proline-풍부 단백질 유전자; Bernhardt and Tierney, 2000), *AtLRX1*과 *AtLRX2* (leucine-풍부 extensin 유전자; Baumberger et al., 2001, 2003), 및 *AtEXPA7*과 *AtEXPA18* (expansin 유전자; Cho and Cosgrove, 2002) 등 근모세포-특이적 유전자들이 발견되었다. 이들 유전자는 근모세포 분화에서 거의 동일한 시공간(spatio-temporal) 발현 패턴을 보이며, 근모 형태형성 과정에서 세포벽 구성에 변화를 유도하는 것으로 생각된다. 유형 3인 애기장대에서 이들 하류(downstream) 유전자는 상류(upstream)에 위치하는 운명-결정인자와 다른 요인에 의해 조절된다(Bernhardt and Tierney, 2000; Cho and Cosgrove, 2002).

<32> 근모는 모든 유관속 식물에 존재하고 근모 발달과정에서 종의 차이에 관계없이 동일한 세포행동을 보여주는데(Peterson and Farquhar, 1996; Ridge and Emons, 2000), 이는 근모-특이적 유전자들이 식물체에서 기능적으로 보존되어 있음을 암시한다.

<33> 본 발명은 상이한 근모 분포패턴의 근모-특이적 유전자들이 독립적으로 조절되는 것인지 아니면 수렴된 조절경로로 조절되는 것인지(달리 말해, 상이한 *cis*- 및 *trans*-인자들에 의해 조절되는 것인지 동일한 *cis*- 및 trans-인자들에 의해 조절되는 것인지)에 관한 의문에 기초하여 이루어졌다. 이를 위하여 다음의 사항이 연구되었다: (1) 상이한 근모 분포 유형을 가지고 있는 종 사이에 근모-특이적 유전자의 ortholog들이 존재하는가 (2) 이 ortholog 유전자들이 근모-특이적인가 (3) 이들이 근모-특이적이라면 이들의 프로모터는 근모 특이성에 대해 공통의 *cis*-인자를 가지는가 아니면 유형에 따라 다른 *cis*-인자를 가지는가 (4) 이 유전자들이 근모 특이성에 대해 공통의 *cis*-인자를 가진다면 이 *cis*-인자는 근모 패턴 유형 사이에서 기능적으로 호환가능한가.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<34> 전사 수준(transcriptional level)에서의 유전자 조절 연구를 위해서는 *cis*-조절인자들, *trans*-작동요소들 및 전사조절에서의 이들 사이의 상호작용이 명확히 밝혀져야 한다. 이러한 연구를 위해서는 전사개시위치에서 다양한 거리에 있는 비-암호화 DNA 영역에 위치하는 기능적 *cis*-조절 서열의 식별이 전제되어야 한다. *cis*-인자는 유전자가 언제, 어디에서 어느 정도 발현되어야 하는 지를 조절하는 궁극적인 정보를 제공한다. 프로모터 전체 부이에 대한 적지 않은 실험적 연구와 컴퓨터 프로그램을 이용한 수많은 *cis*-조절 서열에 대한 예측은 있지만, 동물 또는 식물에서 명쾌하게 특징이 밝혀진 *cis*-조절인자들(특히 진화적 맥락의 인자들)의 예는 매우 적

다(Berman et al., 2004; Kellogg, 2004).

<35> 본 발명에서는 ① 다양한 피자식물 종의 근모-특이적 프로모터를 실험적으로 분석하였고, ② 생체 내에서 고해상도로 근모-특이적 *cis*-인자(RHE)의 서열 및 특징을 밝혔으며, ③ 피자식물에 거쳐서 RHE들이 구조적/기능적으로 보존되어 있음을 확인하였다.

<36> 이러한 과정을 통하여 완성된 본 발명은, 근모-특이적 유전자 발현 촉진인자(RHE)를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<37> 본 발명은 상기 촉진인자를 내재하는 프로모터 및 유전자를 예측, 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

<38> 본 발명은 상기 촉진인자를 이용하여 비 근모-특이적 유전자나 외래 유전자를 식물체 뿌리(근모)에서만 발현되도록 하는 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

<39> 전술한 바와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명은, (A) 6개의 염기로 이루어진 좌측부(LP) 서열 및 8개의 염기로 이루어진 우측부(RP) 서열, 상기 좌측부(LP) 서열과 우측부(RP) 서열을 연결하는 2 내지 3개의 염기로 이루어진 링커 서열로 구성되며; (B) 좌측부(LP) 서열의 5번째 염기가 T, 우측부(RP) 서열의 3 내지 6번째 염기가 CACG인 것을 특징으로 하는 피자식물 범용의 근모-특이적 유전자 발현 촉진인자(RHE; Root Hair cis-Element)에 관한 것이다.

<40> 본 발명에서 좌측부(LP) 서열의 6번째 염기 및 우측부(RP) 서열의 2번째 염기가 G인 것이 바람직하다. 또한 좌측부(LP) 서열의 1 내지 3번째 염기가 (A/T)(T/A)(C/A)이고, 우측부(RP) 서열의 1번째 염기가 (C/T), 7 내지 8번째 염기가 (T/A)(T/A/C)인 것이 좋다. 여기서 '/'는 '또는'을 의미한다.

<41> 실시예에서 확인되듯이, RHE(**R**oot **H**air **E**lement; *cis*-인자)들은 단순히 종 간에 보존되어 있을 뿐 아니라, 다양한 상류의 조절 기작(다양한 근모 분포패턴 결정 기작)에도 불구하고 피자식물에서 기능적으로 보존되어 왔다. 본 발명에서, 근모 특이적 유전자 발현촉진인자인 RHE의 피자식물에서의 보편적 적용가능성은 이러한 사실의 발견에 기초한 것이다.

<42> 또한 본 발명은, 상기 촉진인자를 내재하는 근모-특이적 재조합 프로모터 및 식물체 형질전환용 플라스미드에 관한 것이다. 이를 뒷받침하기 위하여 본 발명의 실시예에서는 식물체용 플라스미드로 널리 알려진 pMP90와 pGPTV-HYG 벡터(Becker et al., 1992)를 이용하였는데, 동일한 촉진인자를 다른 플라스미드에 적용할 수 있음은 당업계에서 용이한 일이다.

<43> 또한 본 발명은, (A) 상기 촉진인자를 식물체용 플라스미드에 삽입하는 단계; (B) 상기 플라스미드에 비 근모-특이적 유전자 또는 외래 유전자를 삽입하는 단계; (C) 단계 (A)와 (B)를 거친 플라스미드를 식물체 배발생 캘러스에 도입하는 단계; (D) 배발생 캘러스를 분화시켜 발생한 식물체군에서 상기 유전자가 근모세포에서 발현되는 형질전환 식물체를 선별하는 단계;로 이루어지는 비 근모 유전자 또는 외래 유전자가 근모-특이적으로 발현되도록 형질전환된 식물체의 제조방법에 관한 것이다. 이는 특정 식물체의 다른 조직에서는 발현되지만 근모세포 또는 뿌리세포에서는 발현되지 않는 유전자나, 특정 식물체에는 존재하지 않는 유전자를 근모-특이적으로 발현되도록 형질전환하는 방법이다. 본 발명의 실시예에서는 모델 케이스로서 상기 촉진인자와 GFP(green fluorescent protein 유전자)를 pMP90 및 pGPTV-HYG 벡터에 도입한 다음 식물체를 형질전환하였다. 그 결과 형질전환된 식물체의 근모세포 및 근모에서만 녹색형광이 관찰된 바, 다른 벡터 시스템과 다른 유전자를 이용하여 근모-특이적으로 유전자가 발현되도록 하는 것이 가능함은 명백하다.

<44> 이하 본 발명에 의한 RHE의 특징을 내용별로 설명한다.

<45> 많은 유전체 데이터의 축적과 컴퓨터 등 계산장치의 발달에 따라 ortholog(현재 서로 다른 생물 종에 존재하지만 그 공통 조상에서는 동일했던 유전자들, 즉 현재 서로 다른 종에서 구조와 기능이 유사한 유전자들 또는 이들의 관계) 또는 paralog(한 생물 종에서 유전자의 중복 복제를 통해 형성된 구조와 기능 상 유사한 유전자들 또는 이들의 관계) 유전자들로부터 보존적인 비암호화 조절인자(regulatory non-coding 인자)들을 예측할 수 있게 되었다(Gumucio et al., 1992; Jareborg et al., 1999; Wasserman et al., 2000; Kaplinsky et al., 2002; Guo and Moose, 2003; Hong et al., 2003; Inada et al.,2003; Berman et al., 2004; Haberer et al., 2004). 그러나 이러한 계산에 의한 예측은 반드시 실험적 증명이 뒷받침되어야 하는데, 식물체에 있어서 이를 위한 실험적 분석이 매우 부족한 것이 현실이다(Kellogg, 2004).

<46> 본 발명에서는 다음을 수행하였다. (1) 상이한 근모 분포패턴의 피자식물 종으로부터 *AtEXPA7*의 ortholog 유전자들 및 paralog 유전자들을 발견하고 분석하였다. (2) 근모-특이적 *cis*-인자를 기능적으로 정의하였다. (3) 이 공통 *cis*-인자가 상이한 분포 패턴의 뿌리 유전자들을 근모세포-특이적으로 발현되도록 유도하는 능력이 있음을 확인하였다.

<47> 이러한 결과는 피자식물에서 상류의 운명-결정 기작의 다양성(divergence)에도 불구하고 근모 특이성에 대한 유전자 조절모듈(*cis*- 및 *trans*-인자들)이 보존적임을 나타낸다.

<48> 이렇게 추출된 본 발명에 의한 RHE는 다음과 같은 특성을 갖는다.

<49> **(1) RHE들은 구성적(syntactic) 특징에 따라 두 하위그룹으로 분류된다.**

<50> RHE 핵심부위는 연결부위를 사이에 둔 RP와 LP의 두 부분으로 이루어져 있다(도 8a에서 C). LP와 RP 사이의 연결부위의 길이는 2- 또는 3-염기인데, 본 발명에서는 이들 각각을 2-염기 링커 및 3-염기 링커라 칭한다.

<51> 모든 RHE들에서 RP가 특징적인 'CACG' 모티프를 가진 반면, LP는 덜 보존적이다(도 8a). 도면에서 볼 수 있듯이, 2-링커 RHE에서 3번과 링커의 1번 위치는 C가 지배적인데 특히 3번은 매우 보존적임에 반하여, 3-링커 RHE에서는 3번과 링커의 1번 위치에서 C가 매우 드물게 나타났다. 대조적으로 3-링커 RHE에서 4번 위치는 G가 우세한데, 2-링커 RHE의 경우 벼과의 RHE2와 봉선화*EXPA7* ortholog에서만 나타난다.

<52> 그러나 RHE들을 2-염기 링커 RHE와 3-염기 링커 RHE로 구분하면 두 하위그룹사이에 상이한 보존 패턴이 관찰된다(도 8b). 도 8b는 LP와 RP 사이의 염기(링커) 길이에 따라 두 종류의 RHE로 구별됨을 보여주는 도표이다. RHE 이름 좌측에 링커 길이를 표시하였다. LP는 2-염기 링커 RHE들 보다 3-염기 링커 RHE들에서 RP에 비해 더 보존적이며 더 회문구조적(palindromic)이다. LP와 RP의 사이의 회문구조적 염기위치는 같은 색으로 발현하였다.

<53> 도 8b에서 볼 수 있듯이, LP와 RP는 약한 역위반복 관계(회문구조)이다. 2- 및 3-링커 RHE 하위그룹 사이에서 LP가 편향적으로 보존되어 있기 때문에 2-링커 RHE 하위그룹에서 회문구조가 더 잘 형성된 것으로 나타난다. 60%의 2-링커 RHE에서 6개 위치의 단일반복단위(a single repeat unit) 중 4개 위치 이상이 회문구조적임에 반하여, 대부분의 3-링커 RHE에서 회문구조를 가진 위치는 3 군데 이하였다.

<54> 많은 경우 하나의 프로모터에 2- 및 3-링커 RHE들이 동시에 나타나며(도 5) 여러 분석에서 볼 수 있듯이 이들은 기능적으로 동일한 근모 특이성을 보인다(도 2b, 2c, 2d, 2e, 2g, 2h 및 4). 도 2b에서 도표 내 사진은 *-134:GFP* 뿌리의 형광 이미지. "Cont"는, 대조구 P_{m35S}*:GFP* 형질전환체의 프로모터 활성도이며, 에러 바(error bars)는 표준오차를 나타낸다(이하 동일). 그러나 2-링커 RHE에서의 1-염기 삽입이나 3-링커 RHE의 1-염기 결실은 프로모터 활성을 대폭 감소시켰다(도 9에서 A 및 B). 이러한 사실은 LP와 RP 사이의 링커의 유연성(flexibility)이 각 RHE 하위그룹의 구성적 맥락에서 이해되어야 함을 의미하는 것이다. 가운데 연결부위(링커)를 지닌 두 개의 반복된 *cis*-인자 사이에서는 서로 다른 연결부위의 길이에 따라 전사인자들이 다양한 조합으로 이량화(dimerization)하도록 할 수도 있다(Latchman, 2004). 동일한 전사인자 군(a transcription factor family)에 포함된 구조적 유사성을 지닌 근모특이적 전사조절인자(RHF; Root Hair Factor)들이 RHE의 이러한 미세한 구조적 차이를 구별하는 것일 수도 있다.

<55> *AtEXPA7*, *AtEXPA18* 및 *AtPRP3* 프로모터의 RHE들은 근모 특이성에 대해서 뿐만 아니라 호르몬이나 환경적 자극에 대한 반응에도 관여한다(Bernhardt and Tierney, 2000; Cho and Cosgrove, 2002). 호르몬 또는 환경적 자극은 궁극적으로 이들 유전자의 근모-특이적 발현을 유도한다. 이러한 자극-매개 신호전달경로는 또한 RHF-매개 근모 유전자 발현을 조절하는 것일 수도 있다.

<56> **(2) RHE-함유 근모 유전자는 근모 형태형성을 매개하는 하류(downstream) 유전자인 것으로 판단된다.**

<57> 현재까지 식별된 근모-특이적 유전자들은 expansin, leucine-풍부 extensin (LRXs) 및 proline-풍부 단백질 등 세포벽 관련 단백질들을 코딩한다. 셀룰로오스 합성효소-유사 단백질을 코딩하는 *AtCSLD3* (*KOJAK*)은 근모세포 특이적은 아니지만 근모세포에서 지배적으로 발현된다(Favery et al., 2001). 몇몇 결정적이지 않은 위치에서 RHE 핵심부위서열과 상응하지는 않지만 AtEXPA7E1의 1-염기 치환(도 2e) 결과와 비교했을 때 이러한 *AtCSLD3* 프로모터의 RHE는 여전히 기능적이라고 할 수 있다. 근모 형태발생 과정은, 필연적으로 활발한 세포벽의 변형, 합성 및 조립이 동반되는 근모 출현(또는 돌출)과 말단 생장으로 이루어진다(Grierson and Schiefelbein, 2002). 상기 세포벽 단백질들은 근모 발달과정에서 세포벽의 역동성을 대변한다: 세포벽을 이완시키는 expansin들(Balupska et al., 2000; Cho and Cosgrove, 2002), 세포벽을 합성하는 CSLD3(Favery et al.,

2001), 세포벽을 조립하는 LRX들(Baumberger et al., 2003), PRP들(Bernhardt and Tierney, 2000). 근모 발달이 효율적으로 이루어지기 위해서는 이들 세포벽 유전자들의 조화된 조절이 필요할 것이다. 이들 모든 RHE-함유 프로모터들은 근모 출현에서부터 말단 생장 시기 동안 활성화되어 있는데(Bernhardt and Tierney, 2000; Baumberger et al., 2003; Cho and Cosgrove, 2002), 이러한 사실은 이들 프로모터가 제어하는 유전자들이 근모 발달을 위해 필요한 도구임을 암시한다.

<58> **(3) RHE는 다양한 근모 분포패턴을 지닌 피자식물에서 기능적으로 보존되어 왔다.**

<59> 근모는 유관속 식물 계통에서 4억년 동안 기본적인 세포 구조로서 육상식물이 성공적으로 적응하는데 중요한 역할을 하였다(Peterson, 1992). 본 발명에서 벼과와 진정 쌍자엽 식물 양쪽의 ortholog 유전자들에서 RHE가 기능적으로 보존되었음을 확인하였다. 이러한 데이터는 RHE가 피자식물의 출현보다 먼저 나타났음을 말해주는 것(1억7천만년~2억3천5백만년 전, Yang et al., 1999)으로서, 벼과식물에서의 9×10^{-10}[(비동의적 염기치환수)/(염기수)/(년)]의 비율을 채택하여 계산된 RHE-함유 *OsEXPA17*의 분기기간(~2억7천만년 전)과 일치한다(Gaut, 1998; Muse, 2000). 이러한 사실들은 진화상 RHE에 대한 강한 기능적 요구가 있음을 암시한다. 유형 2 근모 분포가 *Lycopodium*과 *Selaginella*와 같은 가장 원시적인 유관속 식물에서 발견되므로(Dolan, 1996; 도 1b) 이들에서도 RHE가 근모 특이성을 부여하는 조절요소로 작동할 지 여부가 주목될 것이다.

<60> Leavitt이 1904년 두 종류의 상이한 근모 분포 유형을 구분한 이래로 현재까지 유관속 식물에서 세 종류의 기본적 유형이 확인되고 있다(Cormack, 1935 and 1947; Dolan and Costa, 2001). 세 종류 패턴 유형에 대한 세포 수준에서의 운명-결정 기작이 잘 정의되어 있다: 유형 1은 특별한 근원모세포(trichoblast)가 없어서 무규칙 분포를 보이고, 유형 2는 비대칭 세포분열에 의해 형성되고, 유형 3은 세포위치 의존적이다(Dolan and Costa, 2001).

<61> 유형 3 운명 결정에서의 전사조절은 MYBs(WEREWOLF, CAPRICE), bHLHs (GLABRA3/ENHANCER OF GL3) 및 하나의 WD40 단백질(TRANSPARENT TESTA GLABRA) 사이의 상호작용 결과이다(Grierson and Schiefelbein, 2002; Schiefelbein, 2003; Schiefelbein and Lee, 2006). 뿌리 상피세포 발달 초기에 이들 요소들은 근모세포(H)와 비-근모세포(N) 모두에서 활성이 있다. 그러나 발달 후기에 N 위치 세포는 H 위치 세포 내의 이들 요소들의 상호작용을 일방적으로 방해하고, 이러한 방해는 H 위치 세포의 근모 형태발생의 억제를 해소시킨다.

<62> 이러한 활성변화는 하부 피층세포로부터의 위치적 단서(positional cue)에 의해 이루어지는데, 피층세포에는 단서(cue)를 촉발하고 매개하는 것으로 보이는 수용체-유사 키나제(kinase)인 SCRAMBLED (SCM)이 존재한다(Kwak et al., 2005). 또 다른 증거는 유형 3 패턴에서 위치-의존적 염색사의 재조직화(reorganization)를 암시한다(Costa and Shaw, 2006).

<63> 비대칭 세포분열을 매개하는 유형 2 운명 결정인자들도 연구될 필요가 있다. 동물계에서 잘 밝혀진 예들이 있지만, 식물세포에서 비대칭 세포분열 기작은 거의 알려져 있지 않다. 그러나 불균등 세포분열은 궁극적으로 두 딸세포 사이의 운명 결정인자들의 비대칭 분포를 초래한다(Scheres and Benfey, 1999; Betschinger and Knoblich, 2004). 동물세포에서 비대칭 세포분열 기작은 상이한 종과 세포유형에서 보존적이지만 운명 결정인자들은 보존적이지 아니한 사실(Betschinger and Knoblich, 2004)로 보아, 비대칭성을 이루기 위해서 상이한 세포 유형은 상이한 운명 결정인자 세트를 필요로 하는 것으로 판단된다. 알려진 운명 결정인자들은 전사 조절인자에서 단백질-분해 성분에 이르기까지 다양하다(Betschinger and Knoblich, 2004).

<64> 유형 3 근모 패턴은 진정쌍자엽식물에서만 발견되고, 유형 2 패턴, 및 단자엽식물, 원시 피자식물 및 원시 유관속식물에만 있다(Dolan, 1996; Clowes, 2000); 도 1b 참조). 유형 2 및 유형 3 패턴의 계통발생상의 분리는, 유형 3 운명결정 기작이 진정쌍자엽식물과 함께 진화하였고, 유형 2 기작이 더 원시적임을 시사한다. 무규칙형인 유형 1 패턴이 유관속 식물의 모든 분류군에서 나타나고, 심지어 유형 2 혹은 유형 3 패턴이 나타나는 과(family)나 종(예를 들면 *Soleirolia soleirolii*)안에서 발견되기도 한다(Clowes, 2000). 이러한 관찰은, 다른 패턴의 기작이 불활성화하여 유형 1 패턴이 된 것임을 강하게 시사한다. 예를 들면, SCM의 불활성화는 유형 3 애기장대 근모 분포를 무규칙형인 유형 1 패턴으로 변환시킨다(Kwak, 2005). 그러나 유형 1이 원시형 패턴일 가능성도 배제할 수 없다.

<65> 본 발명에서, 상이한 상류 운명-결정 경로에도 불구하고, 근모 형태 형성을 위한 하류 전사 모듈은 보존되어 왔음을 확인하였다. 많은 근모에 특이적 유전자에서 구조적/기능적으로 보존된 RHE는, RHF ortholog가 상이한 근모-분포 유형에서도 RHE에 공통적으로 작용하는 것을 강하게 시사한다. 따라서 상이한 근모 패턴으로부터의 RHE 및 RHF는 다양화된 상류 운명-결정인자에 의해 활성화된 상이한 신호경로에 상호작용하도록 진화되어 왔을

것이다. RHE의 기능적 보존성 및 상이한 근모 유형을 가진 종 내의 RHE-함유 *EXPA*들의 ortholog한 관계는, RHE-RHF 모듈이 운명-결정 기작의 분화에 앞서 출현하였다는 가설을 입증한다. 이 가설은 현존하는 세 종류의 근모 패턴에서 상이한 상류 조절자들의 출현이 RHE-RHF 모듈에 대한 새로운 조절 네트워크를 생성할 수도 있었음을 시사한다(도 10).

<66> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 범위를 축소하거나 변경하는 것은 아니다.

<67> **실시예 : 실험방법 및 결과**

<68> **<실험방법>**

<69> **(1) 식물재료 및 생장조건**

<70> *프로모터:GFP* 구축물(construct)의 형질전환 및 근모-특이적 GFP 발현의 관찰을 위해 애기장대(*Arabidopsis thaliana*, 콜롬비아 생태형) 및 벼(*Oryza sativa* CV.Hwa Young; 자포니카 종류)를 이용하였다. *Atlrx1* 변이체(SALK_057038)는 애기장대 Biological Resource Center(http://www.arabidopsis.org/)에서 입수하였다.

<71> 애기장대 종자는 저온처리한 다음 [16h-명/8h-암]의 광주기로 23℃에서 발아시켰다. 애기장대 식물체를 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pMP90)를 이용하여 형질전환(Bechtold and Pelletier 1998)한 후, hygromycin-함유(10 ㎍/mL) 고체배지에서 선별하여 형질전환체를 얻었다. 5~6일된 T1 형질전환 유식물체의 뿌리에서 GFP 형광을 관찰하였다(프로모터 활성 평가 위한 개체수 n=17-40).

<72> 종래 알려진 방법(Choi et al. 2000; Hiei et al. 1994)에 따라 벼를 형질전환하였다. 프로모터 구축물을 *Agrobacterium tumefaciens* AgL1 균주에 전이하였다. *Agrobacterium*을 AB배지에서 3일간 배양하였다. 배발생(embryogenic) 캘러스의 발생을 위해 먼저 벼의 영과(穎果; caryopses)를 2,4-dichlorophenoxy 초산 2 mg/L가 함유된 N6 고체배지에 치상하고 암-상태에서 배양하였다. 3주 후, 10 mg/mL acetosyringone의 존재하에서 배발생 캘러스와 벡터를 함유한 *Agrobacterium*을 3일간 공동배양하고, 멸균수로 세척한 다음 50 mg/L hygromycin 및 150 mg/L cefotaxime를 함유하는 N6배지상에서 4주간 배양하면서 선별하였다. 선별된 캘러스를 0.5 mg/L a-naphthalen acetic acid 및 카이네틴(kinetin)을 함유하는 MS배지로 옮긴 후 [11h-27℃-명/13h-22℃-암] 조건의 배양기에서 생장시켰다. 약 15 cm 정도 자란 형질전환 벼를 온실로 옮겨 배양하면서 T1 및 T2 세대 벼 식물체의 GFP 발현을 관찰하였다. 형질전환 식물체들에 대하여 PCR 분석 및 염기서열 분석을 통해 형질전환 여부를 확인하였다.

<73> **(2) 프로모터 및 플라스미드의 제작**

<74> 도 11a~11g에 기재된 프라이머들을 이용한 PCR 방법으로 5′ -결실(-*; *는 숫자), 염기-치환(M*; E*M*, mE* 또는 *), 기능획득(GOF; -*/-*) 변이 프로모터들 또는 이들이 조합된 변이 프로모터들을 다양하게 제조하였다. 프라이머에서 제한효소자리의 약자는 Hd, HindIII; Sc, SacI; Xb, XbaI; Xm, XmaI이며, 프라이머에서 Y는 C 또는 T를, R은 A 또는 G를 나타낸다.

<75> 프라이머 리스트에서 이중세트로 되어있는 두 개의 프라이머를 이용하여 결실 프로모터와 GOF 프로모터를 증폭하였다. 염기치환 프로모터를 제조하기 위하여, 먼저 삼중 프라이머 세트 중 제 1 및 제 2 프라이머를 사용하여 메가프라이머(megaprimer)를 만들고, 이어서 메가프라이머와 제3 프라이머를 이용하여 치환 프로모터 단편을 제작하였다(Ke and Madison, 1997). 염기치환 프로모터를 주형으로 하고 GOF를 위한 것과 동일한 이중 프라이머 세트를 이용하여 [GOF+염기치환] 프로모터를 증폭하였다. 결실 프로모터 및 염기치환 프로모터를, *uidA* 유전자가 *GFP*로 치환된 pGPTV-HYG 벡터(Becker et al., 1992)의 HindIII/XbaI 또는 HindIII/XmaI 위치에 삽입하였다(Cho and Cosgrove, 2002). GOF 프로모터를, 상기 벡터의 GFP 상류에 최소한의 콜리 플라워·모자이크·바이러스 35 S프로모터(pm35S)가 있는 벡터의 HindIII/XbaI 위치에 삽입하였다. 이렇게 제작된 모든 프로모터 함유 플라스미드 구축물들을 염기서열 분석으로 정확히 제작되었는지 확인하였다.

<76> **(3) *EXPA7* Orthologs의 클로닝**

<77> *AtEXPA7*를 사용하여 TIGR (http://www.tigr.org/) 및 NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 데이터베이스에 질의하는 Blast 검색법으로 양배추(*BoEXPA7*) 및 벼(*OsEXPA17* 및 *OsEXPA30*) orthologs에 대한 코딩서열 및 프로모터 서열을 얻었다. 다른 *EXPA7* orthologs의 코딩영역은 게놈 DNA를 주형으로하고 도 11a~11g의 프라이머 세트를 이용하는 PCR법으로 제조하였다. GenomWalker Kit(BD Biosciences, Palo Alto, CA)를 사용하여 매뉴얼에 따라 프로모터 영역을 클로닝하였다. 두개의 유전자-특이적 프라이머와 도 11a~11g의 어댑터 프라이머(AP1

와 AP2)로 2연속 PCR을 수행하였다. 주형을 위한 게놈 DNA는 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Hilden, 독일)을 이용하여 각 식물체 조직으로부터 준비되었다.

<78> **(4) $P_{AtEXPA7}$와 $P_{AtEXPA18}$의 고해상도 분석**

<79> 두 개의 애기장대 expansin paralog인 *AtEXPA7* 및 *AtEXPA18*의 근모-특이적 프로모터 활성을 위해 각각 19-염기(-80~-62, 전사개시위치에 대한 상대값; E7M6 및 E7M7) 및 52-염기(-196~-145) 영역이 필수였다(Cho and Cosgrove, 2002). 본 발명에서는 근모 특이성을 결정하는 핵심부위 *cis*-인자(RHE)를 식별하기 위해 상기 영역에 대해 추가로 분석하였다.

<80> **(5) *Irx1* 변이체의 상보성(complementation)**

<81> *AtLRX1*의 코딩영역을 도 11a~11g에 도시된 프라이머 세트를 사용한 PCR로 증폭하여 *uidA* 유전자가 치환된 pGPTV-HYG의 XmaI/SacI 사이트에 삽입하였다. 이어서 *AtLRX1* 코딩영역 상류의 HindIII/XbaI 사이트에 상류에 *AtEXPA7* 프로모터(-134 결실)를 삽입하여 $P_{AtEXPA7(-134)}$:*LRX1* 구축물을 제작하였다. 상기 구축물을 근모-결함 *At1rx1* 변이체 식물에 도입하고, T1-T3 식물체를 관찰하였다.

<82> **(6) GFP의 관찰 및 프로모터 활성 평가**

<83> 형광 해부 현미경(fluorescence stereomicroscope; MZ FLIII, Leica, Heerbrugg, Switzerland) 또는 공초점 현미경(confocal laser scanning microscope; LSM 510, Carl Zeiss, Gotingen, Germany)를 이용하여 유식물체 뿌리에서의 GFP 형광을 관찰하였다. 필요한 경우 propidium iodide(10 ㎍/mL)로 뿌리를 염색하여 세포윤곽이 확실하게 보이도록 하였다. 녹색형광은 여기파장 488 nm 및 방출파장 543 nm에서, propidium iodide에 의한 적색 형광은 여기파장 568 nm 및 방출파장 617 nm에서 검출하였다. 공초점 현미경으로부터의 형광 이미지는 Zeiss LSM Image Browser Version 2.80.1123로 디지털화하였다. Cho and Cosgrove(2002)에 기술된 바와 같이, Adobe Photoshop(Adobe Systems Inc., San Jose, CA)의 히스토그램 기능을 사용하여 GFP 형광의 양을 측정하는 것으로 프로모터 활성을 평가하였다.

<84> **(7) 서열정렬 및 계통발생수의 작성**

<85> 디폴트 · 파라미터(gap penalty, 10.0; gap length penalty, 0.2; delay divergent seqs, 30%; DNA transition weight, 0.5)값을 적용한 CLUSTAL W(DNASTAR, Madison, WI)를 이용하여 염기서열을 정렬하였다. 염기서열에 대한 Possion correction distance를 채택하고 *MEGA* version 3.0 (Kumar et al., 2004)를 이용하여 근연조합형 계통발생수를 작성하였다. 부트스트랩 반복회수는 1000회였다.

<86> **(8) 등록번호(Accession Numbers)**

<87> 본 발명에서 이용된 유전자들의 GenBank 등록번호는 다음 표 1과 같다.

표 1

유전자	등록번호	유전자	등록번호
IbEXPA7	DQ899786	*TaEXPA7*	DQ899793
ZmEXPA7	DQ899789	*MtEXPA7*	DQ899790
MtEXPA8	DQ899791	*HvEXPA7*	DQ899788
BoEXPA7	DQ899785	*RsEXPA7*	DQ899792
CmEXPA7	DQ899787	*OsEXPA17*	AP000616
OsEXPA30	AC092697	*BoLRX1*	DQ899794
BoPRP3	DQ899795		
AtEXPA7	At1G12560	*AtEXPA18*	At1G62980
AtLRX1	At1G12040	*AtLRX2*	At1G62440
AtPRP3	At3G62680		

<88>

<89> 표 하부의 *At*-로 시작되는 유전자는 애기장대 유전자에 대한 애기장대 GILI(Genome Initiative Locus identifier)이다.

<90> **<결과>**

<91> **(1) 대표적 프로모터들이 함유하는 근모-특이적*cis*-인자(RHE)의 고해상도 *in vivo* 분석**

<92> 핵심부위 *cis*-인자(RHE)의 구조를 결정하기 위하여 *애기장대*의 *AtEXPA7*과 *AtEXPA18*에서 근모 특이성을 부여하는 것으로 확인된 프로모터 영역(Cho and Cosgrove, 2002)을 더욱 세분화(dissected)하였다. 상기 두 paralogous 근모-특이적 expansin 유전자의 프로모터에 다른 촉진인자(enhancing elements)와 다중 RHE 기능이 있는지 조사하였다.

<93> *AtEXPA7*의 프로모터($P_{AtEXPA7}$)와 *AtEXPA18*의 프로모터($P_{AtEXPA18}$)를 1~10 bp의 해상도로 정밀하게 염기치환을 분석한 결과(도 2a 및 2f), M1-M5 영역($P_{AtEXPA7}$의 경우)와 E18M5-E18M7 영역($P_{AtEXPA18}$의 경우)과 같이 유사서열의 모티프(motif)가 두 프로모터 모두에서 RHE 기능을 위해 필수적임이 밝혀졌다(도 2d, 2e 및 2g). 도 2a에서 야생형 서열 위의 숫자는 전사개시 위치로부터의 상대적 거리를 나타낸다. TATA 박스를 굵은 문자로 표시하였다. $P_{AtEXPA7}$ RHE1 영역의 4-염기 치환 분석결과 상기 서열은 M3 부근을 중심으로 두 개기능부로 나누어짐을 확인하였다. M3의 변이는 RHE 기능에 큰 영향을 주지 않았다(도 2d). 1-bp 치환 분석에 의해 $P_{AtEXPA7}$ RHE1의 기능에 필요한 각각의 염기들을 찾아내었고(도 2e), RHE에 고도로 보존된 "CACG" 모티프가 있음을 확인하였다. 이 공통 서열을 공유하는 다중 RHEs는 상기 두 유전자의 프로모터에서도 추가적으로 기능을 한다(도 2c 및 2h). $P_{AtEXPA7}$와 $P_{AtEXPA18}$의 -110/-90 및 -241/-196 영역(숫자는 전사개시 위치에 대한 상대적 염기 위치)은 각각 RHE 활성을 촉진하는 인자들을 함유하고 있을 가능성이 있다(도 2b, 2g 및 2h).

<94> **(2) 상이한 근모 패턴을 가지는 다양한 피자식물의*EXPA7* Orthologs**

<95> 상이한 근모 분포패턴을 가지는 종들에 *AtEXPA7* (또는 *AtEXPA18*)과 orthologous한 유전자가 존재하는지 확인하였다.

<96> *AtEXPA7*을 이용하여 데이타베이스를 탐색(Blast 탐색)한 결과 양배추(유형3; *BoEXPA7*)와 벼(유형2; *OsEXPA17* 및 *OsEXPA30*) 및 *Medicago truncatula*(유형1; *MtEXPA7* 및 *MtEXPA8*)에서 관련성이 매우 높은 서열을 확인하였다. 이때 근모 형태는 직접적인 관찰에 의해 결정하였다. 상기 서열들의 보존된 영역에 대응하는 프라이머들(도 11a~11g)을 이용한 PCR을 통해 다른 종들로부터도*EXPA7* orthologs를 얻었다.

<97> 보리(*Hordeum vulgare*; 유형 1; *HvEXPA7*), 밀(*Triticum aestivum*; 유형 2; *TaEXPA7*), 옥수수(*Zea mays*; 유형 1; *ZmEXPA7*), 무(*Raphanus sativus*; 유형 3; *RsEXPA7*), 애기똥풀(*Chelidonium majus*; 유형 1; *CmEXPA7*) 및 봉선화(*Impatiens balsamina*; 유형 3; *IbEXPA7*)로부터 코딩 서열을 클론하였다. 근모 유형은 Clowes(2000)가 기술한 바에 따랐다.

<98> *AtEXPA7*의 55(Gly)~181(Ile) 사이의 아미노산 서열 및 각 expansin 단백질의 대응영역 서열을 CLUSTAL W을 이용하여 정렬하여 근연조합형(neighbor-joining) 계통발생수(phylogenetic tree)를 작성하였다(도 3a). MEGA 3.0을 이용하여 제작된 계통발생수는 expansin 계열(회색 배경 표시부)에서 EXPA7 orthologs가 진화적으로 긴밀한 관련성이 있음을 보여준다. 계통수는 다양한 식물 분류군으로부터의 75개 EXPA 및 외부그룹으로서 AtEXPB2를 포함하며, 계통수 제작을 위한 부트스트랩(bootstrap)값(1000 반복)을 도 3b에 도시하였다. EXPA7 ortholog들을 청색 사각형 내에 기재하였다. 축척막대(scale bar)는 위치 당 치환수를 나타낸다. 약자가 의미하는 식물은 다음 표 2와 같다.

표 2

약자	식물명	약자	식물명
At	*애기장대 thaliana*	Bo	*Brassica oleracea*
Cm	*Chelidonium majus*	Hv	*Hordeum vulgare*
Ib	*Impatiens balsamina*	Mp	*Marchantia polymorpha*
Mq	*Marsilea quadrifolia*	Mt	*Medicago truncatula*
Os	*Oryza sativa*	Pp	*Physcomitrella patens*
Pt	*Pinus taeda*	Rd	*Regnellidium diphyllum*
Rs	*Raphanus sativus*	Ta	*Triticum aestivum*
Zm	*Zea mays*		

<99>

<100> 계통발생수에 의하면 이들 EXPA7-관련 expansin들이 단일계통발생(monophyletic) 그룹임을 알 수 있다. 계통수의 신빙성을 조사하는 부트스트랩 1000회 반복 테스트 중 67%가 EXPA7들의 단일계통을 지지하였다(도 3b). *OsEXPA17*을 제외한 화본과(또는 벼과, Graminaceae) EXPA7들은 진정쌍자엽 EXPA7들과는 구별되는 긴밀한 하위계통(sub-clade)을 형성한다. *OsEXPA17*은 EXPA7 계통의 저부(basal)에 위치하는데, 이는 *OsEXPA17*가 초기에 이 계통에서 분리되었음을 보여준다.

<101> **(3) EXPA7 Ortholog들의 기능적으로 보존된 RHE들**

<102> 데이타베이스로부터, 또는 PCR에 의한 클로닝으로부터 *EXPA7* ortholog의 프로모터 서열들을 얻었다. 프로모터들 내의 추정 RHE 영역의 위치를 알아내기 위하여 MEME 알고리즘(http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html)을 활용하였다.

<103> 결실, 염기치환 및 기능획득(GOF; Gain-of-function)된 ortholog 프로모터와 녹색형광단백질(GFP) 유전자를 융합하고 이를 *Agrobacterium*-매개 형질전환법으로 애기장대 식물(유형 3)에 도입한 다음 기내(*in-vivo*)에서 근모-특이적 프로모터의 활성을 분석하였다. 벼([A], [B]), 밀(C), 옥수수(D), *Medicago truncatula*(E), 봉선화(F) 및 양배추(G) *EXPA7* ortholog의 결실(-), 치환(-mE), 기능획득(-/-) 프로모터 단편을 GFP와 융합시키고 유형 3 애기장대 뿌리에서 분석하였다. 다른 애기장대 근모 유전자(*AtLRX1* [H] 및 *AtPRP3* [I])의 프로모터 단편 역시 동일하게 분석하였다(도 4a). 도 4a에 삽입된 사진은 각각의 프로모터 구축물을 함유하는 애기장대 뿌리의 형광 이미지이다. 에러 바(error bars)는 표준오차를 나타낸다.

<104> 모든 *EXPA7*-ortholog 프로모터들은 프로모터의 근위(proximal) 영역에 다중 RHE들을 가지며, 특징적인 'CACG' 모티프를 함유하는 $P_{AtEXPA7}$와 $P_{AtEXPA18}$의 RHE들과 유사하였다. 상이한 근모 형태의 식물에서 유래되었음에도 이들 ortholog 프로모터들은 유형 3 애기장대 식물체에서 근모세포 특이적인 GFP 발현을 나타내었다(도 4a에서 A~G). RHE들이 결실 또는 염기치환된 경우 ortholog 프로모터들의 활성이 대폭 감소되었다. 대표적 ortholog 프로모터의 GOF 분석은 RHE 단편(fragment)들이 근모-특이적 유전자 발현에 충분함을 보여주었다(도 4a에서 A, E 및 F; 도 4b). 이러한 결과들은, 상류의 운명-결정인자가 분화되었음에도 근모-특이적 유전자들의 RHE-매개 조절이 보존되었다는 사실을 확인해 준다.

<105> **(4) $P_{AtEXPA7}$와 $P_{AtEXPA18}$의 고해상도 분석**

<106> *AtEXPA7*과 *AtEXPA18*의 프로모터 전체와 RHE 분석 및 결과는 다음과 같다.

<107> *AtEXPA7* 프로모터($P_{AtEXPA7}$)의 -386 염기 결실인 E7M6와 E7M7 변이에 의해 근모 특이성이 완전히 제거되지 않았기 때문에, 여전히 우수한 근모 특이성을 유지하고 있는 -134 염기 결실 단편을 대상으로 보다 상세히 염기-치환 분석을 수행하였고, -386/-134 영역이 어떤 RHE를 가지고 있는지 여부를 테스트하였다. $P_{AtEXPA7}$의 10-염기 결실(-134~-80) 분석결과, 종래 알려진 바와 같이, 결정적인 RHE가 -90번 염기의 하류에 존재함을 확인하였다. 몇몇 촉진인자(enhancing elements)가 -110~-90에 존재하는 것으로 판단되며(도 2b), -80/-62 인자와 유사한 두 개의 인자가 각각 -309와 -261에서 시작된다. 이들 인자의 뿌리털 특이성을 기능획득(GOF) 분석을 통해 테스트하였다. 이를 위해 이 두 인자들을 각각 따로(-386/-255, -273/-200 및 -134/-46) 또는 같이 (-386/-200) 포함하여 minimal 35S cauliflower mosaic virus 프로모터(P_{m35S}, Cho and Cosgrove, 2002)에 연결시켜 분석하였다(도 2c).

<108> 비록 -386/-255 인자의 활성이 -134/-46 GOF보다 낮았지만 두 인자 모두 근모 특이성 발현을 유도하기에 충분하였다. -273/-200 GOF는 소수의 세포에서 매우 약한 근모 발현을 나타내었다. 이러한 GOF 분석결과는 $P_{AtEXPA7}$가 근모-특이적 유전자의 발현에 합산적으로(additively) 작용하는 다수의 기능적 RHE를 가지고 있음을 보여준다.

<109> 4-염기 및 1-염기 해상도에서 $P_{AtEXPA7}$ -80/-62 영역의 치환분석은 RHE의 상세한 기능을 잘 보여준다. M1, M2, M4, M5 또는 M6 영역에서 4-염기 치환되면 근모세포에서 -134 프로모터의 활성이 크게 감소되었지만(도 2a 및 2d), M3 영역에서의 치환은 프로모터 활성을 변화시키지 않았다. M1, AM2, M4 및 M5 영역의 1-염기 치환결과 M4 및 M5 영역에 대응하는 위치 10-14(도 2a; 1-bp)에서의 임의의 단일 염기 치환이 프로모터 활성에 치명적이었다(도 2e). 위치 6 및 7에서의 치환 역시 발현 수준을 매우 감소시켰다. 다른 1-염기 치환은 야생형(-134) 프로모터 활성에 비해 대략 40%의 감소를 초래하였지만, 이러한 위치에서의 다른 염기들의 치환이 프로모터 활성에 더욱 심각한 영향을 줄 가능성은 배제할 수 없다.

<110> $P_{AtEXPA18}$의 염기치환과 GOF 분석에 의하여 $P_{AtEXPA7}$에서와 유사한 근모 특이적 인자 하나가 확인되었다. $P_{AtEXPA18}$(-241의 결실)의 -194/-123 영역에서 5-염기 또는 10-염기 치환된 프로모터(E18M1-E18M8)의 활성을 테스트하였다(도 2f). 도에서 야생형 서열 위의 숫자는 전사개시위치로부터의 상대적 거리를 나타낸다. TATA 박스를 굵은 문자로 표시하였다.

<111> E18M5, E18M6 및 E18M7에서의 치환은 프로모터 활성을 거의 바닥 수준으로 감소시켰다(도 2g). E18M1와 E18M2의 치환은 활성을 대략 30% 감소시켰으나, E18M3, E18M4 및 E18M8 치환은 활성에 영향이 없었다. 이러한 데이터는 -148/-128영역에 $P_{AtEXPA18}$의 근모 특이적 활성에 필수적인 인자가 존재함을 나타낸다. 이러한 결과는 -145의 결실이 프로모터 활성을 완전히 제거한다는 종래 사실(Cho and Cosgrove, 2002)과 일치한다. 상기 영역을 $P_{AtEXPA7}$의 -80/-62영역과 비교한 결과, 양 영역에서 동일한 7-염기 모티프(CGCACGT)를 발견하였다. $P_{AtEXPA7}$의 상류 -80/-62의 다른 두 인자(도 2c)에도 이 모티프가 존재한다. $P_{AtEXPA18}$ -241/-120 단편의 GOF 분석은 근모 특이적 발현을 나타냈으며, E18M6 치환(7-염기 모티프에 대응)은 발현을 완전히 차단하였는데(도 2h), 이는 7-염기 모티프가 $P_{AtEXPA18}$에서 근모 특이성에 불가결한 것임을 나타낸다. -196 결실과 -196/-120 GOF에서 프로모터 활성이 각각 -241 결실과 -241/-120 GOF와 비교하여 감소되었으므로(도 2h) -241/-196 영역은 아마 RHE 활성을 촉진하는 또 다른 인자를 가지고 있을 것으로 판단된다.

<112> **(5) 다른 *애기장대* 근모 유전자들의 RHE들은 기능적으로 보존되어 있다.**

<113> 애기장대에서 또 다른 세 개의 근모-특이적 유전자(*AtLRX1, AtLRX2* 및 *AtPRP3*)가 보고되었다(Bernhardt and Tierney, 2000; Baumberger et al., 2001 and 2003). 이 유전자들은 오로지 근모세포에서만 발현된다; 근모세포와 다른 종류의 뿌리 세포에서 모두 발현되는 유전자들은 이 범주에서 제외하였다. 이들 근모-특이적 유전자들은 *AtEXPA7* 및 *AtEXPA18*과 같은 발현패턴을 보인다. 따라서 이들 유전자의 근모-특이적 *cis*-인자를 분석하였다.

<114> 이들 근모 유전자의 프로모터들은 프로모터 근위영역에 RHE를 가지고 있다: P_{AtLRX1}에는 두개의 역위(reverse) RHE, P_{AtLRX2}와 P_{AtPRP3}에는 각각 한개의 역위 RHE(도 5). P_{AtLRX1}과 P_{AtPRP3}에 존재하는 RHE들의 결실과 염기치환 분석은 이들 프로모터가 근모 특이성을 갖기 위해서 RHE 모티프가 요구됨을 증명하였다(도 4a에서 H 및 I). 이러한 데이터들은 애기장대에서 다른 근모-특이적 유전자들도 세포 유형-특이적 발현을 유도하기 위해 동일한 *cis*-인자를 활용하고 있음을 보여준다.

<115> **(6) *EXPA* Orthologs 및 다른 애기장대 근모 유전자로부터의 RHE-함유 프로모터의 분석**

<116> 애기장대 형질전환을 이용한 $P_{OsEXPA30}$ 분석에서 -318까지의 프로모터 결실은 근모세포 특이적인 프로모터 활성을 높게 유지하였다(도 4a에서 A). 상기 프로모터 영역은 위치 -206(E1) 및 -130(E2)에서 시작되는 두개의 추정적 RHE를 포함하고 있다(도 5). $P_{AtEXPA7}$의 M4 및 M5(도 2a)에 거의 대응되는 $P_{OsEXPA30}$ E1 핵심부위(mE1)의 염기치환은 -318 구축물의 프로모터 활성을 현저히 감소시켰는데, 이는 동일한 RHE가 벼(유형 2) 프로모터의 근모세포 특이성을 매개하며, 상기 벼 *cis*-인자가 유형 3 애기장대 뿌리에서 근모를 발현시킬 수 있음을 나타낸다. -142의 결실은 프로모터 활성을 현저하게 감소시켰으나, 몇몇 활성은 유지되었다. -318mE1 및 -142 양쪽 모두에서의 잔존 활성은, 비록 낮은 활성이지만 E2 인자 역시 근모 특이성을 제공하는 것을 나타낸다. 이러한 벼 RHE들의 근모 특이성을 확인하기 위해서, -263/-112 프로모터 단편에 대한 GOF 분석을 수행하였다. 상기 GOF 프로모

터(-263/-112)는 약하지만(도 4a에서 A) 근모-특이적 활성을 가진다(도 4b).

<117> OsEXPA17가 EXPA7 계통의 기부에서 분기되어 나왔다는 사실은 OsEXPA17이 다른 EXPA7들에 대하여 기능적으로 ortholog한가에 대한 의문이 제기된다. $P_{OsEXPA17}$의 전사개시위치의 -814염기 이내에서 모두 역위인 세 개의 추정적 RHE(E1r, E3r 및 E2r)가 발견되었다(도 5). 상기 -814 프로모터는 애기장대 뿌리에서 강력한 근모-특이적 활성을 유발하였다(도 4a에서 B). RHE의 결실분석 결과, -175 결실이 근모 특이적 발현을 완전히 제거하지는 않았지만 대폭 감소시켰다. 이러한 결과는 적어도 둘, 아마도 세 개 전부의 RHE들이 $P_{OsEXPA17}$에서 근모-특이적 *cis*-인자로서 작용하는 것을 시사한다(도 5). 도 5에서 각 서열 위의 숫자는 프로모터 분석에 사용된 결실 및 획득 부위를 나타낸다. 서열 아래의 숫자는 RHE 핵심부위(검은 사각형)의 시작 염기 위치이며, RHE 핵심부위 위의 큰 숫자는 연결부의 길이(2~3 염기)를 나타낸다. 회색 사각형은 벼과 P_{EXPA7}들에서 보존된 RHE 확장영역을 나타낸다. 염기의 위치는 전사개시위치 또는 개시코돈(ATG)으로부터의 상대적인 거리로 표시하였다. 근모세포 분포유형은 유전자명 뒤의 괄호에 나타내었다. RHE 숫자 뒤의 "r"은 역위를 나타내며, "?"는 실험적으로 증명되지 않았다는 의미이다.

<118> 밀은 유형 2, 옥수수는 유형1의 근모 분포 패턴을 나타낸다(Clowes, 2000). Graminaceae인 상기 두 종의 *EXPA7* 프로모터를 분석하였다. $P_{TaEXPA7}$와 $P_{ZmEXPA7}$ 모두는 전사개시부위로부터 -200 염기 이내에 두 개의 RHE를 가지고 있다(도 5). $P_{TaEXPA7}$와 $P_{ZmEXPA7}$를 각각에 대한 -267 및 -276 결실은 애기장대에서 근모-특이적 프로모터 활성을, 벼의 대응인자에 비해 훨씬 낮게 나타내었다(도 4에서 c 및 D; 도 4b). 각 프로모터에서 E1의 결실이나 염기 치환은 발현을 완전히 소멸시키지 못했는데, 이는 E2 인자가 이 두 프로모터에서 여전히 기능적임을 나타낸다.

<119> 애기장대 이외에도 세 종의 진정쌍자엽[*Medicago truncatula*(유형 1), 봉선화(유형 3) 및 양배추(유형 3)]의 EXPA7-ortholog 유전자의 프로모터도 분석하였다. 이들 프로모터는 프로모터의 근위영역에 두 세 개의 RHE를 가지고 있다(도 5). 세 개의 잠정적 RHE를 가지고 있는 *M. truncatula* 프로모터 $P_{MtEXPA7}$의 -342 결실은 애기장대 뿌리에서 강한 근모-특이적 활성을 나타내었다(도 4a에서 E). E1의 변이는 프로모터 활성을 8배 감소시켰다. -146 및 -78 결실에서의 활성 손실은 E2와 E3r 역시 근모세포 특이성에 관여함을 시사한다. -342/-167 및 -146/-40 GOF(도 4a에서 E; 도 4b)의 근모 발현은 상기 세 종의 *cis*-인자가 모두 근모세포 특이적 발현을 매개할 수 있다는 상세한 증거이다. -557에서 절단되고 두 개의 RHE를 가진 봉선화 $P_{IbEXPA7}$(도 5) 역시 애기장대에서 GFP의 근모-특이적 발현을 강하게 유도하였다(도 4a에서 F). E1(-516에 위치)의 염기치환과 완전한 결실은 -557 구축물의 활성에 비해 프로모터 활성을 각각 40% 및 80%로 감소시켰다. 이러한 데이터는 -104 위치의 E2가 $P_{IbEXPA7}$에 근모세포 특이성을 제공함을 나타낸다. -567/-441 GOF 프로모터에 의한 낮긴 하지만 근모-특이적 발현은 E1가 근모-특이적 발현을 유발하는 능력이 있음을 증명하는 것이다(도 4a에서 F; 도 4b).

<120> -259 양배추 프로모터에는 두 개의 RHE가 존재한다(도 5). 상기 양배추 프로모터 영역은 대응되는 애기장대 $P_{AtEXPA7}$ 영역과 77%의 높은 동일성을 보이는데, 이는 상기 두 프로모터가 분화된지 오래지 않았음을 시사한다. $P_{BoEXPA7}$의 결실 분석은 상기 두 RHE가 애기장대 뿌리에서 작동함을 나타낸다(도 4a에서 G).

<121> P_{AtLRX1}의 원위(distal) RHE의 결실(-362)은 -505 프로모터와 비교하여 프로모터 활성을 45% 감소시키는데(도 4a에서 H), 이것은 근위의 E1r이 근모-특이적 발현을 유도하는데 충분함에도 불구하고 원위의 E2r이 기능을 함을 나타낸다. 그러나 E1r의 염기치환(362mE1) 혹은 결실(-174)은 프로모터 활성을 거의 완전하게 제거하였다. 프로모터 P_{AtPRP3}의 유일한 RHE가 결실(-118)되거나 변이(-227mE1)되면 근모 활성 역시 완전히 상실되었다(도 4a에서 I). 이러한 결과는 현재까지 알려진 모든 근모-특이적 유전자들이 근모-특이적 발현을 위해 보편적으로 동일한 *cis*-인자를 이용하고 있음을 시사한다.

<122> **(7) $P_{OsEXPA30}$과 $P_{AtEXPA7}$도 유형2 벼 뿌리에서 근모-특이적이다.**

<123> ① 유형2인 벼 *EXPA7*-ortholog 프로모터가 벼 근모세포에서 작동하는지, ② 유형3인 애기장대 *EXPA7* 프로모터가 근모 유형 2인 벼 뿌리에서 근모세포 특이성을 유지하는 지를 분석하였다.

<124> 이를 위해 $P_{OsEXPA30}$*(-318):GFP*와 $P_{AtEXPA7}$*(-386):GFP*를 *Agrobacterium*-매개 형질전환법으로 벼의 배(embrionic) 캘

러스(callus)에 도입하고, 유식물체 뿌리를 검사하였다(도 6; 축척막대는 20㎛).

<125> 근모세포와 근모가 돌출되기 전의 일부 세포에서 $P_{OsEXPA30}$에 의해 유도된 GFP의 특이적 발현이 검출되었다(도 6의 A). 사진에서, 분화된 근모세포(trichoblast)에서 녹색형광이, propidium iodide으로 염색된 세포벽에서 적색형광이 보인다. 발현 패턴은, 장형 및 단형 표피세포가 뿌리축을 따라 반복되고 단형 세포가 근모세포로 되는 유형 2 근모세포 분포와 동일하였다. 나아가 벼의 유형 2 근모세포는, 위치-의존적 유형3 패턴과는 명확히 다르게, 하나 또는 두 개의 하부 피층세포 위에 위치하였다(도 6의 C). 도 6에서 C는 $P_{OsEXPA30}$*:GFP*가 발현된 벼 뿌리의 횡단면 사진(재구성된 공초점 이미지)이다. GFP-발현 근모세포가 1~2개의 하부 피층세포(*)와 접하고 있다. 벼에서 이러한 유형2 패턴은 간헐적으로 연속된 근모세포가 관찰되는 상부 근모-성숙 영역에서 다소 방해받는 것으로 보인다(사진 생략). 적어도 유식물체에서 $P_{OsEXPA30}$의 활성은 근모세포로 한정되었다. 이 결과는 *AtEXPA7*과 동일한 기능을 벼에서 *OsEXPA30*이 수행함을 의미한다. *AtEXPA7* 프로모터 역시 벼에서 근모세포 특이적이었다(도 6의 D). 애기장대 EXPA7 프로모터는 벼 근모세포에서 유형 2 패턴을 따라 활성을 나타냈다. 녹색형광은 근모(도 6의 B) 및 근모세포(도 6의 A, C)에서만 발견된다. 형질전환 벼 식물체의 실험 결과는 근모 특이성에 대한 *cis*-인자는 유형 2와 유형 3 사이의 상류 운명-결정 기작의 차이에도 양 유형의 종(species)들 사이에 호환성이 있음을 보여준다.

<126> **(8) P_{AtEXPA}에 의해 유도된 *AtLRX1*의 발현에 의해 *lrx1* 변이가 치유될 수 있다.**

<127> $P_{AtEXPA7}$ 프로모터가 다른 근모 유전자들의 프로모터와 기능상 호환성이 있는지 확인하였다.

<128> *애기장대*의 *lrx1* 변이체에는 종종 퇴화되거나, 팽대되었거나 가지가 처진 근모가 나타난다(Baumberger et al., 2001). $P_{AtEXPA7}$*(-134):LRX1* 구축물을 *lrx1* 변이체 식물에 도입하였다. P_{AtEXPA}에 의해 유도된 야생형 *LRX1* 유전자의 발현은 *lrx1* 식물체의 뿌리결함을 치유하였다(도 7). 사진에서 축척막대는 100㎛이다. 도 7에서 A는 *lrx1* 변이체의 비정상 근모 발현형을 보여주며, B는 $P_{AtEXPA7}$*(-134):LRX1*를 *lrx1* 변이체에 도입하면 뿌리털 발현형이 회복된 결과를 보여주는 사진이다.

<129> 이러한 결과는 RHE들이 상이한 근모 유전자들 사이에서 기능상 호환성이 있다는 것을 보여준다.

<130> **(9) RHE 공통 핵심 서열의 확립**

<131> EXPA7 유전자와 다른 근모 유전자들의 다중정렬 및 $P_{AtEXPA7}$ RHE1 (E1)의 기능적 분석을 통해 컨센서스(consensus; 핵심부위서열) RHE를 도출하였다(도 8a). 도 8a에서 A는 정렬된 RHE 서열. 보존적인 염기를 검은 배경으로 표시하였다. 배열 위의 숫자는 핵심부위에서 염기위치를 나타낸다. 도 8a에서 B는 보존성이 높을수록 긴 문자로 표시한 RHE 영역의 서열 개념도. 서열 개념도는 WebLogo program(Crooks et al., 2004; http://weblogo.berkeley.edu/)을 이용하여 작성하였다. RHE 핵심부위에 밑줄을 표시하였다. 도 8a에서 C는 RHE 핵심부위 구조도. 두 개의 역위된 화살표는 핵심부위가 (불완전) 회문구조임을 나타낸다. 고도로 보존적인 염기를 굵은 문자로 표시하였다. 'n'은 임의의 염기를 나타내며, LP는 좌측부를, RP는 우측부를 의미한다.

<132> RHE 핵심부위서열은 짧은 링커 영역에 의해 연결된 두 개의 보존적 부분으로 이루어진 16-17 염기로 구성된다. 몇몇 RHE들에서 상기 링커 영역은 염기가 하나 더 존재하기도 한다. RHE 핵심부위의 정의는, 링커 영역을 제외한 나머지 부분에서 주어진 염기 위치에서 네 가지 염기 종류 중 세 가지 이하 또는 어떤 염기가 우점적으로 나타나는 부위이다(도 8a에서 A). 이러한 RHE 핵심부위는 도 8a의 A, B 및 C에 표시한 바와 같은 16 내지 17 개의 염기로 구성된다. RHE 핵심부위의 보존된 두 부분은 상호간에 불완전한 회문구조(palindrome)이다(도 8a에서 C). 두 부분 중에서 좌측부(left part; LP) 보다 우측부(right part; RP)의 서열이 더 보존되어 있다. RP는 전형적으로, 기능적으로 검증된 모든 RHE들에서 고도로 보존적인 'CACG' 모티프가 포함된 'G(/T)CACGT(/A)' 서열을 가지는 것이 특징이다(도 8a에서 A). 이 'CACG' 모티프의 어느 한 염기라도 치환되면 프로모터의 활성은 거의 완전히 상실된다(도 2e). LP에서는 단지 'TG' 모티프만이 고도로 보존되었으며, RHE 종류에 따라 부분적 보존성이 발견된다. TG' 모티프에서 T는 모든 기능적 RHE들에서 절대적으로 보존적이며, 이것이 치환된 경우 프로모터 활성에 치명적이었다(도 2e). 한편 'TG' 모티프의 G가 대부분의 RHE에서 보존적이긴 하지만, AtEXPA7E3과 MtEXPA7E3r에서 각각 보여지듯이, A나 C와 기능적으로 치환 가능하였다(도 8a에서 A). 이러한 미세변이형(minor variant) RHE들을 가진 프로모터들은 여전히 근모 특이적이었다(도 2c, -386/-200, -386/-200; 도 4a에서 E, -78). AtEXPA7E1에서 8번째 염기의 점 돌연변이(a point mutation)(도 2a)는 7번째 염기인 T에서의 변이보다 프로모터 활성에 더 적은 영향을 주었다(도 2e).

<133> 링커가 RHE 기능에 미치는 영향을 조사하기 위하여, AtEXPA7E1의 3-염기 링커에서 염기 하나를 결실시켰고, AtEXPA18E1의 2-염기 링커에 염기 하나를 삽입하였다. 염기 하나의 결실 또는 삽입은 각각 (-241)$P_{AtEXP18}$과 (-134)P_{AtEXPA}의 RHE 링커 영역에서 이루어졌다. AtEXPA18E1의 링커에 1-염기 삽입(*)은 프로모터 활성을 대폭 감소시켰다. -241 결실 프로모터는 야생형(WT) 또는 1-염기 삽입(1-I) AtEXPA18E1를 포함한다(도 9에서 A). AtEXPA7E1의 링커에 1-염기 삽입(*)은 프로모터 활성을 상당히 감소시켰다. -134 결실 프로모터는 야생형(WT) 또는 1-염기 삽입(1-D) AtEXPA7E1를 포함한다(도 9에서 B). 하나의 염기가 삽입된 AtEXPA18E1 링커는 프로모터 활성을 대폭 감소시켰고, 하나의 염기가 결실된 AtEXPA7E1 링커는 프로모터 활성을 약 60% 감소시켰다.

<134> 이러한 결과는 링커의 염기치환은 괜찮지만 링커 길이는 RHE 기능에 결정적임을 나타낸다.

<135> **(10) RHE의 방향성**

<136> 많은 경우 cis-촉진인자들은 정방향과 역방향 모두 동일한 기능을 보인다(Lewin, 2004). 29개의 추정적 또는 기능적으로 확인된 RHE들 중에서 12개는 역방향으로 존재한다(도 5). P_{MtEXPA}에서 정방향, 역방향 RHE들이 함께 발견되지만, 하나의 프로모터 내의 다중 RHE들은 동일한 방향성을 가지는 경우가 우세하다.

발명의 효과

<137> 본 발명에 의하여 다양한 유전자들의 뿌리(근모) 특이적 발현을 통해 해당 유전자들의 생리적 기능 연구가 매우 용이하고 신속하게 이루어질 수 있게 된다.

<138> 또한 본 발명에 의하여 유용한 유전자를 거의 모든 유용 식물이 포함된 피자식물의 뿌리(근모) 특이적으로 발현되도록 하는 것이 가능해지므로, 식물의 다른 부위에 대한 영향을 최소화하면서, 다양한 식물체를 이용한 유용 물질의 생산, 식물 뿌리의 기능 향상과 기능 창조, 그리고 새로운 기능성 물질을 함유하는 식물체 및 식물뿌리를 얻을 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

<1> **도 1a**는 유관속 식물에서 3 종류의 근모분포 유형의 개념도이다..

<2> **도 1b**는 근모분포 유형 사이의 계통발생 연관성을 보여주는 도면이다.

<3> **도 2a**는 애기장대 유전자 *AtEXPA7*의 프로모터 $P_{atexpa7}$ RHE1(도 5에서 E1) 영역의 염기서열(윗부분), 4-염기 및 1-염기 단위의 변이체에서 치환된 염기들(아랫부분)을 나타내는 도면이다.

<4> **도 2b**는 $P_{atexpa7}$ RHE1 근처 상류 영역의 10-염기 결실분석에 관한 사진 및 도표이다.

<5> **도 2c**는 $P_{atexpa7}$ RHE1, RHE2, RHE3 부위의 기능획득(GOF) 프로모터 분석결과 사진 및 도표이다.

<6> **도 2d**는 $P_{atexpa7}$ RHE1 영역의 4-염기 치환([A]에서 M1-M8) 분석결과 도표이다.

<7> **도 2e**는 $P_{atexpa7}$ RHE1 핵심 부위의 1-염기 치환([A]에서 1-16) 분석결과 도표이다.

<8> **도 2f**는 $P_{atexpa18}$ RHE1(도 5에서 E1) 영역의 염기서열(윗부분), 프로모터 변이체(E18M1-E18M8)에서 치환된 염기들(아랫부분)을 나타내는 도면이다.

<9> **도 2g**는 $P_{atexpa18}$ RHE1 주변영역의 치환 분석결과 도표이다.

<10> **도 2h**는 $P_{atexpa18}$ RHE1의 GOF 분석결과 사진 및 도표이다.

<11> **도 3a**는 Expansin 단백질 서열들의 근연조합형(neighbor-joining) 계통발생수를 나타내는 도면이다.

<12> **도 3b**는 부트스트랩값(1000회 반복)에 따른 expansin 단백질 서열의 근연조합형 계통발생수를 나타내는 도면이다.

<13> **도 4a**는 상이한 근모분포 유형으로부터 기원한 *EXPANSIN A7*(*EXPA7*) ortholog 및 expansin 이외의 애기장대 근모특이적 유전자의 RHE들이 기능적으로 보존되어 있음을 보여주는 도표 및 사진이다.

<14> **도 4b**는 애기장대 뿌리에서 *EXPA7* ortholog들의 프로모터 분석을 보여주는 사진이다.

<15> **도 5**는 *EXPA7* ortholog 및 다른 근모 특이적 유전자의 RHE들의 개념도이다.

<16> **도 6**은 유형 2 및 유형 3 패턴 유전자의 RHE-함유 프로모터가 유형 2인 벼의 뿌리에서도 뿌리털 특이적임을 확인한 실험결과[$P_{OsEXPA30}$*(-318):GFP* (A~C) 및 $P_{AtEXPA7}$*(-386):GFP* (D)로 형질전환된 벼 뿌리]의 공초점 현미경 이미지 사진이다.

<17> **도 7**은 *AtEXPA7* 프로모터가 *AtLRX1* 프로모터를 기능적으로 대치할 수 있음을 확인하는 실험결과 사진이다.

<18> **도 8a**는 RHE 핵심부위 영역 개념도이다.

<19> **도 8b**는 여러 근모-특이적 프로모터의 RHE 핵심부위 서열을 보여주는 도표이다.

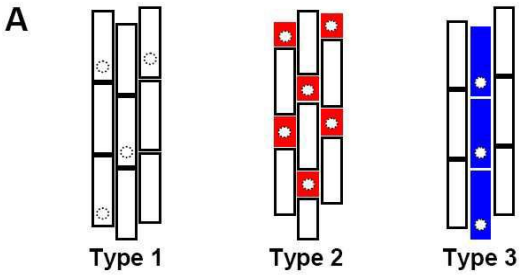
<20> **도 9**는 RHE 핵심부위 중 연결부위에 대한 점 돌연변이 실험결과에 대한 도표이다.

<21> **도 10**은 상이한 근모-패턴 유형에서 근모세포 특이적 유전자의 발현이 어떻게 이루어지는 지를 보여주는 도면이다.

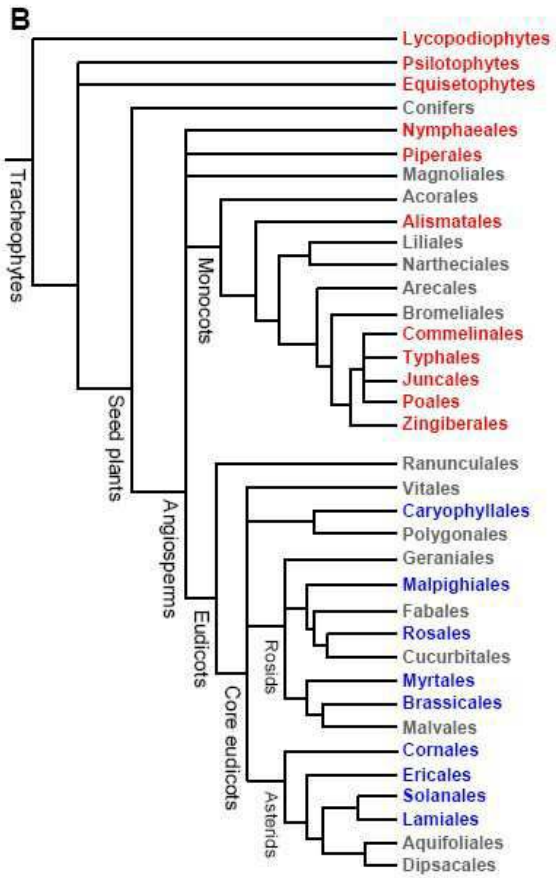
<22> **도 11a~11g**는 본 발명에 의한 프로모터 제작시 사용된 프라이머 세트에 대한 표이다.

도면

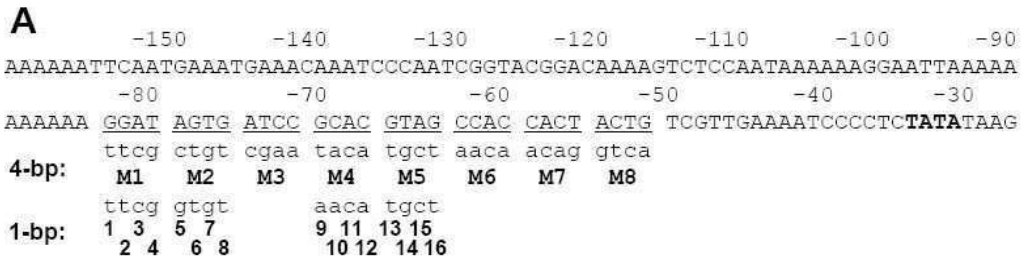
도면1a



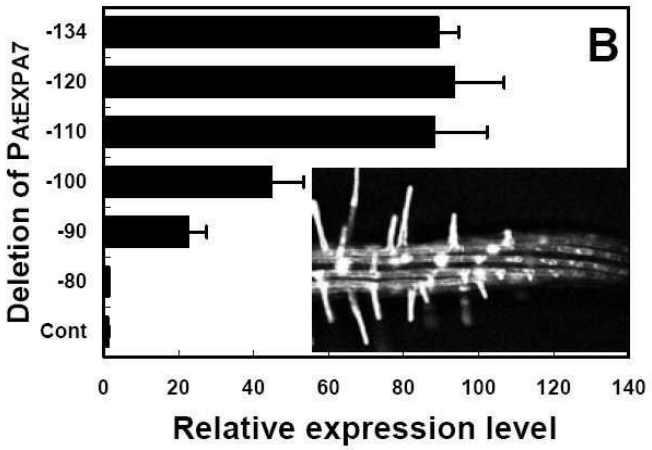
도면1b


B
Lycopodiophytes
Psilotophytes
Equisetophytes
Conifers
Nymphaeales
Piperales
Magnoliales
Acorales
Alismatales
Liliales
Nartheciales
Arecales
Bromeliales
Commelinales
Typhales
Juncales
Poales
Zingiberales
Ranunculales
Vitales
Caryophyllales
Polygonales
Geraniales
Malpighiales
Fabales
Rosales
Cucurbitales
Myrtales
Brassicales
Malvales
Cornales
Ericales
Solanales
Lamiales
Aquifoliales
Dipsacales
Tracheophytes
Seed plants
Angiosperms
Monocots
Eudicots
Core eudicots
Rosids
Asterids

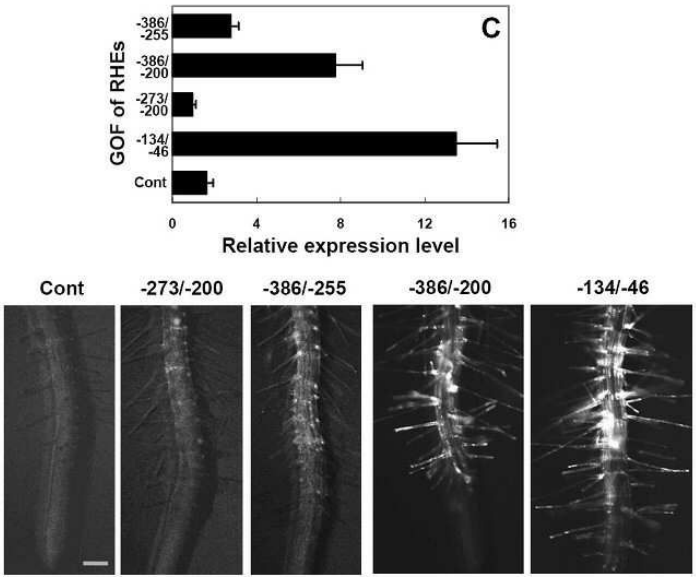
도면2a


A
-150 -140 -130 -120 -110 -100 -90
AAAAAATTCAATGAAATGAAACAAATCCCAATCGGTACGGACAAAAGTCTCCAATAAAAAAGGAATTAAAAA
-80 -70 -60 -50 -40 -30
AAAAAA GGAT AGTG ATCC GCAC GTAG CCAC CACT ACTG TCGTTGAAAATCCCCTCTATATAAG
4-bp: ttcg ctgt cgaa taca tgct aaca acag gtca
M1 M2 M3 M4 M5 M6 M7 M8
1-bp: ttcg gtgt aaca tgct
1 3 5 7 9 11 13 15
2 4 6 8 10 12 14 16

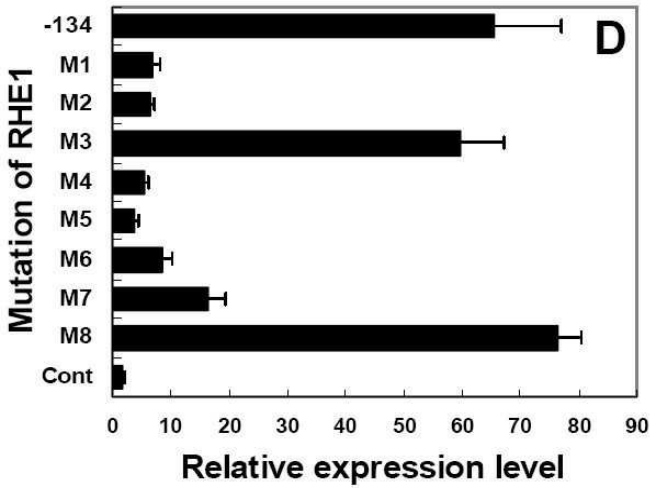
도면2b


B
Deletion of PAtEXPA7
-134
-120
-110
-100
-90
-80
Cont
0
20
40
60
80
100
120
140
Relative expression level

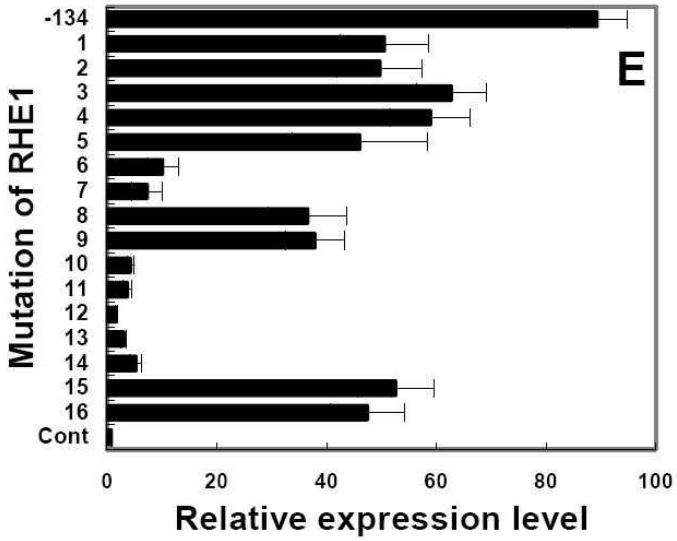
도면2c


C
GOF of RHEs
-386/-255
-386/-200
-273/-200
-134/-46
Cont
0
4
8
12
16
Relative expression level
Cont
-273/-200
-386/-255
-386/-200
-134/-46

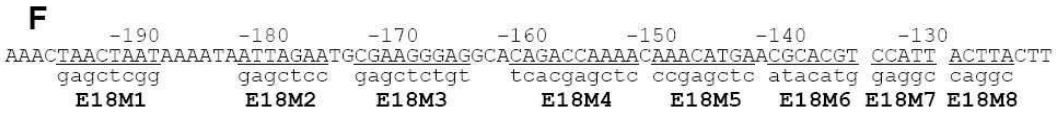
도면2d



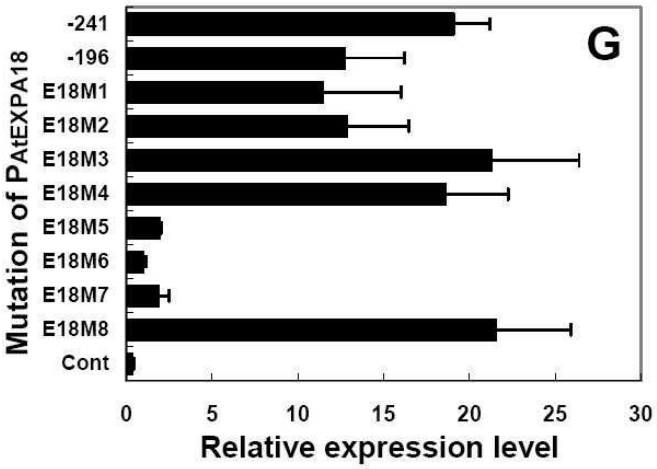
도면2e



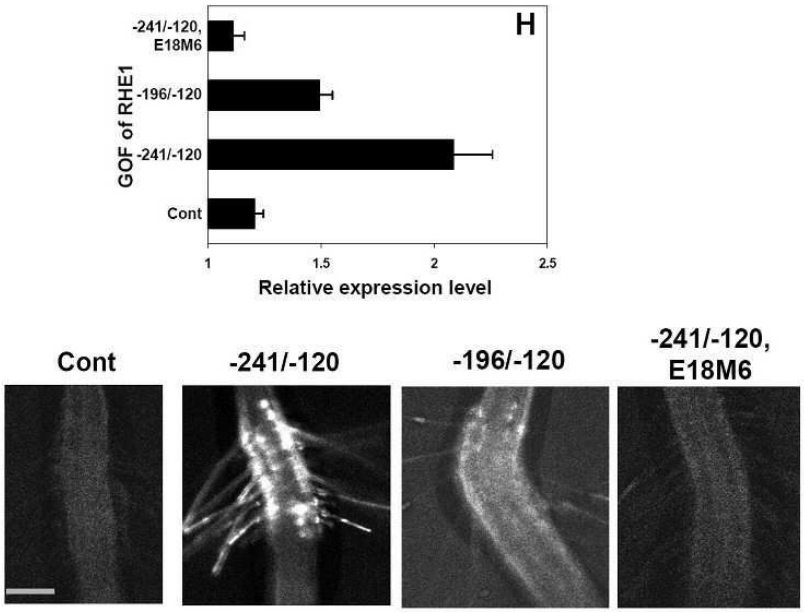
도면2f



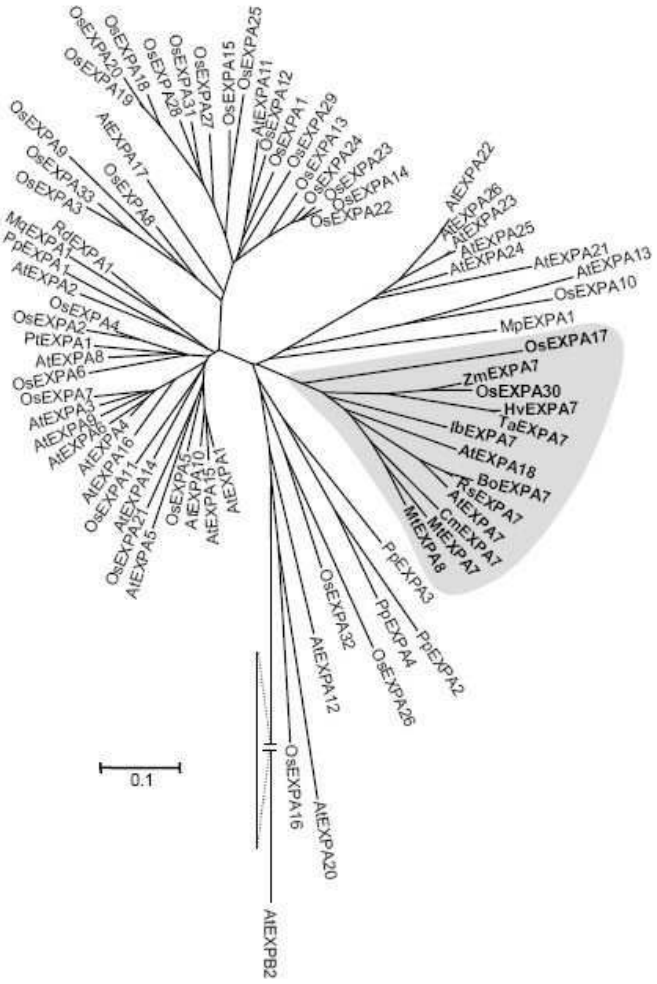
도면2g


G
Mutation of PAtEXPA18
-241
-196
E18M1
E18M2
E18M3
E18M4
E18M5
E18M6
E18M7
E18M8
Cont
0
5
10
15
20
25
30
Relative expression level

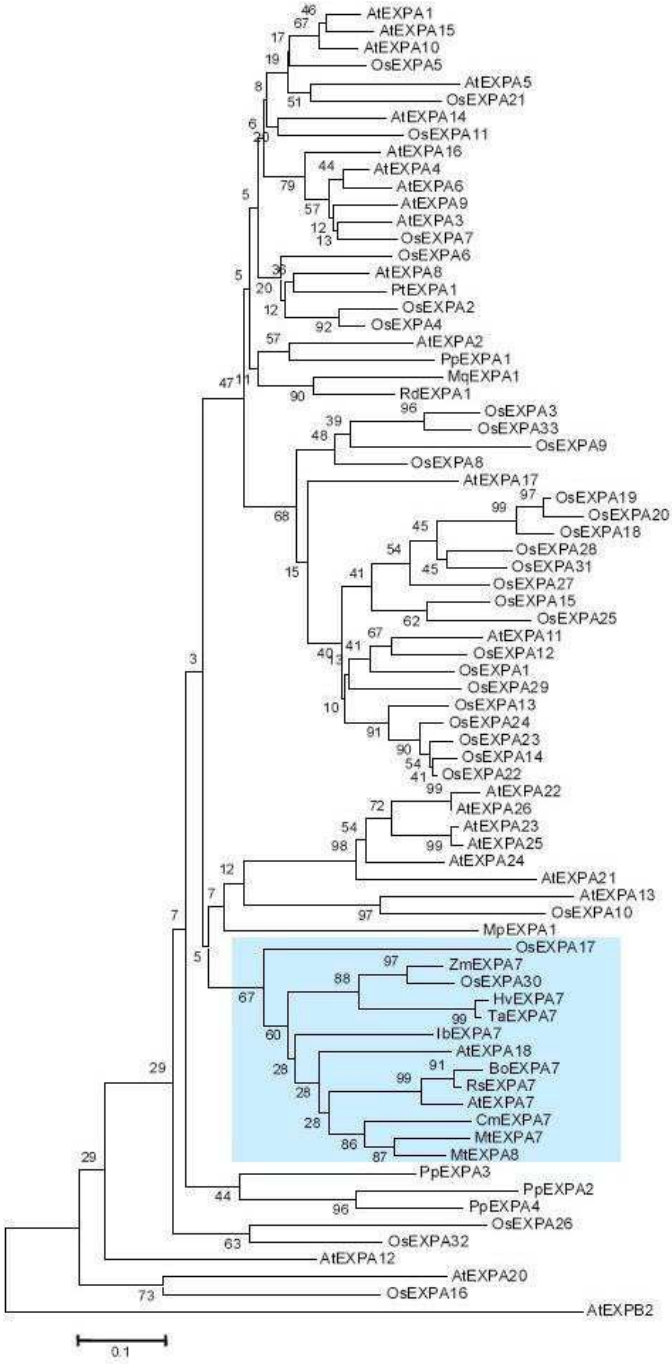
도면2h


H
GOF of RHE1
-241/-120, E18M6
-196/-120
-241/-120
Cont
1
1.5
2
2.5
Relative expression level
Cont
-241/-120
-196/-120
-241/-120, E18M6

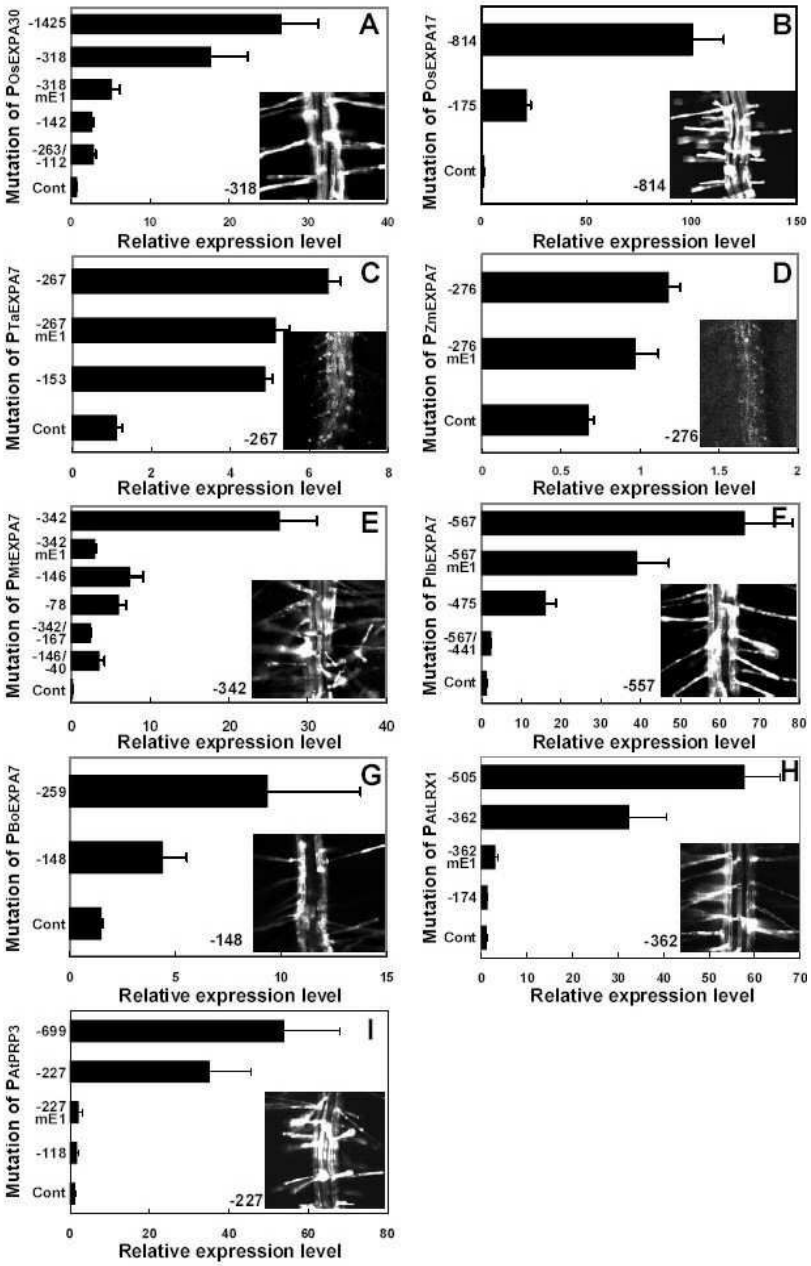
도면3a


OsEXPA20
OsEXPA19
OsEXPA18
OsEXPA28
OsEXPA31
OsEXPA27
OsEXPA15
OsEXPA25
AtEXPA11
OsEXPA12
OsEXPA1
OsEXPA29
OsEXPA13
OsEXPA24
OsEXPA23
OsEXPA14
OsEXPA22
AtEXPA17
OsEXPA8
OsEXPA9
OsEXPA33
OsEXPA3
MtEXPA1
PpEXPA1
RdEXPA1
AtEXPA2
OsEXPA4
OsEXPA2
PtEXPA1
AtEXPA8
OsEXPA6
OsEXPA7
AtEXPA3
AtEXPA9
AtEXPA5
AtEXPA4
AtEXPA16
AtEXPA11
AtEXPA14
OsEXPA21
AtEXPA3
OsEXPA5
AtEXPA10
AtEXPA15
AtEXPA1
AtEXPA22
AtEXPA26
AtEXPA23
AtEXPA25
AtEXPA24
AtEXPA21
AtEXPA13
OsEXPA10
MpEXPA1
OsEXPA17
ZmEXPA7
OsEXPA30
HvEXPA7
TaEXPA7
IbEXPA7
AtEXPA18
BoEXPA7
RsEXPA7
AtEXPA7
CmEXPA7
MtEXPA7
MtEXPA8
PpEXPA3
OsEXPA32
PpEXPA4
PpEXPA2
OsEXPA26
AtEXPA12
OsEXPA16
AtEXPA20
AtEXPB2
0.1

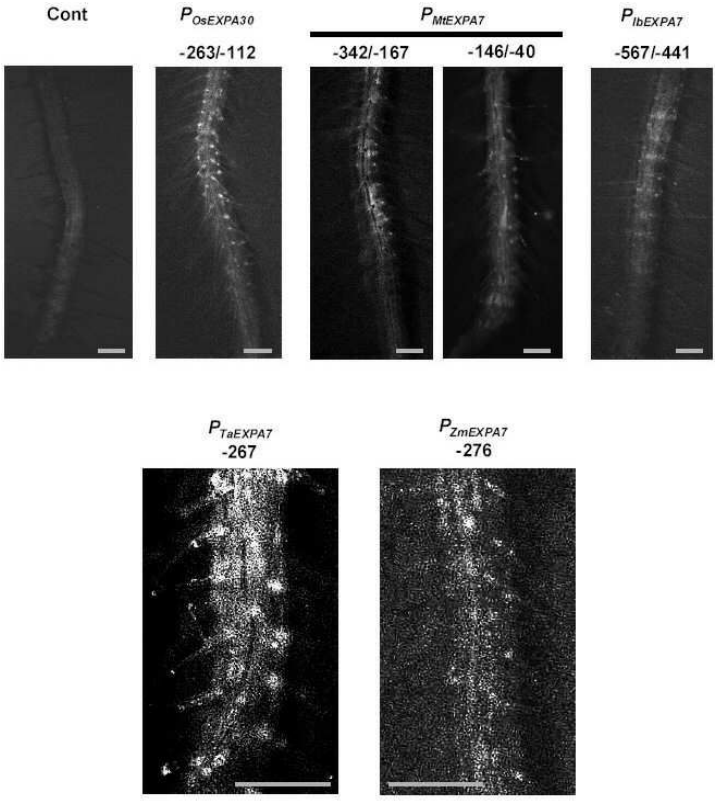
도면3b


AtEXPA1
AtEXPA15
AtEXPA10
OsEXPA5
AtEXPA5
OsEXPA21
AtEXPA14
OsEXPA11
AtEXPA16
AtEXPA4
AtEXPA6
AtEXPA9
AtEXPA3
OsEXPA7
OsEXPA6
AtEXPA8
PtEXPA1
OsEXPA2
OsEXPA4
AtEXPA2
PpEXPA1
MqEXPA1
RdEXPA1
OsEXPA3
OsEXPA33
OsEXPA9
OsEXPA8
AtEXPA17
OsEXPA19
OsEXPA20
OsEXPA18
OsEXPA28
OsEXPA31
OsEXPA27
OsEXPA15
OsEXPA25
AtEXPA11
OsEXPA12
OsEXPA1
OsEXPA29
OsEXPA13
OsEXPA24
OsEXPA23
OsEXPA14
OsEXPA22
AtEXPA22
AtEXPA26
AtEXPA23
AtEXPA25
AtEXPA24
AtEXPA21
AtEXPA13
OsEXPA10
MpEXPA1
OsEXPA17
ZmEXPA7
OsEXPA30
HvEXPA7
TaEXPA7
IbEXPA7
AtEXPA18
BoEXPA7
RsEXPA7
AtEXPA7
CmEXPA7
MtEXPA7
MtEXPA8
PpEXPA3
PpEXPA2
PpEXPA4
OsEXPA26
OsEXPA32
AtEXPA12
AtEXPA20
OsEXPA16
AtEXPB2
0.1

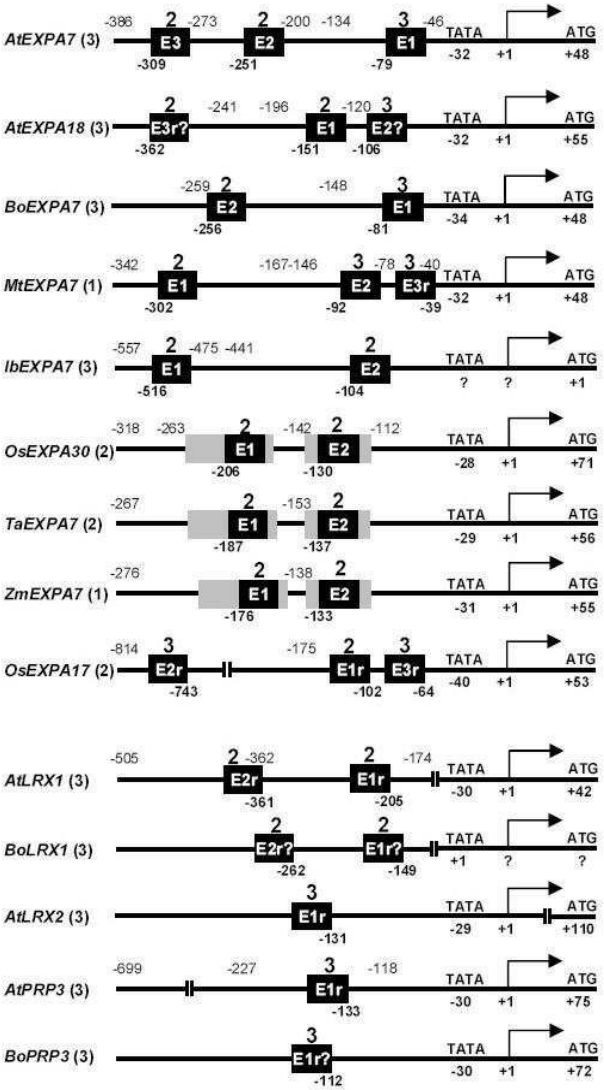
도면4a


A
Mutation of POsEXPA30
-1425
-318
-318 mE1
-142
-263/ -112
Cont
-318
Relative expression level
B
Mutation of POsEXPA17
-814
-175
Cont
-814
Relative expression level
C
Mutation of PTaEXPA7
-267
-267 mE1
-153
Cont
-267
Relative expression level
D
Mutation of PZmEXPA7
-276
-276 mE1
Cont
-276
Relative expression level
E
Mutation of PMtEXPA7
-342
-342 mE1
-146
-78
-342/ -167
-146/ -40
Cont
-342
Relative expression level
F
Mutation of PIbEXPA7
-567
-567 mE1
-475
-567/ -441
Cont
-557
Relative expression level
G
Mutation of PBoEXPA7
-259
-148
Cont
-148
Relative expression level
H
Mutation of PAtLRX1
-505
-362
-362 mE1
-174
Cont
-362
Relative expression level
I
Mutation of PAtPRP3
-699
-227
-227 mE1
-118
Cont
-227
Relative expression level

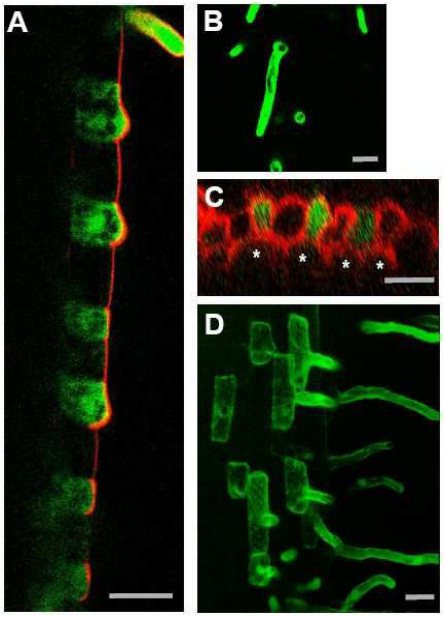
도면4b


Cont
$P_{OsEXPA30}$
-263/-112
$P_{MtEXPA7}$
-342/-167
-146/-40
$P_{IbEXPA7}$
-567/-441
$P_{TaEXPA7}$
-267
$P_{ZmEXPA7}$
-276

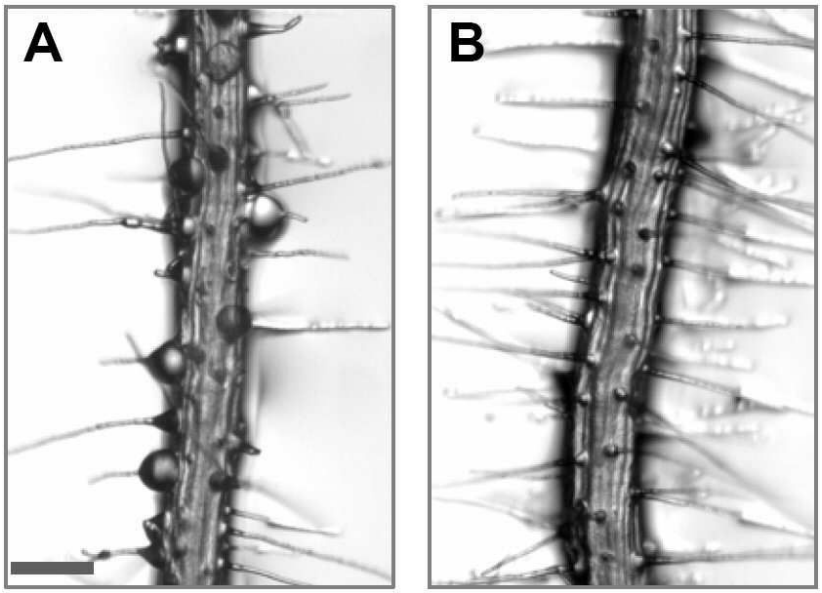
도면5


AtEXPA7 (3)
-386 2 -273 2 -200 -134 3 -46
E3 E2 E1
-309 -251 -79
TATA -32 +1 ATG +48
AtEXPA18 (3)
2 -241 -196 2 -120 3
E3r? E1 E2?
-362 -151 -106
TATA -32 +1 ATG +55
BoEXPA7 (3)
-259 2 -148 3
E2 E1
-256 -81
TATA -34 +1 ATG +48
MtEXPA7 (1)
-342 2 -167-146 3 -78 3 -40
E1 E2 E3r
-302 -92 -39
TATA -32 +1 ATG +48
IbEXPA7 (3)
-557 2 -475 -441 2
E1 E2
-516 -104
TATA ? ? ATG +1
OsEXPA30 (2)
-318 -263 2 -142 2 -112
E1 E2
-206 -130
TATA -28 +1 ATG +71
TaEXPA7 (2)
-267 2 -153 2
E1 E2
-187 -137
TATA -29 +1 ATG +56
ZmEXPA7 (1)
-276 2 -138 2
E1 E2
-176 -133
TATA -31 +1 ATG +55
OsEXPA17 (2)
-814 3 -175 2 3
E2r E1r E3r
-743 -102 -64
TATA -40 +1 ATG +53
AtLRX1 (3)
-505 2 -362 2 -174
E2r E1r
-361 -205
TATA -30 +1 ATG +42
BoLRX1 (3)
2 2
E2r? E1r?
-262 -149
TATA +1 ? ATG ?
AtLRX2 (3)
3
E1r
-131
TATA -29 +1 ATG +110
AtPRP3 (3)
-699 -227 3 -118
E1r
-133
TATA -30 +1 ATG +75
BoPRP3 (3)
3
E1r?
-112
TATA -30 +1 ATG +72

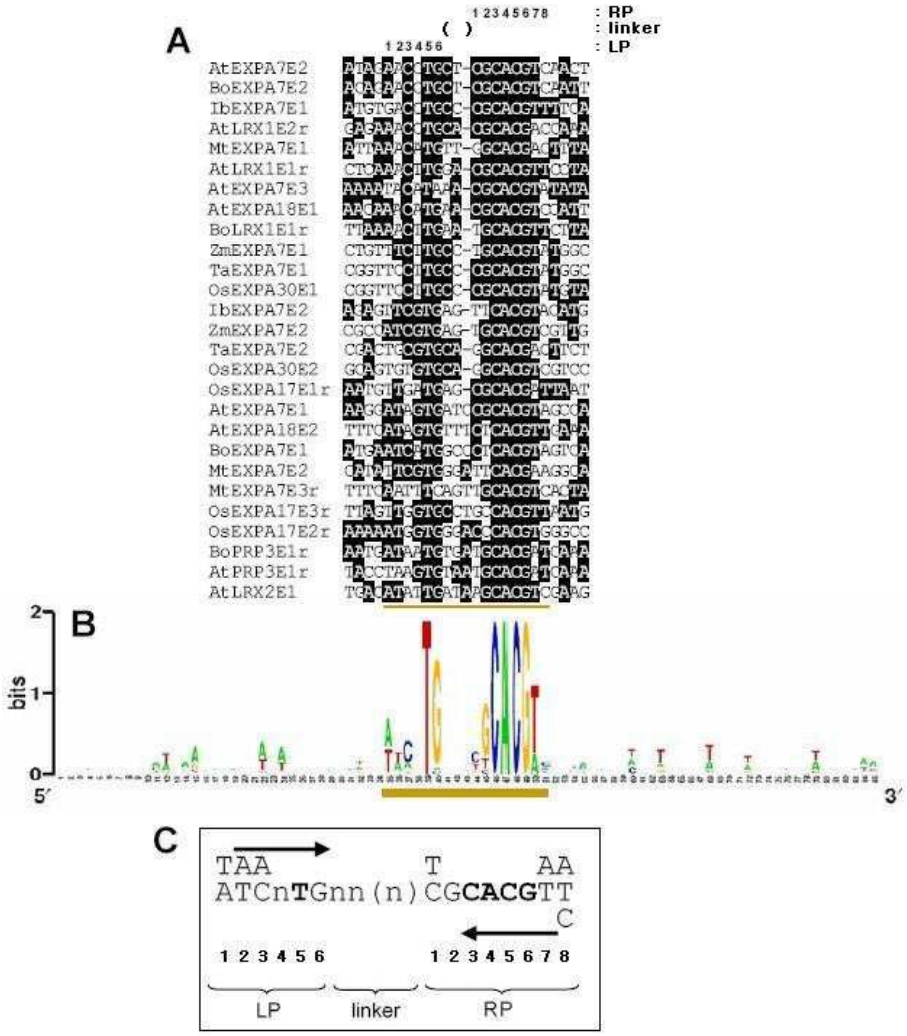
도면6



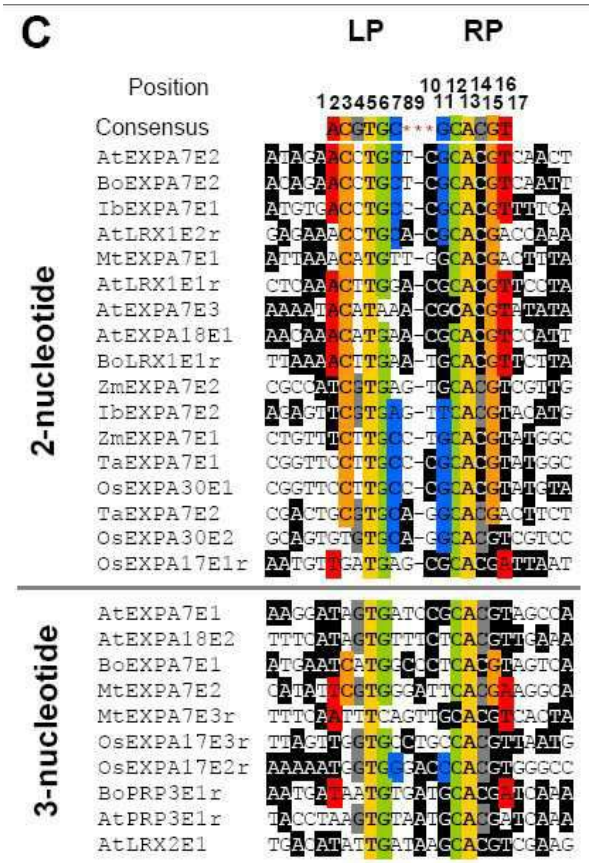
도면7



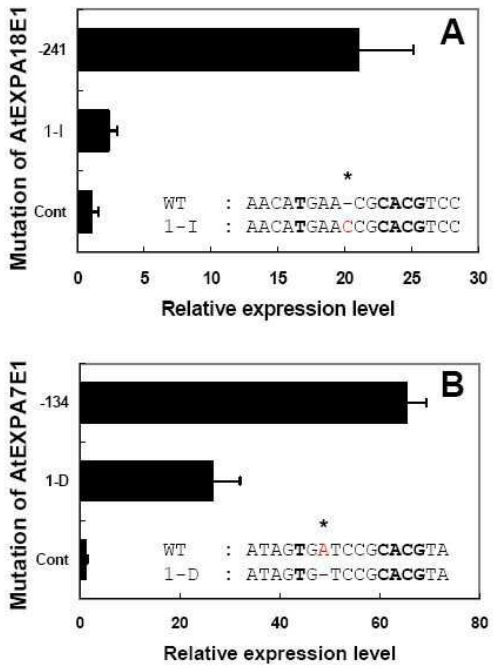
도면8a


A
1 2 3 4 5 6 7 8
( )
1 2 3 4 5 6
: RP
: linker
: LP
AtEXPA7E2
BoEXPA7E2
IbEXPA7E1
AtLRX1E2r
MtEXPA7E1
AtLRX1E1r
AtEXPA7E3
AtEXPA18E1
BoLRX1E1r
ZmEXPA7E1
TaEXPA7E1
OsEXPA30E1
IbEXPA7E2
ZmEXPA7E2
TaEXPA7E2
OsEXPA30E2
OsEXPA17E1r
AtEXPA7E1
AtEXPA18E2
BoEXPA7E1
MtEXPA7E2
MtEXPA7E3r
OsEXPA17E3r
OsEXPA17E2r
BoPRP3E1r
AtPRP3E1r
AtLRX2E1
B
bits
2
1
0
5′
3′
C
TAA T AA
ATCnTGnn(n)CGCACGTT
C
1 2 3 4 5 6
1 2 3 4 5 6 7 8
LP
linker
RP

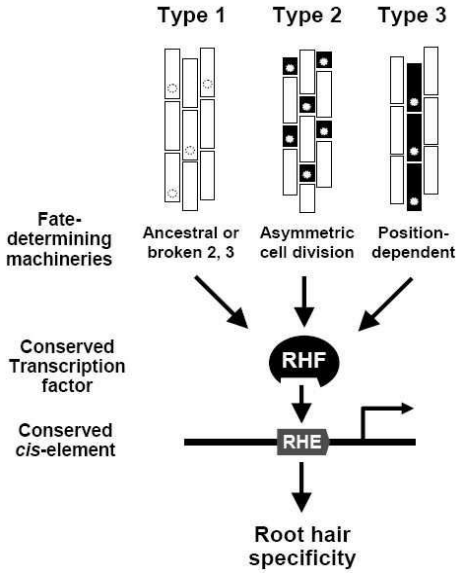
도면8b


C
LP
RP
Position
Consensus
2-nucleotide
3-nucleotide
AtEXPA7E2
BoEXPA7E2
IbEXPA7E1
AtLRX1E2r
MtEXPA7E1
AtLRX1E1r
AtEXPA7E3
AtEXPA18E1
BoLRX1E1r
ZmEXPA7E2
IbEXPA7E2
ZmEXPA7E1
TaEXPA7E1
OsEXPA30E1
TaEXPA7E2
OsEXPA30E2
OsEXPA17E1r
AtEXPA7E1
AtEXPA18E2
BoEXPA7E1
MtEXPA7E2
MtEXPA7E3r
OsEXPA17E3r
OsEXPA17E2r
BoPRP3E1r
AtPRP3E1r
AtLRX2E1

도면9


A
Mutation of AtEXPA18E1
-241
1-I
Cont
WT : AACATGAA-CGCACGTCC
1-I : AACATGAACCGCACGTCC
Relative expression level
B
Mutation of AtEXPA7E1
-134
1-D
Cont
WT : ATAGTGATCCGCACGTA
1-D : ATAGTG-TCCGCACGTA
Relative expression level

도면10


Type 1
Type 2
Type 3
Fate-determining machineries
Ancestral or broken 2, 3
Asymmetric cell division
Position-dependent
Conserved Transcription factor
RHF
Conserved cis-element
RHE
Root hair specificity

도면11a

Subject		Name[1]	Sequence (5′ to 3′)[2]
Deletion of $P_{AtEXPA7}$	-386	E7Hd1006F	TAG TTA AGC TTT GGA AAC GTA A
		E7Hd1346R	TAG AGA AGC TTT TCA ACG ACA GT
	-134	E7Hd1251F	TGA AAT CTA GAA AAT CCC AAT CGG TAC
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	-120	E7Hd1268F	CAA TCA AGC TTG ACA AAA GTC TCC AA
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	-110	E7Hd1278F	GGA CAA AGC TTT CCA ATA AAA AAG GA
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	-100	E7Hd1288F	CTC CAA AGC TTA AGG AAT TAA AAA AAA AA
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	-90	E7Hd1298F	AAA GGA AGC TTA AAA AAA AAG GAT AGT G
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	-80	E7Hd1308F	AAA AAA AGC TTG ATA GTG ATC CGC AC
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
GOF of $P_{AtEXPA7}$ RHEs	-386/-255	E7Hd1006F	TAG TTA AGC TTT GGA AAC GTA A
		E7Xb1152R	GGT TCT CTA GAC GAT ACG TGT ACC
	-386/-200	E7Hd1006F	TAG TTA AGC TTT GGA AAC GTA A
		E7Xb1211R	AAA GGT CTA GAG TTG TTT AAG TG
	-273/-200	E7Hd1116F	TTG GAA AGC TTC GGT ACA CGT
		E7Xb1211R	AAA GGT CTA GAG TTG TTT AAG TG
	-134/-46	E7Xb1251F	TGA AAT CTA GAA AAT CCC AAT CGG TAC
		E7Hd1346R	TAG AGA AGC TTT TCA ACG ACA GT
4-bp Mutations of $P_{AtEXPA7}$ RHE1	M1	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7M1	TGC GGA TCA CTC GAA TTT TTT TTT T
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	M2	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7M2	ACG TGC GGA TAC AGA TCC TTT TTT
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	M3	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7M3	GCT ACG TGC TTC GCA CTA TCC T
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	M4	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7M4	GGT GGC TAC TGT AGG ATC ACT A
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT

도면11b

	M5	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7M5	TAG TGG TGG AGC AGT GCG GAT C
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	M6	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7M6	ACA GTA GTG TGT TCT ACG TGC G
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	M7	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7M7	TCA ACG ACA GTC TGT GTG GCT ACG TGC
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	M8	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7M8	ATT TTC AAC GAT GAC AGT GGT GGC TAC
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
1-bp Mutations of $P_{AtEXPA7}$ RHE1	1	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-1R	GTG CGG ATC ACT ATC ATT TTT TT
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	2	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-2R	GTG CGG ATC ACT ATA CTT TTT TTT
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	3	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-3R	GCG GAT CAC TAG CCT TTT TTT
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	4	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-4R	GCG GAT CAC TCT CCT TTT TTT
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	5	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-5R	GCG GAT CAC CAT CCT TTT TTT
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	6	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-6R	CGT GCG GAT CAA TAT CCT TTT TT
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	7	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-7R	TGC GGA TCC CTA TCC TTT TTT
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	8	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-8R	CGT GCG GAT AAC TAT CCT TTT TT
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	9	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC

도면11c

		E7S1-9R	GGC TAC GTG TGG ATC ACT A
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	10	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-10R	GGC TAC GTT CGG ATC ACT A
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	11	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-11R	GGC TAC GGG CGG ATC ACT A
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	12	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-12R	GGT GGC TAC TTG CGG ATC A
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	13	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-13R	GGT GGC TAA GTG CGG ATC A
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	14	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-14R	GGT GGC TCC GTG CGG ATC A
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	15	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-15R	GTG GTG GCG ACG TGC GGA T
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	16	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7S1-16R	GTG GTG GAT ACG TGC GGA T
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
Mutation of $P_{AtEXPA1S}$	-241	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A
		E18Xb2103R	TTT ACT CTA GAT TCT TGA GGG CGC CT
	-196	E18Hd1845F	AAG TAA AGC TTA CTA ATA AAA TAA TTA GAA
		E18Xb2103R	TTT ACT CTA GAT TCT TGA GGG CGC CT
	E18M1	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A
		E18M2	GCA TTC TAA TTA CCG AGC TCG TTA GTT TTA CTT TC
		E18Xb2103R	TTT ACT CTA GAT TCT TGA GGG CGC CT
	E18M2	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A
		E18M3	TCC CTT CGC AGG AGC TCT ATT TTA TTA GTT AGT
		E18Xb2103R	TTT ACT CTA GAT TCT TGA GGG CGC CT
	E18M3	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A
		E18M4	TGG TCT GTG CAC AGA GCT CCA TTC TAA TTA TT
		E18Xb2103R	TTT ACT CTA GAT TCT TGA GGG CGC CT
	E18M4	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A

도면11d

		E18M5	GTT CAT GTT TGG AGC TCG TGA TGC CTC CCT TC
		E18Xb2103R	TTT ACT CTA GAT TCT TGA GGG CGC CT
	E18M5	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A
		E18M6	GGA CGT GCG TGA GCT CGG GTT TTG GTC TGT G
		E18Xb2103R	TTT ACT CTA GAT TCT TGA GGG CGC CT
	E18M6	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A
		E18M7	AGT AAG TAA TGG CAT GTA TTT CAT GTT TGT TT
		E18Xb2103R	TTT ACT CTA GAT TCT TGA GGG CGC CT
	E18M7	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A
		E18M8r	AAC AAG TAA GTG CCT CAC GTG CGT TCA TG
		E18Xb2103R	TTT ACT CTA GAT TCT TGA GGG CGC CT
	E18M8	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A
		E18M9r	ACA AGA ACA AGG CCT GAA TGG ACG TGC GT
		E18Xb2103R	TTT ACT CTA GAT TCT TGA GGG CGC CT
GOF of $P_{AtEXPA18}$ RHEs	-241/-120	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A
		E18Xb1939R	AAG AGT CTA GAC AAG TAA GTA ATG G
	-196/-120	E18Hd1845F	AAG TAA AGC TTA CTA ATA AAA TAA TTA GAA
		E18Xb1939R	AAG AGT CTA GAC AAG TAA GTA ATG G
	-241/-120, E18M6	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A
		E18Xb1939R	AAG AGT CTA GAC AAG TAA GTA ATG G
EXPA7 ortholog coding regions	RsEXPA7	BE7267F	TCG ATT ACT TCA TCA ACA AAC AAA CCA AAA AG
		BE71325R	TAG ACG GAG CAA CGT TCC AAG CAT AG
	MtEXPA7 MtEXPA8	ME7RT20F	CAA TCT ATC AAT ATT GTA GCT TGT TC
		ME7RT844R	AAA CAA GTA AAT TAA AAG GAT GAG C
	HbEXPA7 TaEXPA7 ZmEXPA7	Os30,1691F	CAC GCC ACG TTC TAC GGC GAC GAG AC
		Os30,2650R	TAC GAC GCG CCC CAG TTG TGG CTC AT
	CmEXPA7 IbEXPA7	E7Or247dF	GCC ACY TTY TAY GGY GA
		E7Or1010dR2	CCC CAR TTR TGG CTC AT
EXPA7 ortholog promoters	IbEXPA7	IbE7R	GCT AGA TGA AAC AAG GCC TAA GAT AAA TTG
		IbE7nstR	AAC ATA TTT TAT GGC GAA AAT ACG TAC CCA
	MtEXPA7	ME7,104R	AAT GTG CCC ATT ACT AAA GCT GGC TTT CC
		ME7,73nstR	GAT TGT GAG CAT CAA TGT AAG TGT AAT GAA C
	TaEXPA7	Ts7,106R	CGA TAC ATC AGC ATA ACA AGG AAC CGA A
		Ts7,83R	CCG AAT AAG CAT GCA TGG TCA TTG AC
	ZmEXPA7	ZmE7R	TCT GGT AGC ACG TCC CGC ACC CGT A
		ZmE7nstR	CCG TCC TTG AAC AGC GTC GTG CTC A
	Adaptor	AP1	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C

도면11e

	primers	AP2	ACT ATA GGG CAC GCG TGG T
Mutation of $P_{OsEXPA30}$	-1425	OE7Hd64F	AGC ACA AGC TTG AGA TGG ACA AGA GGG A
		OE7Xm1573R	CAT TGC CCG GGT CTT GTC CTG CTC GTG GT
	-318	OE7Hd1171F	TCC ACA AGC TTA ATT GAA CAA GGA CAC T
		OE7Xm1573R	CAT TGC CCG GGT CTT GTC CTG CTC GTG GT
	-318mE1	OE7Hd1171F	TCC ACA AGC TTA ATT GAA CAA GGA CAC T
		OE7mega1321R	ACC GGA CGC TAC AGC ATG TAT TGC AAG GAA CCG AGC T
		OE7Xm1573R	CAT TGC CCG GGT CTT GTC CTG CTC GTG GT
	-142	OE7Hd1347F	CTA ACA AGC TTC ACG ATT CGC AGT GTG TG
		OE7Xm1573R	CAT TGC CCG GGT CTT GTC CTG CTC GTG GT
	-263/-112	OE7Hd1229F	GAC ACA AGC TTA CAC CCA CTC TGC CGT
		OE7Xb1397R	ACT TCT CTA GAC GAC GTG CCT GCA
Mutation of $P_{OsEXPA17}$	-814	OsE17Hd316F	GAG AGA AGC TTG AAG GCC GAA GGG GAA GAT
		OsE17Xb1191R	GCT ATT CTA GAC GAT CGG CGG CGA G
	-175	OsE17Hd955F	GTG GCA AGC TTG TCC TGC AAG CAT T
		OsE17Xb1191R	GCT ATT CTA GAC GAT CGG CGG CGA G
Mutation of $P_{TaEXPA7}$	-267	Ta7Hd165F	GTT CCA AGC TTC AAA ATT CCT TT
		Ta7Xm500R	CAT TGC CCG GGC TTC GCT TT
	-267mE1	Ta7Hd165F	GTT CCA AGC TTC AAA ATT CCT TT
		Ta7mg283R	TAC GGC GTG CCA GCA TGT ATT GCA AGG AAC CGA
		Ta7Xm500R	CAT TGC CCG GGC TTC GCT TT
	-153	Ta7Hd281F	GTA CAA AGC TTC ACG ATT TCG
		Ta7Xm500R	CAT TGC CCG GGC TTC GCT TT
Mutation of $P_{ZmEXPA7}$	-276	Zm7Hd734F	CTA CGA AGC TTC TCA AGA AGC CCA
		Zm7Xm1072R	CAT TAC CCG GGC TGT TTC C
	-276mE1	Zm7Hd734F	CTA CGA AGC TTC TCA AGA AGC CCA
		Zm7mg867R	TCG GTC CAG CCA GCA TGT ATT GCA AGA AAC AGA
		Zm7Xm1072R	CAT TAC CCG GGC TGT TTC C
Mutation of $P_{MtEXPA7}$	-342	Mt7Hd39F	TGT GAA AGC TTT GTT AAT CCT
		Mt7Xm429R	AAG ATC CCG GGT AAA TTA ATG AAT GTG A
	-342mE1	Mt7Hd39F	TGT GAA AGC TTT GTT AAT CCT
		Mt7mg111R	ACA AAA TAT AAA TGA TGT AAA ACA TGT TTA ATC AT
		Mt7Xm429R	AAG ATC CCG GGT AAA TTA ATG AAT GTG A
	-146	Mt7Hd241F	CAA ACA AGC TTA CAA CAT CAG
		Mt7Xm429R	AAG ATC CCG GGT AAA TTA ATG AAT GTG A
	-78	Mt7Hd308F	GAA GGA AGC TTC TTT CAA TTA G
		Mt7Xm429R	AAG ATC CCG GGT AAA TTA ATG AAT GTG A

도면11f

	-342/-167	Mt7Hd39F	TGT GAA AGC TTT GTT AAT CCT
		Mt7Xb234R	TTA TTG TCT AGA AAC AGT ATT GC
	-146/-40	Mt7Hd241F	CAA ACA AGC TTA CAA CAT CAG
		Mt7Xb356R	ATA ACT CTA GAT TTC AGT TGC A
Mutation of $P_{IbEXPA7}$	-567	Ib7Hd15F	CCT TTA AGC TTG ATA AGC ACA T
		Ib7Xm594R	GCC ATC CCG GGT AAT TTG GTT G
	-567mE1	Ib7Hd15F	CCT TTA AGC TTG ATA AGC ACA T
		Ib7mg100R	TGA AAG TTG AAA CAT GTA TTG CAG GTC ACA TA
		Ib7Xm594R	GCC ATC CCG GGT AAT TTG GTT G
	-475	Ib7Hd95F	CTT TCA AGC TTT TCT TCA AAC AA
		Ib7Xm594R	GCC ATC CCG GGT AAT TTG GTT G
	-567/-441	Ib7Hd15F	CCT TTA AGC TTG ATA AGC ACA T
		Ib7Xb160R	TTA TAT CTA GAA TTC AAA TTC ATT GTT
Mutation of $P_{BoEXPA7}$	-256	BE7Hd59F	TTC TTA AGC TTC ACT TAA ACA ATA ATT TGA CTT GT
		BE7Xb337R	ACC CAT CTA GAG TTT CCT TTT TGT TTT CGA TG
	-148	BE7Hd169F	ACG TCA AGC TTA AAC ACA CAG AAA
		BE7Xb337R	ACC CAT CTA GAG TTT CCT TTT TGT TTT CGA TG
Mutation of P_{AtLRX1}	-505	AlxHd488F	TTG CTA AGC TTT TGG AAG ACT
		AlxXb1005R	ATG GGT CTA GAA ACC CAA TTT
	-362	AlxHd599F	GCG TGA AGC TTT CTC TTT CTT
		AlxXb1005R	ATG GGT CTA GAA ACC CAA TTT
	-362mE1	AlxHd599F	GCG TGA AGC TTT CTC TTT CTT
		Alxmg768R	CTC AAA CTT GGA ATA CAT GTC CTA GAG GTT CTA
		AlxXb1005R	ATG GGT CTA GAA ACC CAA TTT
	-174	AlxHd785F	GGT TTA AGC TTC CCG CAA AGG T
		AlxXb1005R	ATG GGT CTA GAA ACC CAA TTT
Mutation of P_{AtPRP3}	-699	Ap3Hd1248F	TAA CAA AGC TTC GAT CAT TAG TCA A
		Ap3Xb1990R	TGG CTT CTA GAT TGC CTT AAG CTA G
	-227	Ap3Hd1691F	AGC CAA GCT TAC GTC TTT TCA GTT
		Ap3Xb1990R	TGG CTT CTA GAT TGC CTT AAG CTA G
	-118	Ap3Hd1799F	ATG AGA AGC TTA AAC ATA CAT GAT TAT
		Ap3Xb1990R	TGG CTT CTA GAT TGC CTT AAG CTA G
1-bp insertion/deletion in RHEs	1-D of $P_{AtEXPA7}$ E1	E7Hd1254F	AAT GAA AGC TTT CCC AAT CGG TAC
		E7D1336R	TAC GTG CGG ACA CTA TCC TTT
		E7Xb1457R	GGA CCC ATT CTA GAC TCT TT
	1-I of $P_{AtEXPA18}$ E1	E18Hd1799F	GAC CAA AGC TTA AAA AAT GAA AGA A
		E18A1917R	GGA CGT GCG GTT CAT GTT T

도면11g

		E18Xb2103R	TTT ACT CTA GAT TCT TGA GGG CGC CT
AtLRX1 coding region		Alx1Xm1971F	GTA AAC CCG GGT TTC TTG ACC CAT AAG CAA
		Alx1Sc4287R	TGA GTG AGC TCG TTA ATC ATA AGG CAA TGC