



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월20일
(11) 등록번호 10-1880394
(24) 등록일자 2018년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8261 (2013.01)
C12N 15/8216 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0037884
(22) 출원일자 2017년03월24일
심사청구일자 2017년03월24일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150120135 A*
GenBank Accession Number AP014963
(2015.10.10.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
안진홍
경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 210동 1703호
(공세동, 탑실마을대주피오레2단지아파트)
윤진미
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교국제캠퍼스)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 20 항

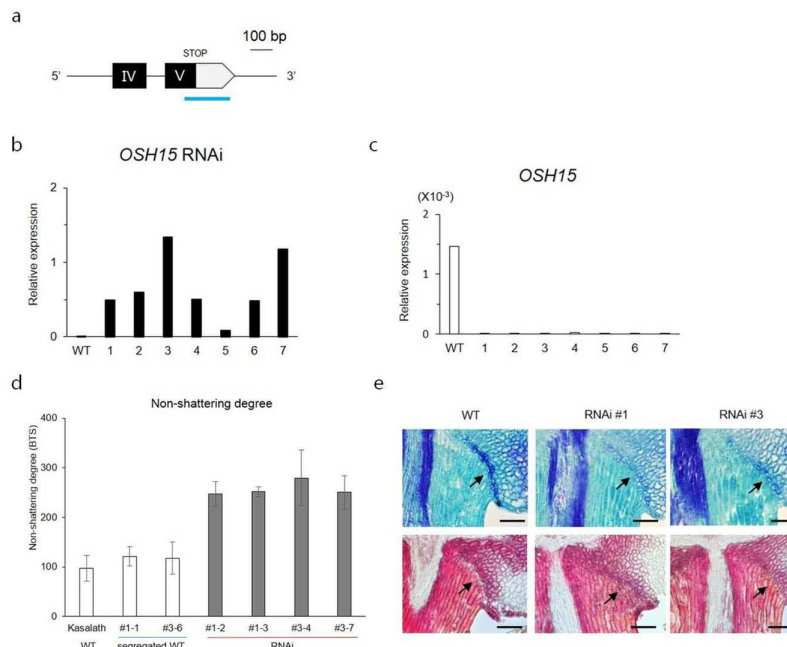
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 LOC_Os07g03770 유전자를 이용하여 식물체의 탈립성을 조절하는 방법

(57) 요약

본 발명은 LOC_Os07g03770 유전자를 이용하여 식물체의 탈립성을 조절하는 방법에 관한 것으로, 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 억제하는 제제를 포함하는 식물체의 탈립성 감소용 조성물, 상기 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는 탈립성이 감소된 형질전환 식물체의 제조방법, 상기 제조방법에 의해 제조된 탈립성이 감 (뒷면에 계속)

대표도 - 도4



소된 형질전환 식물체, 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 식물체의 탈립성 확인용 조성물 및 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는 식물체의 탈립성을 확인하는 방법에 관한 것이다.

LOC_0s07g03770(OSH15) 유전자의 발현 억제제를 이용한 본 발명에 따른 식물체의 탈립성 감소용 조성물, 탈립성이 감소된 형질전환 식물체의 제조방법 등은 식물체의 탈립성을 감소시킬 수 있으므로, 벼의 수확량 증대 및 재배에 유용하게 활용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/8218 (2013.01)
C12Q 1/6895 (2018.05)
G01N 33/68 (2013.01)
C12Q 2600/13 (2013.01)
G01N 2333/415 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ011080
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	경희대학교(용인) 산학협력단
연구사업명	차세대바이오21
연구과제명	벼의 생산량 및 개화 시기 조절 유전자 발굴 및 육종소재 개발
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교(용인) 산학협력단
연구기간	2015.01.15 ~ 2017.12.31
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 LOC_0s07g03770의 mRNA 또는 단백질 수준을 억제하는 제제를 포함하는, 식물체의 탈립성 감소용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 mRNA는 서열번호 2로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제제는 LOC_0s07g03770 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브인 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제제는 LOC_0s07g03770 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 제제는 상기 LOC_0s07g03770 유전자의 RNAi 또는 T-DNA를 포함하는 재조합 벡터인 것인, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 RNAi는 서열번호 13으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 T-DNA는 서열번호 14로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 식물체는 벼(*Oryza Sativa*), 밀(*Triticum aestivum* L.) 또는 토마토(*Lycopersicon esculentum*)인 것인, 조성물.

청구항 10

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_0s07g03770 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 탈립성이 감소된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 단계는 제1항의 조성물을 식물체에 도입하여 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 12

제10항의 제조방법에 의해 제조된 탈립성이 감소된, 형질전환 식물체.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 식물체는 벼(*Oryza Sativa*), 밀(*Triticum aestivum* L.) 또는 토마토(*Lycopersicon*

esculentum)인 것인, 식물체.

청구항 14

서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 LOC_0s07g03770 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 식물체의 탈립성 확인용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 mRNA는 서열번호 2로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 제제는 LOC_0s07g03770 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브인 것인, 조성물.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 제제는 LOC_0s07g03770 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것인, 조성물.

청구항 19

서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 LOC_0s07g03770 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 식물체의 탈립성을 확인하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 mRNA 또는 단백질 수준이 대조구 시료의 것보다 감소하는 경우, 탈립성이 감소한 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 LOC_0s07g03770 유전자를 이용하여 식물체의 탈립성을 조절하는 방법에 관한 것으로, 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 억제하는 제제를 포함하는 식물체의 탈립성 감소용 조성물, 상기 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는 탈립성이 감소된 형질전환 식물체의 제조방법, 상기 제조방법에 의해 제조된 탈립성이 감소된 형질전환 식물체, 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 식물체의 탈립성 확인용 조성물 및 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는 식물체의 탈립성을 확인하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리나라의 주요한 식량 자원인 벼는 전 세계적으로도 주요한 식량 자원으로 인식되며, 옥수수, 보리, 밀과 함께 생산성을 증대시키기 위한 관련 연구가 계속해서 진행되어 왔다. 그러나, 생산 지역에 따라 기후가 전혀 다르고, 지구 온난화 등의 등의 환경 변화가 급격히 이루어짐에 따라 더 높은 생산성을 갖도록 하기 위하여 품종 개량에 대한 지속적인 연구와 개발 등은 여전히 필요하다. 이에, 기존에 사용하던 육종 방법과 더불어, 유용한 유전자의 기능을 분석하고 이를 삽입 또는 결실시킴으로써 재배 환경에 더 적합한 벼 품종을 개발하는 연구가 꾸준히 수행되고 있다.

[0003] 한편, 현재 우리가 사용하는 재배벼는 고대 야생형 벼로부터 선택적 교화 과정을 통해 형성된 것으로서, 가장 대표적으로 변화된 형질은 벼의 탈립성이다. 야생형 벼는 자연적으로 더 멀리 종자를 번식시키기 위해 탈립성이 높은 형질을 가지는데 반하여 재배벼는 탈립성이 클 경우 종자의 수확량이 크게 감소하므로, 이를 줄이는 방향으로 교화가 이루어졌다. 이와 관련하여, 탈립성 관련 유전자를 발굴하기 위해 탈립성이 높은 야생형과 특성이

유사한 벼를 재배벼와 교배한 뒤 QTL(quantitative trait loci) 분석을 수행한 연구(J Hered. 2014 Mar-Apr;105(2):276-87.)가 진행된 바 있으나, 탈립성 관련 유전자의 발굴 및 응용 연구는 여전히 부족한 실정이다.

[0004] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 탈립성이 감소되어 수확량이 증대된 벼를 개발하고자 예의 노력 연구한 결과, LOC_0s07g03770 유전자가 벼의 탈립성을 조절하는 기능을 수행하고, 상기 유전자의 발현이 억제되는 경우에는 벼의 탈립성이 감소됨을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 LOC_0s07g03770의 mRNA 또는 단백질 수준을 억제하는 제제를 포함하는, 식물체의 탈립성 감소용 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_0s07g03770 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 탈립성이 감소된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 제조방법에 의해 제조된 탈립성이 감소된, 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 LOC_0s07g03770 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 식물체의 탈립성 확인용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 LOC_0s07g03770 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 식물체의 탈립성을 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 LOC_0s07g03770의 mRNA 또는 단백질 수준을 억제하는 제제를 포함하는, 식물체의 탈립성 감소용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에서는, LOC_0s07g03770 유전자는 벼의 탈립성을 조절하는 기능을 수행함을 확인하였고, 상기 유전자의 발현을 억제하면 벼의 탈립성을 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

[0012] 본 발명의 용어, "탈립성"(shattering property)은 작물의 낱알이 이삭으로부터 떨어지는 특성을 의미한다. 탈립성이 크다는 것은 낱알이 이삭으로부터 떨어지는 정도가 크다는 것을 의미하는데, 이는 수확 이전에 낱알의 손실을 유발하므로 수확량을 증대시키기 위해서는 탈립성을 적절히 감소시킬 필요가 있다.

[0013] 본 발명의 용어, "탈립성 감소용 조성물"은 식물체의 탈립성 감소를 유도하는 조성물을 의미한다.

[0014] 본 발명의 용어, "LOC_0s07g03770 유전자"는 호메오박스(homeobox) 단백질의 일종인 OSH15를 암호화하고 있는 유전자를 의미한다. 상기 유전자의 게놈(genome) DNA 크기는 6124 bp이고, 코딩 서열(coding sequence)의 크기는 1068 bp로서 5개의 엑손(exon)과 4개의 인트론(intron)으로 구성되며, 355개 아미노산으로 번역되어 단백질이 만들어진다. 본 명세서에서, 상기 "LOC_0s07g03770 유전자"는 "OSH15 유전자"와 동일한 의미로 혼용되어 사용될 수 있다.

[0015] 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 상기 유전자의 발현이 감소되는 경우에 벼의 탈립성이 감소되므로, 상기 유전자의 발현 수준, 즉 mRNA 또는 단백질 수준을 억제함으로써 벼의 탈립성을 감소시킬 수 있다.

[0017] 본 발명의 용어, "LOC_0s07g03770 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 억제하는 제제"는 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현을 억제할 수 있는 제제로서, 구체적으로 상기 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브, 또는 상기 유전자의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있다. 또한, 상기 유전자의 발현을 억제할 수 있는 서열 및 구조를 포함하는 재조합 벡터일 수 있으며, 더욱 구체적으로 상기 유전자의 RNAi 또는 T-DNA를 포함하는 재조합 벡터일 수 있다.

[0018] 본 발명의 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보

적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.

[0019] 본 발명의 용어, "프로브"는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는, 라벨링(labeling)된 핵산 단편을 의미한다. 구체적인 예로, 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단일 사슬 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중 사슬 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브, 올리고펩타이드(oligonucleotide peptide) 프로브, 폴리펩타이드 프로브(polypeptide) 등의 형태로 제작될 수 있다.

[0020] 본 발명의 용어, "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미한다. 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 될 수 있다.

[0021] 본 발명의 용어, "애타머"는 단일 가닥 올리고 뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 상기 애타머는 그 염기서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 애타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 애타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있으나 이들에 한정되지 않는다.

[0022] 본 발명의 용어, "RNAi"는 RNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 구체적인 예로, miRNA(microRNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA or small hairpin RNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide) 등이 이에 해당된다. 상기 RNAi는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고, 미스매치(mismatch, 대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(bulge, 일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음)등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분도 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 RNAi는 서열번호 13으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 용어, "T-DNA"(transfer DNA)는 종양-유도 플라스미드(tumor-inducing plasmid, Ti plasmid)로부터 분리되어 숙주 식물체의 DNA 게놈으로 삽입되는 DNA를 의미한다. T-DNA는 삽입 돌연변이를 통해 타겟 유전자의 기능을 파괴하므로, 식물의 유전자 기능 연구에 주로 활용된다. 구체적으로, 상기 T-DNA는 서열번호 14로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 상기 재조합 벡터는 상기 유전자의 RNAi 또는 T-DNA를 포함하는 재조합 벡터라면 이에 제한되지 않지만, 구체적으로 pCambia계열, pGA계열, pGWB계열, 더욱 구체적인 예로 pGA3383, pCambia3301, pCambia3300, pGA3426, pGA3780, pGWB12, pGWB14 등의 Ti-plasmid 및 이에 파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0025] 본 발명에서, 상기 LOC_0s07g03770 유전자의 mRNA는 서열번호 2로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 LOC_0s07g03770 유전자의 단백질은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0026] 본 발명에서 이용되는 서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, "실질적인 동일성"은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(alignment)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0027] 따라서, 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 14로 표시되는 서열과 높은 상동성을 갖는 서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90% 이상의 높은 상동성을 갖는 서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0028] 본 발명에서, 상기 식물체는 벼(*Oryza Sativa*), 밀(*Triticum aestivum* L.) 또는 토마토(*Lycopersicon*

esculentum)일 수 있으며, 구체적으로 벼(*Oryza Sativa*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0029] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, LOC_Os07g03770 유전자는 이삭 발달 8단계 이후까지 탈립에 주요한 역할을 수행하는 탈리층에서 특이적으로 발현됨을 확인하였으며(도 2), T-DNA 태깅(tagging) 또는 RNAi(RNA interference)에 의해 상기 유전자의 발현이 억제된 형질전환 벼에서는 탈립성이 크게 감소하며, 탈리층의 발달 또한 정상적으로 이루어지지 않음을 확인하였다(도 3 및 4). 이는, 상기 LOC_Os07g03770 유전자의 발현을 억제하는 본 발명의 조성물은 벼의 탈립성을 감소시키는데 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0030] 다른 하나의 양태는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 LOC_Os07g03770 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 탈립성이 감소된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명에서, 상기 LOC_Os07g03770 유전자의 발현을 억제하는 단계는 본 발명의 식물체의 탈립성 감소용 조성물을 식물체에 도입하여 수행되는 것일 수 있으며, 구체적으로 LOC_Os07g03770 유전자의 RNAi 또는 T-DNA를 포함하는 재조합 벡터가 식물체에 도입되는 것일 수 있다.
- [0032] 상기 도입은 형질전환과 동일한 의미로 사용될 수 있는데, 상기 도입 또는 형질전환은 당업계에 알려진 임의의 방법을 통해 수행될 수 있다. 구체적인 예로, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법, 원형질체의 전기천공법, 식물 요소로의 현미주사법, 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법, 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염 등이 수행될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서는, 각 프라이머를 이용하여 증폭한 LOC_Os07g03770 유전자의 RNAi 또는 T-DNA를 pGA3720 및 pGA3426 벡터에 연결하여 재조합 벡터를 제작하였고, 상기 재조합 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스 균주에 형질전환시킨 후, 상기 균주를 식물체를 형질전환시킨으로써 상기 유전자의 RNAi 또는 T-DNA를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 도입하였다(실시예 1 및 2). 또한, 상기 형질전환 식물체는 LOC_Os07g03770 유전자의 발현이 억제되어, 탈립성이 감소됨을 확인하였다(도 2 내지 4). 이는, 상기 LOC_Os07g03770 유전자의 발현을 억제하면 탈립성이 감소된 형질전환 식물체를 제조할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0034] 또 다른 하나의 양태는 상기 제조방법에 의해 제조된 탈립성이 감소된, 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0035] 본 발명에서, 상기 형질전환 식물체는 LOC_Os07g03770 유전자의 발현이 억제되어 탈립성이 감소된 식물체일 수 있다.
- [0036] 구체적으로, 상기 식물체는 벼(*Oryza Sativa*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에서는, T-DNA 태깅(tagging) 또는 RNAi(RNA interference) 방법을 통해 LOC_Os07g03770 유전자의 발현이 억제된 형질전환 벼를 제작하였고, 상기 벼는 야생형 벼인 카살라쓰(Kasalath) 품종보다 탈립성이 감소됨을 확인하였다(도 3 및 4).
- [0038] 또 다른 하나의 양태는 LOC_Os07g03770 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 식물체의 탈립성 확인용 조성물을 제공한다.
- [0039] 상기 유전자의 발현이 감소되는 경우에 벼의 탈립성이 감소되므로, 상기 유전자의 발현 수준, 즉 mRNA 또는 단백질 수준을 측정함으로써 벼의 탈립성을 확인할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서, 상기 mRNA는 서열번호 2로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 단백질은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 특별히 이에 제한되지 않지만, LOC_Os07g03770 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.
- [0042] 또한, 상기 유전자의 단백질 수준을 측정하는 제제는 특별히 이에 제한되지 않지만, LOC_Os07g03770 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있다.
- [0043] 또 다른 하나의 양태는 LOC_Os07g03770 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 식물체의 탈립성을 확인하는 방법을 제공한다.
- [0044] 상기 유전자의 발현이 감소되는 경우에 벼의 탈립성이 감소되므로, 상기 유전자의 발현 수준, 즉 mRNA 또는 단백질 수준을 측정함으로써 벼의 탈립성을 확인할 수 있다.
- [0045] 상기 방법은, LOC_Os07g03770 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준이 대조구 시료의 것보다 감소하는 경우, 탈립성

이 감소한 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 이때, 상기 "대조구 시료"는 형질전환되지 않은 야생형 식물체, 구체적으로 야생형 벼를 의미한다.

[0047] 본 발명에서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계는 RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RTPCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 칩 분석법 등의 방법을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0048] 또한, 상기 유전자의 단백질 수준을 측정하는 단계는 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 면역 전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

발명의 효과

[0050] LOC_Os07g03770(OSH15) 유전자의 발현 억제를 이용한 본 발명에 따른 식물체의 탈립성 감소용 조성물, 탈립성이 감소된 형질전환 식물체의 제조방법 등은 식물체의 탈립성을 감소시킬 수 있으므로, 벼의 수확량 증대 및 재배에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 LOC_Os07g03770(OSH15) 유전자의 프로모터(pOSH15) 및 이에 연결된 GUS 유전자의 모식도이다.

도 2는 이삭 발달 단계에 따른 LOC_Os07g03770(OSH15) 유전자의 프로모터(promoter)의 활성을 보여주는 이미지이다. AZ는 탈리대(abscission zone), PA는 내화영(palea), SL은 불임성 외화영(sterile lemma), LE는 외화영(lemma) 및 PE는 꽃자루(pedicel)를 의미한다.

도 3은 T-DNA 태깅(tagging)에 의해 LOC_Os07g03770(OSH15) 유전자의 발현이 억제된 형질전환 벼의 탈립성을 보여주는 그래프 및 이미지로서, a는 T-DNA의 삽입 위치, b는 형질전환 벼의 OSH15 유전자 발현량, c는 형질전환 벼의 탈립성, 및 d는 형질전환 벼의 탈리층 발달 정도에 관한 것이다.

도 4는 RNAi(RNA interference)에 의해 LOC_Os07g03770(OSH15) 유전자의 발현이 억제된 형질전환 벼의 탈립성을 보여주는 그래프 및 이미지로서, a는 RNAi(RNA interference)가 작용하는 위치, b는 형질전환 벼의 OSH15 RNAi 발현량, c는 형질전환 벼의 OSH15 유전자 발현량, d는 형질전환 벼의 탈립성, 및 e는 형질전환 벼의 탈리층 발달 정도에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0054] 실시예 1. LOC_Os07g03770 유전자의 발현 양상 확인

[0055] LOC_Os07g03770(OSH15) 유전자의 기능을 확인하기 위하여, 먼저 상기 유전자의 발현 양상을 확인하고자 하였다.

[0056] 구체적으로, 프로모터-GUS 형질전환체를 이용하여 상기 유전자의 프로모터(promoter)의 활성을 확인하였다. 하기 표 1에 기재한 프라이머를 이용하여 LOC_Os07g03770 유전자의 프로모터(pOSH15) 부위(서열번호 4)를 클로닝하였고, 이를 프로모터-GUS 형질전환체의 제작에 이용하여 GUS 유전자의 발현을 관찰하였다. 이때, pOSH15-GUS 유전자의 모식도는 도 1에 나타내었다.

표 1

프라이머 정보	서열 (5'-3')	서열번호
LOC_Os07g03770 pro GUS F	GTTAACCTCAGCCTCACTGAAGTAG	5
LOC_Os07g03770 pro GUS R	TCTAGACCTCCTCCTCCAAGATTCC	6

[0058] 더욱 구체적으로, PCR은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 45초, 57℃에서 30초, 50℃에서 10초, 62℃에서 4분을 35회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 7분을 진행하였다. PCR 산물은 아가로스 겔을 사용하여 전기영동함으로써 정적 크기의 사이즈를 확인하였고, 이를 분리동정하여 T-easy 벡터(sub-cloning용 벡터)에 클로닝하여 염기서열을 분석하였다. 클로닝한 DNA를 제한효소인 Kpn I 과 BamH I 으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단된 pGA3519 벡터(promoter GUS expression vector)와 라이게이션을 수행하였다. 상기 라이게이션 산물을 Top10 대장균(*E.coli*) 컴피턴트(competent) 세포 50μl과 혼합하여 1.5 ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 37℃ 오븐에 1분 동안 다시 방치한 후, 1 ml의 LB 액체 배지를 추가로 튜브에 넣은 다음 1시간 동안 37℃ 셰이킹(shaking) 인큐베이터에 방치하였다. 이어서, 앰피실린(ampicillin) 저항성 LB 고체 배지에 도말하였고, 생성되는 콜로니(colony)를 1 ml의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 DNA를 추출하였다. 상기 DNA를 제한효소 Kpn I 와 BamH I 을 사용하여 절단한 후, 전기영동을 통해 아가로스 겔을 분리하여 밴드를 확인하였다. 상기 DNA를 염기서열 분석함으로써, 오류가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다.

[0059] 최종적으로 선별한 DNA는 아그로박테리움 투마파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* LB4404)에 형질전환하였다. 아그로박테리움 컴피턴트 세포(competent cell) 50μl와 10μg의 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 액체질소에 1분 동안 넣은 후, 37℃ 오븐에 5분 동안 방치하는 과정을 3회 반복하였으며, 1 ml의 YEP 액체 배지를 넣은 다음 5시간 동안 28℃ 셰이킹 인큐베이터에 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 생성되는 콜로니를 1 ml의 테트라사이클린 항생제가 든 YEP 액체 배지에서 배양하였고, DNA를 추출하여 제한효소 KpnI로 절단한 후, 사이즈를 확인함으로써 아그로박테리움에 상기 DNA가 도입되었음을 확인하였다. 전술한 방법으로 제작한 형질전환 아그로박테리움을 이용하여 벼를 형질전환하였다.

[0060] 인디카(indica) 품종의 카살라쓰(Kasalath) 종자로부터 벼의 캘러스를 생성하였다. 생성된 캘러스를 상기 형질전환된 아그로박테리움과 혼합하였고, 아세토시린곤(Acetosyringone)을 포함한 N6D 배지에서 22℃의 암조건의 생장실에 생육하였다. 상기 캘러스를 세포탁심(cefotaxime)이 첨가된 3차 증류수로 행구어 낸 다음 N6D 고체 배지에서 하이그로마이신(hygromycin) 선발을 1차(hygromycin 30 mg/L), 2차(hygromycin 40 mg/L)에 걸쳐서 계대 배양을 통해 진행하였다. 선발은 28℃의 생장실에서 각각 2주 동안, 총 4주 수행하였다. 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR(hygromycin 40 mg/L) 고체 배지에 옮겨 4주 동안 28℃의 광조건 생장실에서 생육하여 재분화를 유도한 후, MS 고체 배지로 옮겨 7일 동안 28℃의 광조건 생장실에서 생육한 후 온실로 옮겨 형질전환 식물체를 키웠다.

[0061] 그 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, 탈립에 주요한 역할을 수행하는 탈리층의 발달은 이삭 발달 7단계에서 시작됨을 알 수 있었으며, LOC_0s07g03770 유전자의 발현은 이삭 발달 8단계 이후까지 탈리층에서 특이적으로 나타남을 확인하였다.

[0062] 실시예 2. LOC_0s07g03770 유전자의 탈립 조절 기능 확인

[0063] 실시예 2-1. T-DNA 태깅(tagging) 형질전환체의 이용

[0064] LOC_0s07g03770(OSH15) 유전자가 탈립 조절 기능을 나타내는지 확인하기 위하여, T-DNA가 태깅(tagging)되어 상기 유전자의 발현이 억제된 T-DNA 돌연변이 형질전환체의 표현형을 관찰하였다.

[0065] 구체적으로, 상기 실시예 1에 따른 방법으로 형질전환 아그로박테리움 및 형질전환 식물체를 제조하였다. 이후, 10만 계통의 T-DNA 돌연변이 집단에서 LOC_0s07g03770 유전자의 T-DNA 태깅(tagging) 계통인 '1D-03912'을 선발하였다. 이때, T-DNA 유전형 분석용 프라이머, 및 OSH15 유전자 발현 분석용 프라이머는 하기 표 2에 기재하였다.

표 2

프라이머	서열 (5'-3')	서열번호
1D-03912 L	TCACCCATGCATATCAACAG	7
1D-03912 RS	CCTCCTCCAAGATTCCCAA	8
LOC_0s07g03770 F	GAGAGAGAGCCTAGCTGCTA	9
LOC_0s07g03770 R	CGTGACCGTGGTACTGCGA	10

[0067] 더욱 구체적으로, T-DNA 삽입에 의해 제조된 상기 1D-03912 계통은 pGA2772 벡터에 의해 유전자가 트랩(trap)된

것으로서, T-DNA가 삽입된 위치를 확인하기 위해 유전형 분석(genotyping)을 실시하였다. 상기 선발된 계통의 벼 종자를 MSO 배지에서 10일간 배양하였고, 잎 100mg을 채취하여 액체질소를 이용하여 급냉각한 후 분쇄하였다. 분쇄된 잎에서 CTAB 완충용액(2% CTAB, 1.42M NaCl, 20mM EDTA (pH8.0), 100mM Tris-Cl (pH8.0))을 이용하여 게놈 DNA를 추출한 뒤, PCR 분석을 통해 유전형을 분석하였다.

[0068] 또한, 상기 계통에서 LOC_Os07g03770 유전자 발현을 관찰하기 위하여 벼의 절간(internode) 샘플을 이용하였다. 절간 조직 100 mg을 채취하여 액체질소를 이용해 급속냉동시켰고, 냉동된 절간 조직을 분쇄하여 RNA iso 완충용액(takara, <http://www.takara-bio.com>)을 사용하여 토탈(total) RNA를 분리하였다. 2 μ g의 토탈 RNA에 대하여 역전사효소(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase; Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 PCR을 통해 관찰하였고, 이에 대해 정량적 실시간 PCR(quantitative real time PCR)을 수행하였다.

[0069] 그 결과, 도 3의 a 및 b에서 볼 수 있듯이, 선발한 형질전환 벼에서는 OSH15 유전자의 개시 코돈인 ATG로부터 380 bp 앞에 T-DNA가 태깅됨을 확인하여 OSH15 유전자가 적절하게 발현되지 못할 것임을 알 수 있었으며, 벼의 절간(internode)에서는 LOC_Os07g03770 유전자의 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0070] 또한, 도 3의 c에서 볼 수 있듯이, 야생형 벼에서는 탈립성을 반대로 나타내는 BTS(Breaking tensile strength) 값이 약 170 정도인 것에 비하여, OSH15 유전자의 발현이 억제된 형질전환 벼(OSH15-1)에서는 그 값이 200 이상으로 증가하여 탈립성이 감소하는 것을 관찰할 수 있다.

[0071] 또한, 도 3의 d에서 볼 수 있듯이, 탈리층의 변화를 개화시기 이후까지 관찰한 결과 형질전환 벼에서는 탈리층의 발달이 억제됨을 확인하였다.

[0072] 실시예 2-2. RNAi(RNA interference) 형질전환체의 이용

[0073] LOC_Os07g03770(OSH15) 유전자가 탈립 조절 기능을 나타내는지 확인하기 위하여, RNAi에 의해 상기 유전자의 발현이 억제된 RNAi 형질전환체의 표현형을 관찰하였다. 이때, 형질전환체의 제작에는 자포니카(japonica) 계열의 품종보다 벼의 탈립성이 더 크게 나타나는 인디카(indica) 계열의 카살라쓰(Kasalath) 품종을 이용하였다.

[0074] 구체적으로, 도 4의 a에 나타난 바와 같이, RNAi는 OSH15 유전자의 3'-UTR 부위 쪽의 265 bp 서열을 이용하였고, RNAi 제작에 사용한 프라이머는 하기 표 3에 기재하였다.

표 3

프라이머	서열 (5'-3')	서열번호
LOC_Os07g03770 3'UTR RNAi F	ACCCACAGAATGCTGCTGCA	11
LOC_Os07g03770 3'UTR RNAi R	GGGTACCAACATTACTGGAGAACTATAAGCC	12

[0076] 더욱 구체적으로, LOC_Os07g03770 유전자의 발현을 감소시키기 위해 3'-UTR의 265bp에 대해 PCR를 수행하였으며, 프라이머 중에서 역방향 프라이머(서열번호 12)에는 Kpn1 site인 'GGGTACC'의 염기를 추가하여 제작하였다. PFU를 이용한 PCR 산물에 대하여 EtOH ppt를 수행한 다음 Kpn1 제한효소를 이용하여 효소 절단을 수행하였다. pGA3720(Amp 저항성 유전자/pGA3591(RV)) 벡터를 SmaI 효소로 절단하여 Amp 링커를 겔 용출(gel elution)하였고, binary vector backbone으로 사용할 pGA3426 벡터를 Kpn1 효소로 절단하여 상기 3가지 절단 산물에 대해 삼중(triple) 라이게이션을 수행하였다. 라이게이션을 수행한 DNA를 대장균 Top10에 형질전환하였고, 테트라사이클린(tetracycline)과 앰피실린에 모두 저항성을 가지는 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니는 액체배지에서 배양한 후 DNA를 추출하였고, Kpn1 효소로 절단하여 최종확인한 후, 염기서열 분석을 통해 서열상 오류가 없는 DNA를 선별하였다. 이후, 상기 실시예 1에 따른 방법으로 형질전환 아그로박테리움 및 형질전환 식물체를 제조하였다.

[0077] 그 결과, 도 4의 b 및 c에서 볼 수 있듯이, 7개 라인(#1 내지 #7)의 RNAi 형질전환체의 잎 조직에서는 OSH15 유전자의 RNAi의 발현이 월등히 증가하는 반면, OSH15 유전자의 발현은 현저히 감소함을 확인하였다.

[0078] 또한, 도 4의 d 및 e에서 볼 수 있듯이, 상기 RNAi 형질전환체에서 2개 라인(#1 및 #3)을 최종 선발하여 T2 세대의 분리된 야생형(segregated WT)과 탈립성을 비교한 결과, RNAi 형질전환체에서 탈립성이 크게 감소하며, 탈리층의 발달도 정상적으로 이루어지지 않음을 확인하였다.

[0079] 상기 결과를 통해, LOC_Os07g03770(OSH15) 유전자는 벼의 탈립성을 조절하는 기능을 수행함을 확인하였고, 상기

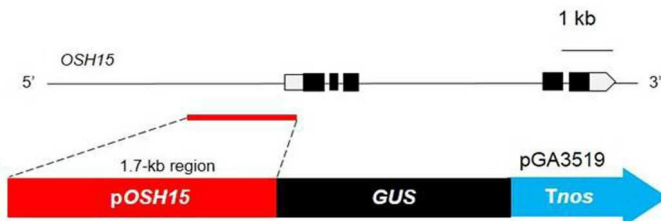
유전자의 발현이 감소하면 벼의 탈립성이 감소하므로 이의 발현을 감소시킴으로써 수확량이 증대된 벼를 제조할 수 있음을 확인하였다.

[0080]

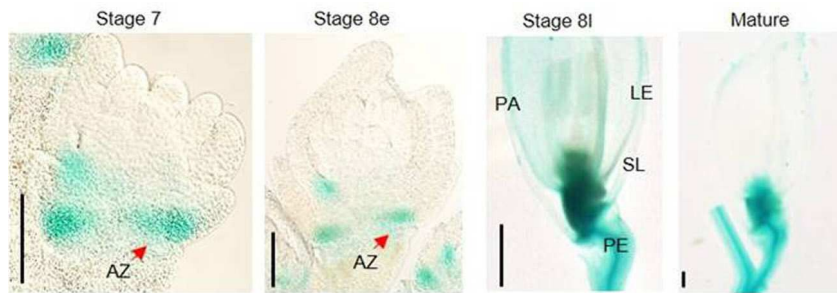
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

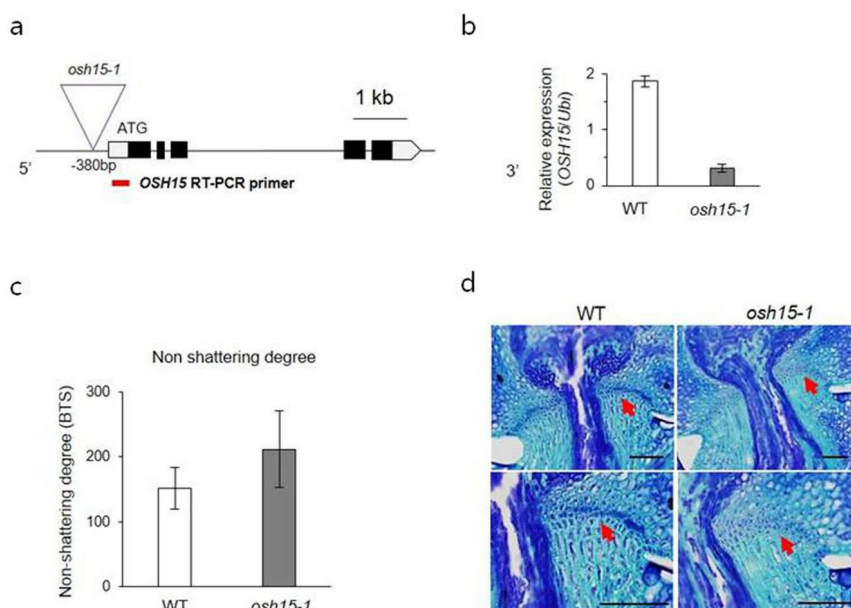
도면1



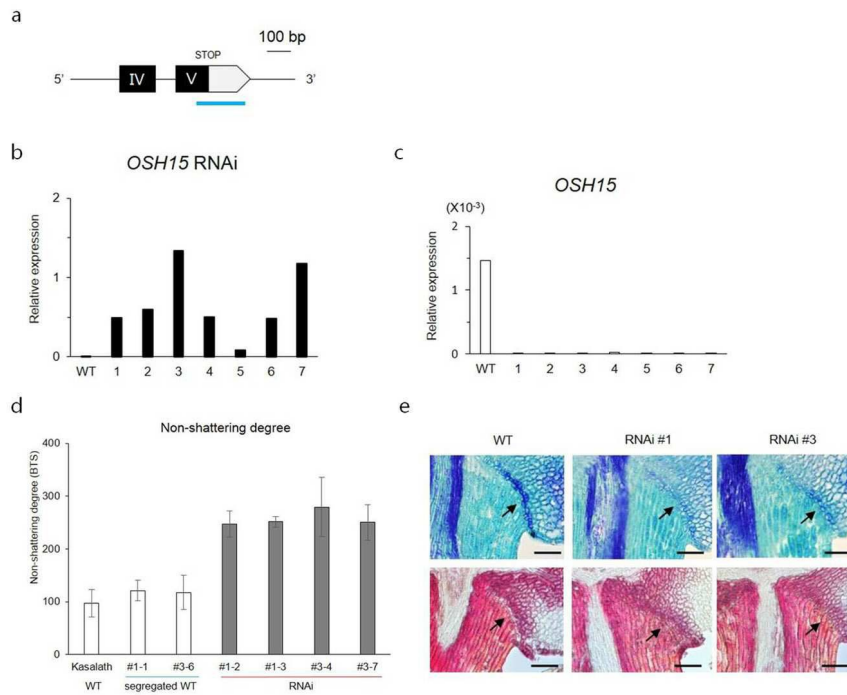
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> A method for controlling shattering property of plants using
LOC_Os07g03770 gene

<130> KPA170135-KR

<160> 14

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 6124

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

gtagtatata cctccacatt tcccttccat taatacctcc acccccact cctctcccc 60

atctcccctc cctctcgcca ttggagctag acagctcgag ctccaggagg aagaagagag 120

agagcctagc tgctagggtt tccatcggaat ttggtttttt atttctttt tgtttttgt 180

gtgtgttttg atggatcaga gctttgggaa tcttggagga ggaggaggag caggggggag 240

cggcaaggcg gcggcgctgt cgttcctgca gctgccgtg tccacggcgg cggcggccac 300

cgcgtactac ggcacggcgc tcgcttgca ccaggcggcg gccgcggctg gcccgctgca 360

gtaccacggt cacggtcacc cccaccacgg cggcggccac caccacagca agcacggcgg	420
cgccggtggt ggggagatct cggcggcgga ggccgagtc atcaaggcca agatcatggc	480
gcacccccag tactccgccc tctctgcagc ctacctcgac tgccagaaag tatatacgt	540
cgattaattc ttctccgatt ttgttgaaca aaatactccg tagtaattat ctatcgatca	600
tatatatcac tgcaattttg atccatccat ccatccaggt cggagcgccg ccggagggtgc	660
tggagaggct gaccgccacg gcggcaaagc tggacgcccg ccctcccggc cgccacgacg	720
cgcgcgaccc ggagctcgac cagttcatgg ttctgttcgtc ccccccaac tccggcgacc	780
agttcatata tctttcatga tatattgacc cgtccgtacg acgttgaatc gatcaatcac	840
cgatgttggt tgcatctgac ggggttgatt atcggaatcg aatcaatctt cgacgcagga	900
ggcgtactgc aacatgctgg ccaagtacag ggaggagctg acgcgccgga tcgacgaggc	960
catggagttc ctcaagaggg tggagtcgca gctcgacacc atcgccggcg gcgccccatgg	1020
cgccggcgcc ggctcggcgc gcctcctcct cgccggtaaa tcaaccaatc atccatcccc	1080
ctcctcctgc tctcgctgc ggttttactt ctatttacac acatgctcct tctgtttctt	1140
ctcttctgct gctgctgctg ctgctgatga tgatgatctc gtcgtcggcg gcgatggcgg	1200
cggcggcgcc ggccggaggt taccgcatta ggaaatagtt tgatccggat aatggagggtg	1260
gttgctttgg atgattgcca ttgttagtat agctacccat ccaaagccct gtggattagt	1320
aatttattta ttggggttag taacaagacg cttttgcagc agcatgcact aacaaaagta	1380
attaaactaa caattagtag cggcttagtc gattgattaa tctaatactg ttggcaacca	1440
gggcactgtg agcaaccatg tctcaagctt ctctctctct cgtttcagca gcttcacctc	1500
cattgtttat tgcatccatc catccatcca tggcagcagc tagcacagcc tagttgcaaa	1560
acacaacaca tgctagcctt tcaactcaac catttctttt ttccctctt tcttttggcc	1620
atgaattgtc tcttctctct tcttttctt actgctctac tagatgacaa gtgactagaa	1680
gccttgtctt tagggttcca aggcatgcag ggcagaggag agaatcagcc tgtctataga	1740
ctaatagcta gattgatgga gattctgaat ggtgattaag ccagtaaac aatggtttga	1800
ggaagagtat tataactaca tagagatgta tggcagtaca agcttggta atcatctctc	1860
tggttctgctc tgattggata gcatgcatgc atctaccccg gatcagtagt attattcttt	1920
tcttctctca gtggaagtag agccatatgc attggaaatt gttgtcatgg ggctagctag	1980
gtaccaatg ttgcagcagc actgtiacgaa ccgtctttct tcttcgcagc tagcactgca	2040
gctgttcttg taatggtttt gggatgcagc acagattcat ctgggcgttc gtgttttccg	2100
gggggttcta ctgtcattg ctgcagggca ggataatcaa ttaatatgat agagatctga	2160
tgaactgttg atagactact gttgaatgct ttttattttc tgtgcatata tatatgtata	2220

gaagtattgg agaagagtgt ctgattggta gatcaaaacta ggtcagttgc atttgattca	2280
tgatggaaat taagacagtt gttggagctt gccagctgct actagtagtt ttcctttttt	2340
tttcttgtga aagattcaat ttgattaagc agagatgcaa ctttattagg caatattagt	2400
ggaagtcctt taaatgaaaa gttacagaac catatattat caaaggtttt tatgaacaat	2460
atacaaatat attctatgat ctttttttat attactaaat ctatgttcgt cagatattgg	2520
gaaagattca cccggcactt atgctgcaaa tgtgaactct tctctattat ctaaaacaaa	2580
tgggagagat tactagtttc ttatctctgt gatgctcaaa acctcacatg gtgattctgt	2640
attctctcta tataagccta gcgcatctat gctgaatfff cacaataaaa tctcaactat	2700
tgaaattagg ccacttcaaa agatcttttg tcaatgagtt tgctatatgt tggtttactt	2760
ctatgattgc ttttttgata atgtatttca tctcatcttc gcgcatgcat gcccggttat	2820
ttattgccag ttatgtgttc catttgagat ttaaagaacc agctaataata ttattattgt	2880
ttttcttgtt tgttatggta tgacaactgt cctagcaaat ccacatccac acatcgatct	2940
atatactta accaatcagc aaggctctat ttgtttgtat agatcagcat gttgtttata	3000
tcgcatcatt ggtattaaat tgtaacagtt gcctactata ctggtgaaac ttctgccttt	3060
aaaacaaatg acactagctt atacattaaa caaatatgat tgtgcaaatg catttactaa	3120
ttttttttat ctaataaact gtgcttgtca ctgtcagtg tttacaaaac tgtccatttt	3180
tcagtcattc ataagtgtca gttccgcac cattagtttt agtattatgg tttcctactc	3240
ttgccatgta tgcttaatta gattcatttt gctgaaactt ggaaaattac cattaatgtg	3300
tccaaatcca tggactgggt ttgattttat aattttatca aaactgtttg agaaatgtat	3360
ttttcaaatg aattatcatg ttactcatt ccacaagtta attaacgtgt ttctcctcaa	3420
aataagctaa tgcgttttct ataggcgcca caaataaaaa gcaaagggtt cattcacaaa	3480
attttgaagg ttttttttag caaataccaa gtgccatgtt attaaaagat taaaatcttg	3540
tcactgttaa tgcattagta catcaggaat aattcttttt ctgcgtagaa gcacaagggc	3600
aacattggtg tatttgtcat gccatttctt ttttcatgt tatttgtacc tcatcttaaa	3660
aaaaaggaga aagtattaca taggggacta atagcttatg tgaaagacca ccgactgggt	3720
tataattaaa cactggctca tttctttgaa gctttttttt taaggatctg gttttccctc	3780
tagtagttct gagctgatga aaagtttcta tagcgggtta ctgagagaat tacagtcatt	3840
gtgctacat gagaataaat acaataacag agtaacaacc atgagaatat gttcaagaac	3900
taatggattc taaaatttga aaggcgctta aaatgttttc ttgacactat tcatgatgag	3960

aattaaacgg ttaatcaagt aagacatggg acgataacaa ctactaccta atcctgtaaa	4020
tctacagaat ctccatgctt ttcagttgct ttttatgcac ccacaatata gttttcagtt	4080
gcatgttattc attggaggat gtagaatact catgcatgca caatttttta taatatgggg	4140
ccacatatat taicttttat tttcttgtat cacatcctgg gtcagatcaa caactgtcac	4200
tgtacagttt cctatgtata gatcaattat ttgtattgcc catctgaaat taagtattgg	4260
tcatatgtat ctttatttat ttggaagttg atctccgaat tattcaatta cataggccca	4320
agacaacgct ttatgtgtga ttttttgtt tctggttgta tggtagtaat tttgttttt	4380
ttgcttttat tttatccatt tctttgttat atgctatatt ctgtaggacg catggtcagc	4440
atgtgacat tctgtttaga gcagagaaat gctctgtcaa ttcittattt ctttccacta	4500
aatgattctt tatctactgc cataatatgt attcctttga ccatggacc aagttttta	4560
ggccaaagac ctagctttta tataaagcaa aagaacatag gtgataagag ataggaccaa	4620
gtttcagtc gtatcatttt tttcgtcgaa gcctgggact ctacgtatac ctagttcagt	4680
ggtttctact atttggttta tcaaacactg ttttaaacc ataactgca caccacaatc	4740
tggtaatat atctttcaac tggctgattt ggcacaaatc aaacctgaca aattaataaa	4800
cctaaagcag tgctagtttt atccttgtat tgaatacct tgtcttttca ctgcatagt	4860
tttttttacc gttttttata gtgttttctt ctacgaaatc agtagggcag gatccttctt	4920
gaaatccata ctctttactg tagctactct accagtagtc aaatacacag tgtacccta	4980
ttcttgcat ccaaaatgga tagagtgtt taccacagc tatgggcctt tctgcgtctg	5040
ttccattgct gaccaacatg gtctagactg aagctcatt caacaataca atagaaatct	5100
gatgaacaaa atgtagtatg atctcttaca ttaaccacct tttgtctgca gatggtaaat	5160
ctgaatgtgt tggttcttct gaggatgaca tggaccaag tggccgcgaa aacgagccgc	5220
ctgagatcga cccgcgcgct gaggataagg agctcaagtt tcagcttctg aagaagtaca	5280
gtggctactt gagcagccta aggcaagaat tttcaagaa aaagaagaaa ggaaagctgc	5340
ctaaggaggc caggcagaag ctgcttact ggtgggagct gcactacaag tggccttacc	5400
cctcagtaag attacacata caaaattacc tgataatata tagtaattgc cacaattacc	5460
taatgcatac atagtcttac aaacatctta gttcagatca gatgcatcat cacattgtta	5520
ctaactttgc accaatggga tgagttaggag acggagaaga ttgcgcttgc ggaatcgaca	5580
ggactagatc agaagcagat caacaactgg ttcatcaacc agaggaaacg gcactggaag	5640
ccatcgagg acatgccgtt cgtcatgatg gaaggttttc acccacagaa tgctgctgca	5700
ttgtacatgg atggccggtt catggcagat ggaatgtacc gcctcggttc gtgaacctcg	5760
atctcagatc tcggcgtgtt tgatgagaga tccaatgcca agataaattg atcatggaat	5820

gtattcagca tgcgttgcaa tgcattggaca ttgttatgga atttttgggt tatttacctt 5880
tcaccgtgga ttgacaagggt ctcatcatg ttagtggtga tggcttatag ttctccagta 5940
atgttggtgt ttttctttc gatggcttgt aaaagtttag gtgtatcgga atttcgatca 6000
acttgctcgt acgctggtaa ttaatttgggt gatggtctat atgttgatg gttgtgcgtt 6060

tcagattggt gttcaaagtt gcctatctga aacaattata tatatttata ttgcttctca 6120
tttt 6124

<210> 2
<211> 1068
<212> DNA
<213> Oryza sativa
<400> 2

atggatcaga gctttgggaa tcttgaggga ggaggaggag caggggggag cggcaaggcg 60
gcggcgctgt cgttcttga gctgccgtg tccacggcgg cggcggccac cgcgtactac 120
ggcacgccg tcgcttga ccaggcggcg gccgcggctg gcccgtcgca gtaccacggt 180
cacggtcacc cccaccacgg cggcggccac caccacagca agcacggcgg cggcgggtgt 240

ggggagatct cggcggcgga ggccgagtcc atcaaggcca agatcatggc gcacccccag 300
tactccgcc tcttcgcagc ctacctgac tgccagaaag tcggagcgcc gccggaggtg 360
ctggagaggc tgaccgccac ggcggaag ctggacgcc gccctcccgg ccgccacgac 420
gcgcgcgacc cggagctga ccagttcatg gaggcgtact gcaacatgct ggccaagtac 480
agggaggagc tgacggcgcc gatcgacgag gccatggagt tcctcaagag ggtggagtcg 540
cagctcgaca ccatcgcccg ggcgccccat ggcgcgggcg ccggctcggc gcgcctctc 600
ctgccgatg gtaaatctga atgtgttgggt tcttctgagg atgacatgga cccaagtggc 660

cgcgaaaacg agccgcctga gatcgaccg cgcgtgagg ataaggagct caagtttcag 720
cttctgaaga agtacagtgg ctacttgagc agcctaaggc aagaatttcc caagaaaaag 780
aagaaaggaa agctgcctaa ggaggccagg cagaagctgc ttacttggtg ggagctgcac 840
tacaagtggc cttaccctc agagacggag aagattgcgc ttgcggaatc gacaggacta 900
gatcagaagc agatcaacaa ctggttcatc aaccagagga aacggcactg gaagccatcg 960
gaggacatgc cgttcgtcat gatggaaggt tttcacccac agaatgctgc tgcattgtac 1020
atggatggcc cgttcattggc agatggaatg taccgcctcg gttcgtga 1068

<210> 3
<211> 355

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 3

Met Asp Gln Ser Phe Gly Asn Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Lys Ala Ala Ala Ser Ser Phe Leu Gln Leu Pro Leu Ser Thr

20 25 30

Ala Ala Ala Ala Thr Ala Tyr Tyr Gly Thr Pro Leu Ala Leu His Gln

35 40 45

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Ser Gln Tyr His Gly His Gly His Pro

50 55 60

His His Gly Gly Gly His His His Ser Lys His Gly Gly Ala Gly Gly

65 70 75 80

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Glu Ala Glu Ser Ile Lys Ala Lys Ile Met

85 90 95

Ala His Pro Gln Tyr Ser Ala Leu Leu Ala Ala Tyr Leu Asp Cys Gln

100 105 110

Lys Val Gly Ala Pro Pro Glu Val Leu Glu Arg Leu Thr Ala Thr Ala

115 120 125

Ala Lys Leu Asp Ala Arg Pro Pro Gly Arg His Asp Ala Arg Asp Pro

130 135 140

Glu Leu Asp Gln Phe Met Glu Ala Tyr Cys Asn Met Leu Ala Lys Tyr

145 150 155 160

Arg Glu Glu Leu Thr Arg Pro Ile Asp Glu Ala Met Glu Phe Leu Lys

165 170 175

Arg Val Glu Ser Gln Leu Asp Thr Ile Ala Gly Gly Ala His Gly Gly

180 185 190

Gly Ala Gly Ser Ala Arg Leu Leu Leu Ala Asp Gly Lys Ser Glu Cys

195 200 205

Val Gly Ser Ser Glu Asp Asp Met Asp Pro Ser Gly Arg Glu Asn Glu

210 215 220

Pro Pro Glu Ile Asp Pro Arg Ala Glu Asp Lys Glu Leu Lys Phe Gln

225 230 235 240
 Leu Leu Lys Lys Tyr Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Leu Arg Gln Glu Phe
 245 250 255
 Ser Lys Lys Lys Lys Lys Gly Lys Leu Pro Lys Glu Ala Arg Gln Lys
 260 265 270

Leu Leu His Trp Trp Glu Leu His Tyr Lys Trp Pro Tyr Pro Ser Glu
 275 280 285
 Thr Glu Lys Ile Ala Leu Ala Glu Ser Thr Gly Leu Asp Gln Lys Gln
 290 295 300
 Ile Asn Asn Trp Phe Ile Asn Gln Arg Lys Arg His Trp Lys Pro Ser
 305 310 315 320
 Glu Asp Met Pro Phe Val Met Met Glu Gly Phe His Pro Gln Asn Ala
 325 330 335
 Ala Ala Leu Tyr Met Asp Gly Pro Phe Met Ala Asp Gly Met Tyr Arg

 340 345 350

Leu Gly Ser

355

<210> 4

<211> 1742

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 4

tcacgacctc acigaactag cacaactttt ttaatttaat tatttacatc ctacatacat 60
 catgtaatta catctattta ttgcattaca attacattac atcataggtt ttagagtttt 120
 tttttaacgt tagatactcc tgtatagtac tcctttttat ttacttttcg tatttacgag 180
 ttcttaatac tacagtcacg tataaagagg agagagaggg ttgtgagaac gttttacgtt 240
 cccaagaatc tatcttttca tcttcacccg ggcggtggtg aaaaagagga gggcagccag 300

tgagaacaac agaaaaaac agtgagacga cagatatatg gaccagaacg ggaagagaga 360
 acacaacaaa caccgaactc aaccaggcat ttgctgtctgc tgctgtctgt gcatgtgtga 420
 aactgaaagg agtaaaaccc atggtgaaag caaggacaat aatgacaat aaatttgtcc 480
 tctattccct ccttaaatga caagagcaac ataaaaaatc aaaatttcag gatacttcgg 540
 gtgtgtctag ttcacgttaa aattgaaagt ttagttaaaa ttagaacgat gtgatggaaa 600

agttagaagt ttatgtgtgt atgaaaattt tgatgtgatg aaaaagataa aagtttttag 660
 aaaaagtttg gaactaaaca aggccgaatc ttcattctca aactttaatt cctccttttt 720

tattatTTTT ttaaaattat taaatgatat atatatctta aaaaattcta taaagatgtt 780
 atttaaaaat tcaataaat atttttttaa aatttataat tattaatact ttattaatta 840
 tgtgctaagt agttttctcg ttccacgtgt attgaaaatc tctctccgga cttccgggaa 900
 aaattcagca tagctaggaa tcccaacata aacgttcaga ttacaagta gaagttatag 960
 ttattacga gacatagtag atcaaggatc catggacaga tataataat cacccatgca 1020
 tatcaacagt aatgaaactt tttaacaca caatcaacag taatctaag gactggtacc 1080
 agtataatcc tactactagt agtagcatag ctcaatgagt tcttaattag taatcagatg 1140

gtcaatacac acccaaacta tatagtttag ctgcaaactt cagtcctttt ccatcacatc 1200
 aacctgtcat acacacacaa cttttcagtc gcatcatctc caatttcaac caaaattcaa 1260
 actttggatc caactaaaa cagccttagt agctgggatc agcagttatc agatttgcaa 1320
 gctgggagta attaagtaga gtacgtgtac acagtagaag tagggtatga tccatatgat 1380
 attccctccc ttcttccca gcttgcaaat ctctcgtctt ctctctcgt ctttggtgtg 1440
 gatttgacgc gagaaaaagg atagccacc gccatcgccc acacgctcgc gcacatagc 1500
 tacacctccc cttgcgcgta gtataacct ccacctttcc cttccattaa tacctccacc 1560

ccccactcct ctccccatc tccctccct ctgcctattg gagctagaca gctcgagctc 1620
 caggaggaag aagagagaga gcctagctgc tagggtttcc atcggtttg gttttttatt 1680
 ttctttttgt ttcttgtgtg tgttttgatg gatcagagct ttgggaatct tggaggagga 1740
 gg 1742

<210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LOC_0s07g03770 pro GUS F primer
 <400> 5
 gttaactcac gacctactg aactag 26

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> LOC_0s07g03770 pro GUS R primer

<400> 6

tctagacctc ctcctccaag attcc 25

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1D-03912 L primer

<400> 7

tcacccatgc atatcaacag 20

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1D-03912 RS primer

<400> 8

cctcctccaa gattcccaa 19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOC_0s07g03770 F primer

<400> 9

gagagagagc ctagctgcta 20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOC_0s07g03770 R primer

<400> 10

cgtgaccgtg gtactgcga 19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOC_Os07g03770 3'UTR RNAi F primer

<400> 11

acccacagaa tgctgctgca 20

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOC_Os07g03770 3'UTR RNAi R primer

<400> 12

ggggtaccaa cattactgga gaactataag cc 32

<210> 13

<211> 265

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOC_Os07g03770 RNAi

<400> 13

acccacagaa tgctgctgca ttgtacatgg atggcccggt catggcagat ggaatgtacc 60

gcctcggttc gtgaacctcg atctcgatca tcggcggtgt tgatgagaga tccaatgcca 120

agataaattg atcatggaat gtattcagca tgcgttgcaa tgcatggaca ttgttatgga 180

atttttggtt tatttacctt tcaccgtgga ttgacaaggt ctcgatcatg ttagtgttga 240

tggttatag ttctccagta atgtt 265

<210> 14

<211> 508

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOC_Os07g03770 T-DNA

<400> 14

gtggtagtaa gaatggaact cacctggtac ctggtacctc ggatccgtaa ttaagtagag 60

tacgtgtaca cagtagaagt agggtatgat ccatatgata ttccttcctt tccttcccag 120

cttgcaaate tctcgtcttc tcgtctcgtc ttggctgtg atttgacgcg agaaaaagga 180

tagccaccgc ccatgcacca cagctcgcgc cacatacgtt acacctcccc ttcgccgtag 240

tatacacctc cacctttccc ttccattaat acctccaccc cccactectc tcccccatct	300
ccccccctc tcgccattgg agctagacag ctcgagctcc aggaggaaga agagagagag	360
cctagctgct agggtttcca tcggatttgg ttttttattt tctttttgtt tcttgtgtgt	420
gttttgatgg atcagagctt tgggaatctt ggaggaggag gaggagcagg ggggagcggc	480
aaggcggcgg cgtcgtcgtt cctgcagc	508