



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0025995

(43) 공개일자 2007년03월08일

(21) 출원번호 10-2006-0072858

(22) 출원일자 2006년08월02일

심사청구일자 2006년08월02일

(30) 우선권주장 1020050082035 2005년09월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인 경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자 한창덕
경남 진주시 주악동 금호석류마을아파트 109-803
은무영
경기 수원시 팔달구 매산로2가 대우아파트 111-303
윤도원
경기 수원시 장안구 조원동 한일타운 127-304
남민희
대구 수성구 노변동 노변대백아파트 101-1503
이기환
경남 밀양시 삼문동 대우아파트 304-203
김철민
충남 논산시 연산면 청동리 178-129

(74) 대리인 김원준

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 뿌리 및 뿌리털의 신장을 유도하는 유전자 및 이 유전자에의한 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 뿌리털의 발달을 유도하는 유전자 및 상기 유전자를 이용한 형질전환 식물체가 뿌리 및 뿌리털의 생장이 촉진되며 양분의 흡수 능력을 향상 시킨다는 것이다. 상기 유전자는 식물체의 뿌리에서만 발현되고 뿌리 및 뿌리털의 신장을 유도하는 기능을 가지며, 서열번호 1과 90% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

본 발명을 통하여 뿌리 및 뿌리털의 발달과 생장을 촉진하여 식물체의 양분의 흡수 능력이 월등히 향상된 식물체를 개량할 수 있다.

대표도

도 6

특허청구의 범위

청구항 1.

식물체의 뿌리에서만 발현되고 뿌리 및 뿌리털의 신장을 유도하는 기능을 가지며, 서열번호 1과 90% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 단백질.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 OsCSLD 단백질.

청구항 3.

제 1 항의 단백질을 암호화하는 유전자.

청구항 4.

제 3 항에 있어서,

서열번호 2의 염기서열을 갖는 *OsCSLD1* 유전자.

청구항 5.

제 3 항에 의한 유전자를 함유하는 발현벡터.

청구항 6.

제 4 항에 의한 유전자를 함유하는 발현벡터.

청구항 7.

제 6 항에 있어서,

발현벡터 pCAMBIA-CSLD1.

청구항 8.

제 5 항에 의한 발현벡터로 형질전환된 뿌리 및 뿌리털의 신장이 유도된 형질전환 식물체.

청구항 9.

제 6 항에 의한 발현벡터로 형질전환된 뿌리 및 뿌리털의 신장이 유도된 형질전환 식물체.

청구항 10.

제 7 항에 의한 발현벡터로 형질전환된 뿌리 및 뿌리털의 신장이 유도된 형질전환 식물체.

청구항 11.

제 8 항에 있어서,

상기 식물체는 단자엽식물인 것을 특징으로 하는 뿌리 및 뿌리털의 신장이 유도된 형질전환 식물체.

청구항 12.

제 11 항에 있어서,

상기 식물체는 벼인 것을 특징으로 하는 뿌리 및 뿌리털의 신장이 유도된 형질전환 식물체.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 뿌리털의 발달을 유도하는 유전자 및 상기 유전자를 이용하여 식물체에서 뿌리 및 뿌리털의 신장과 양분과 수분의 흡수 능력을 향상시킬 수 있는 방법 및 그에 의해 제작된 식물체에 관한 것이다.

뿌리의 1차 조직은 가장 바깥에서부터 가장 안쪽으로 표피·피층·관다발의 순으로 이루어져 있다. 표피는 얇은 세포벽이 있는 세포로 이루어져 있으며 대개 하나의 세포층으로 되어 있다. 물과 무기염류의 흡수는 표피를 통해 일어나며 땅 위에 사는 대부분의 식물들에는 뿌리털(毛根)이 발달해 물과 물에 녹아 있는 무기염류 등 영양성분의 흡수를 훨씬 더 효율적으로 수행한다. 이러한 뿌리털은 표피 세포벽이 가느다란 원통처럼 길게 늘어난 성숙부위에만 나타난다. 뿌리에서 물의 흡수는 주로 삼투현상에 의해 일어나는데, 삼투현상은 ① 여러 가지 염류, 당류, 그밖에 물에 녹아 있는 유기물질을 함유하는 표피 세포의 안보다 토양 속의 물의 활동도가 더 높고, ② 표피세포의 막이 물은 통과시키나 세포 내에 녹아 있는 대부분의 물질들은 통과시키지 않으므로 일어난다. 물과 용해된 무기염류 등은 뿌리를 가로질러 표피에서 관다발로 이동되어 식물의 다른 부분으로 운반되어 식물체의 생리활동에 이용되는 것이다.

한편, 벼는 세계적으로 가장 중요한 작물 중의 하나로 최근 몇 년간 전체 유전자 서열이 밝혀짐으로써 유용유전자를 대량으로 확보하고 이를 선점하고자 하는 많은 노력이 행해지고 있다. 식물의 무기양분 흡수와 관련된 연구는 재배학적 측면의 연구와 식물생리학적 측면의 연구가 오래 전부터 이루어져 왔으나, 최근에는 무기양분 흡수에 대한 분자수준의 기초연구를 토대로 무기양분 흡수와 관련한 유전자들을 이용하여 작물의 생육과 수량을 증가시키고 극도로 양분이 제한된 조건에서도 생장이 가능한 작물을 육종하기 위한 연구들이 세계적으로 활발히 진행되고 있다.

벼에는 37개의 cellulose synthase-like 유전자가 존재하고 있을 것으로 보고(Hazen et al., Plant physiology, 2002, 128:336-340, Cellulose Synthase-Like Genes of Rice)되고 있으며, 이 유전자들에 대한 명명은 cellulose synthase-

like 유전자의 아미노산 분석상의 유사성을 바탕으로 Cellulose Synthase-Like Genes of Rice (Hazen et al., 위 문헌)에 준한다. 쌍자엽식물인 애기 장대에서는 cellulose synthase-like subfamily D group 중 *AtCSLD3(KOJAK)*이 뿌리털 발달에 관련된다고 보고(Favery et al., Genes & Development, 2001, 15:79-89, KOJAK encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in Arabidopsis) 되었으나 아직까지 단자엽 식물에서는 뿌리털 발달을 저해하는 유전자는 보고된 바가 없다. 더욱이 쌍자엽 식물의 뿌리와 단자엽 식물의 뿌리는 해부학적, 형태학적인 구조가 매우 다르기 때문에 단자엽 식물에서의 뿌리에 관련된 특이적 유전자의 기능 구명은 단자엽 식물의 뿌리 발달에 매우 중요한 정보가 될 것이다.

본 발명자들은 식물체의 유전자 변이체에 대한 연구과정에서 뿌리털 발달이 저해된 변이체를 발견하고 이로부터 뿌리털 발생에 관여하는 유전자를 탐색하기 위한 연구를 수행한 결과, 이 유전자를 분리하고 이것이 Cellulose Synthase-Like Genes 중에서 cellulose synthase-like subfamily D group에 속하는 4개의 유전자 중 하나(Hazen et al., 위 문헌; 분류 방식은 <http://cellwall.stanford.edu/> 참조)인 *OsCSLD1*(*Oryza sativa* Cellulose Synthase-Like D1) 유전자임을 확인하고, 그 구조와 작용 및 식물체 내에서의 기능을 밝히어 그 유용성을 제시함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은, 식물체에 뿌리털 발생을 촉진하는 유전자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은, 상기 유전자로 형질 전환된 뿌리털 발생이 우수한 식물체를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

또한 본 발명은, 상기 유전자로 형질 전환된 식물체를 제조하는 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

발명의 구성

전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 식물체의 뿌리에서만 발현되고 뿌리털의 발생을 유도하는 기능을 가지며, 서열번호 1과 90% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것이다. 본 발명에 의한 상기 단백질 및 유전자는 벼에서 유래한 *OsCSLD* 단백질 및 그를 코딩하는 서열번호 2의 *OsCSLD* 유전자일 수 있다.

또한 본 발명은, 상기 유전자를 함유하는 뿌리털 과발현용 벡터 및 이 벡터로 형질전환된 뿌리 신장 촉진 및 뿌리털 과발생 형질전환 식물체를 제공한다. 하기 실시예에서는 벼를 대상으로 형질전환체를 얻었으나, 유사한 유전학적, 생리학적 특성을 가지는 다른 단자엽 식물체에서도 뿌리 신장 촉진 및 뿌리털의 길이 생장을 유도할 수 있을 것이다.

본 발명에 의한 뿌리털 과발현 식물체는 정상체에 비해 우수한 양분 흡수 능력을 나타낸다.

본 발명은 삽입변이 유도 체계인 *Ac/Ds* tagging system을 통하여 벼에서의 뿌리털에 생성 및 성장에 연관된 유전자를 선 발하였고, 유전자에 대한 분자학적 연구를 통하여 유전자의 뿌리털 특이적 발현 특성을 구명함으로써 완성된 것이다.

전술한 바와 같이, 본 발명은 벼에서의 뿌리털에 생성 및 성장에 연관된 단백질 및 *OsCSLD* 유전자에 관한 것이다. 즉, 본 발명자들이 개발한 벼에서의 삽입 변이 유도체계인 *Ac/Ds* tagging system (Chin HG, et al., 1999 Plant J 19, 615-623; Kim et al., 2004 Plant J 39: 252-263)을 통해 식물 변이체를 얻었으며 그로부터 기능 분석을 실시하였다. *Ac/Ds* tagging system은 옥수수의 전이인자인 *Ac*와 *Ds*를 유전자조작한 후 벼의 genome 상에 형질전환 방법으로 삽입시켜 확립했다. *Ds*는 *Ac*가 같은 계통 상에 존재할 때 전이된다는 사실에 착안하여 system을 구축하였다. 상기 시스템은 *Ds* 안에 reporter gene이 설치되어 *Ds*가 염색체상의 유전자 부근 또는 내부에 삽입되었을 때 host 유전자에 의해 reporter gene의 형질이 발현되도록 고안된 것이다. 이 tagging system은 유전자의 기능을 변이를 통해 동정하고 동시에 형질발현을 reporter gene을 통해 관찰 할 수 있는 매우 강력한 연구 방법이다. 상기 논문 및 본 발명에서 reporter gene으로는 GUS를 사용하였지만, 적절한 표시기능이 있는 유전자라면 reporter gene으로 활용할 수 있을 것이다.

Ac/Ds tagging system을 이용하여 얻어진 본 발명에 의한 상기 변이체 (*OsCSLD1::Ds*)는 *OsCSLD1* 유전자에 *Ds*가 삽입된 것이다. 상기 변이체에 대한 연구를 통하여 *OsCSLD1* 유전자가 식물체 뿌리에서 뿌리털의 생성 및 성장을 유도하는데 관련된 유전자임을 확인하고 본 발명을 완성한 것이다.

이하 단계별로 본 발명을 상세히 설명한다.

(1) 뿌리털의 발달이 미숙한 변이체의 선별 및 변이된 유전자의 분석

본 발명자들이 개발한 삽입 변이 유도체계인 *Ac/Ds* tagging system을 이용하여 벼의 변이체를 다량 제작하고, 특히 표현형질을 나타내는 변이체로부터 변이된 유전자를 분석하였다. *Ac/Ds* tagging system의 *Ds*안에는 GUS coding region이 존재하므로 상기 시스템에 의해 변이된 변이체들은 정상 식물체와는 달리 특정 부위에서 GUS가 발현될 수 있으며, GUS staining을 통하여 GUS가 발현되는 부위를 확인할 수 있다. 또한 상기 시스템을 이용하는 경우 TAIL-PCR을 통하여 *Ds* flanking DNA를 얻을 수 있으므로 염색체 상의 *Ds*가 삽입된 부위(유전자)를 용이하게 분리할 수 있는 특성이 있다.

본 발명에서는 전이인자 *Ds*가 삽입된 다양한 벼 변이체 중에서 특히 뿌리털의 발달이 저해되어 있고 뿌리털이 발생될 부위에 GUS가 발현되는 변이체를 분리하고 DNA를 추출하여 변이와 관련된 유전자를 분석하였다.

변이 (*Ds* tagging line) 식물체 종자의 발아 후 잎에서 DNA를 얻었고, 염색체 상의 *Ds*가 삽입된 곳(유전자)에 대한 정보를 얻기 위하여 추출된 DNA를 주형으로하고 *Ds*의 말단에 상보적인 3개의 프라이머 (3 종의 TAIL3 프라이머)와 하나의 프라이머 (W4 프라이머)를 이용하여 3차에 걸친 TAIL-PCR을 수행하였다. 이어서 3차가 2차보다 50 bp 짧은 PCR 산물인 *Ds* flanking DNA (*Ds*와 접해 있는 벼의 게놈 DNA)를 얻었다. 얻어진 *Ds* flanking DNA의 염기서열을 또 다른 프라이머 (*Ds*3-4)를 이용하여 분석하여 돌연변이체의 flanking sequence를 얻을 수 있었다.

이렇게 서열분석된 *Ds* flanking DNA는 이미 밝혀진 벼의 전체 염기서열 DB을 통하여 *Ds*가 삽입된 유전자가 세포벽의 cellulose 합성에 관련될 것으로 예상되는 cellulose synthase family 중 subfamily D에 속하는 유전자임을 확인하고 이를 *OsCSLD1* 라 명명하였다. *Ds*가 삽입되어 생긴 대립인자를 *OsCSLD1::Ds*라 명명하였다. *OsCSLD1* 유전자 (서열번호 2)는 3471 bp의 염기로 이루어져 있고, 2개의 exon 과 1개의 intron을 가지고 있으며, 1127개의 아미노산으로 이루어지는 단백질(서열번호 1)을 코딩하고 있음을 알 수 있었다.

본 발명에서의 변이체 (*OsCSLD1::Ds*)는 *OsCSLD1* 유전자의 첫 번째 exon의 뒤쪽에 reporter 유전자가 발현하는 방향으로 *Ds*가 위치하고 있음을 flanking sequence 분석과 GUS의 발현을 통하여 확인하였다.

실시에 1은 *OsCSLD1* 유전자의 *Ds* 변이(서열번호 3) 선발 과정, *OsCSLD1*의 염기서열, 그리고 *OsCSLD1::Ds*의 유전자에 대한 기술이다.

(2) *OsCSLD1* 유전자의 형질 발현 분석

정상적 벼 식물체에서 상기 *OsCSLD1* 유전자의 발현양상을 분석하였다.

RNA Northern hybridization을 수행하여 *OsCSLD1* 유전자가 뿌리에서 특이하게 발현하는 것을 확인하였으며, 또한 *Ds* 안에 존재하는 GUS coding region을 통하여 *OsCSLD1*이 발현하는 것을 GUS staining을 통하여 관찰하여 역시 상기 유전자가 뿌리에서 특이하게 발현하는 것을 재확인하였다.

나아가, 변이체 식물의 뿌리 중 뿌리털이 발생하는 표피 세포에만 강하게 GUS가 발현되는 것으로 보아 *OsCSLD1* 유전자가 뿌리털이 발생하는 세포에서만 발현되는 것을 알 수 있었다. 세포내의 *OsCSLD1* mRNA를 직접 관찰할 수 있는 in-situ hybridization을 통하여 뿌리털이 발생하는 표피 세포에서 유전자가 발현되는 것을 재확인하였다.

실시에 2는 위에 기술한 *OsCSLD1* 유전자의 발현 양상에 대한 실험 결과이다.

(3) *OsCSLD1* 변이체 (*OsCSLD1::Ds*)를 통한 유전자의 기능 검증

OsCSLD1 유전자의 변이체 (*OsCSLD1::Ds*)가 정상 식물체와 어떤 형태학적 차이점을 나타내는지 재확인하였다.

OsCSLD1 유전자의 세포학적 측면에서 관찰한 결과 변이체에서 뿌리털의 성장이 저해됨을 확인하였다. 주사전자현미경 (SEM: Scanning Electronic Microscope)으로도 정상적인 식물체에 비해 변이체에서 뿌리털의 발달이 저해되는 것으로 나타났다.

실시에 3은 *OsCSLD1* 유전자의 뿌리 신장과 뿌리털 생장에 관련된 기능을 구명한 실험 결과이다.

(4) *OsCSLD1* 유전자를 이용한 과발현 벡터 구축 및 과발현 형질전환체의 제작

OsCSLD1을 과발현시키기 위해서 OsCSLD1 cDNA를 과발현시킬 수 있도록 벡터를 구축하였다. 구축된 벡터를 이용하여 OsCSLD1이 과발현된 형질전환 식물체를 획득하였다.

실시에 4는 OsCSLD1 과발현 형질전환 식물체를 제작하는 과정에 관한 것이다.

(5) *OsCSLD1* 과발현 형질전환체의 뿌리 신장 및 뿌리털 특성 확인

형질전환하여 얻은 OsCSLD1 과발현 식물체의 뿌리 및 뿌리털 길이를 비교한 결과 정상적인 식물체에 비해 뿌리 및 뿌리털이 월등히 길었다.

실시에 5 및 6은 OsCSLD1 과발현 형질전환 식물체의 뿌리 및 뿌리털 길이 신장에 대한 실험결과이다.

(6) *OsCSLD1* 과발현 형질전환체에서의 양분 흡수 능력 향상 확인

과발현 식물체를 양액을 통한 수경재배에서 미량원소의 양분 흡수를 실험해 본 결과 과발현 식물체가 정상적인 식물체와 변이체 보다 훨씬 많은 양분을 흡수할 수 있었다.

실시에 7은 양분흡수에 대한 실험 결과이다.

이하 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 실시예는 본 발명을 설명하기 위해 예시적으로 열거한 것일 뿐 이에 의해 본 발명의 기술적 사상의 범위나 내용이 변경되거나 축소되는 것은 아니다.

실시예 1 : *OsCSLD1* 유전자의 발견과 염기서열 분석 자료

본 발명자들이 사전에 구축하여 둔 *Ac/Ds* Tagging system에 의해 창출된 돌연변이 집단에서 *OsCSLD1* 변이체를 선별하고, 변이체 분석을 통하여 *OsCSLD1*의 기능을 밝혔다.

변이 식물체의 DNA를 추출하고 PCR를 통하여 크로닝된 *Ds* flanking DNA의 염기서열을 분석함으로써 *OsCSLD1* 변이 유전자를 선별하였다. PCR를 통한 *OsCSLD1*의 유전자 동정 방법을 개략적으로 기술한다.

뿌리털의 발달이 미숙한 변이 (*Ds* tagging 식물체) 식물체의 종자를 소독 발아시켜 포트에서 키운 후 3엽기에 잎을 채취하여 DNA 추출용액을 사용하여 통상의 방법으로 DNA를 얻었다. 추출된 DNA (50 ng/ μ l)를 순차적으로 TAIL3-1 (서열번호 4), TAIL3-2 (서열번호 5), TAIL3-3 (서열번호 6)과 W4 (서열번호 7) 프라이머를 이용하여 TAIL-PCR을 수행하였다. 2차와 3차 PCR 산물을 2% 아가로스 겔 상에서 전기영동한 후 Ethidium Bromide로 염색하여 3차에서 산물이 2차 산물보다 50base pair 짧아진 band를 elution 하였다. elution 된 DNA를 Ds3-4(서열번호 8)를 이용하여 직접 염기서열 분석을 하여 돌연변이체의 flanking sequence(서열번호 3)를 얻었다. 각 프라이머의 염기서열을 표 1에 나타내었다.

[표 1]

명칭	서열번호	염기서열
TAIL3-1	4	5'ttcgactttaacccgacccggatcgatcggttttcg3'
TAIL3-2	5	5'cccgttcgttttcgttacccggtatatcccggttttcg3'
TAIL3-3	6	5'cccgaagttaaatatgaaaatgaaaacggtagagg3'
W4	7	5'AGW GNA GWA NCA NAG A3'
Ds3-4	8	5'gttaccgaccggttttcaccc3'

이미 밝혀진 벼의 전체 염기서열(science, vol 296, 79-92, <http://btn.genomics.org.cn/rice>) 중에서 위에서 분석된 *Ds* flanking DNA 서열을 포함하고 있는 약 10kb의 DNA sequence를 찾아 SoftBerry(<http://www.softberry.com/berry.phtml>)와 NCBI를 통하여 *Ds*가 삽입되어 있는 유전자의 coding region을 예측하고 *Ds*가 삽입된 곳이 *OsCSLD1* 유전자라는 정보를 얻었다(도 1). 전체 DNA중에서 염기서열의 비교를 통하여 *Ds*의 삽입위치와 방향을 확인하였다.

염기서열 분석을 통하여 *OsCSLD1* 유전자는 3471bp의 염기서열(서열번호 2)로 이루어져 있고 2개의 exon(총 3384 bp)과 1개의 intron(87 bp)을 가지고 있으며, 발현 단백질은 1127개의 아미노산서열(서열번호 1)로 되어 있음을 알 수 있었다.

flanking sequence 분석과 GUS의 발현을 통하여 확인한 바, 본 발명에 의한 *OsCSLD1* 돌연변이체는 *OsCSLD1* 유전자의 첫 번째 exon의 말단에 reporter 유전자가 발현하는 방향으로 위치하고 있었다(도 2). 도 2에서 두 개의 사각형은 각각 엑손을, 사각형 사이의 빈 공간은 인트론을, 역삼각형은 삽입된 *Ds*를 의미한다.

실시예 2 : *OsCSLD1*의 발현 양상 분석

벼에서 *OsCSLD1* 유전자가 발현되는 양상을 조사하였다.

OsCSLD1 유전자는 뿌리 조직에서만 특이적으로 발현되는 것이 관찰되었다.

벼의 각 조직별로 *OsCSLD1* mRNA가 발현되는 정도를 Northern hybridization을 통하여 관찰한 것과, 삽입된 *Ds* 안의 reporter 유전자로 붙여놓은 GUS를 X-Gluc을 통하여 발현시켜 관찰해 본 결과 Northern 분석과 동일한 결과를 얻었다. 아래는 본 연구에 사용한 Northern hybridization과 GUS stain 방법에 대한 기술이다.

(1) Northern hybridization을 통한 조직별 발현 양상 분석(도 3)

Easy-BLUE(intron cat. No.17061)를 이용하여 벼의 조직별 [Seedling(발아직후 식물체), Root(뿌리), Leaf(잎), Booting(수분전 화기), Heading(수분후의 화기)] RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 1.3% formaldehyde gel 상에서 전기영동 한 후 Ethidium Bromide로 염색하여 같은 양의 RNA를 확인한 다음, 10×SSC에서 Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech) membrane에 RNA를 옮기고 65℃에서 Church buffer (1% BSA, 200 μM EDTA, 0.5 M sodium phosphate, 7% SDS)와 함께 ³²P로 표지된 *OsCSLD1* (forward 5'-TGG AGT CTT CTT CAG CTT CTG-3'와 reverse 5'-CAG GTT CCA AGT TCC GAG C-3'를 프라이머로 이용하여 PCR을 통해 클로닝된 DNA) probe를 이용하여 Northern blot을 수행하였다(도 3). 실험 결과, 도에서도 볼 수 있듯이, 오로지 뿌리에서만 *OsCSLD1* 유전자가 특이적으로 발현됨을 확인하였다. 도에서 아래 사진 (EtBr)은 sample간에 상대적으로 같은 양의 RNA를 loading 했는지 확인하기 위한 대조구이다.

(2) GUS 염색을 통한 뿌리털 발현 분석(도 4)

변이체에 대하여서 *Ac/Ds* system에 reporter 유전자로 붙여놓은 GUS의 발현을 관찰하였다.

변이체의 뿌리조직을 X-Gluc 용액[50mM NaH₂PO₄, 10mM EDTA, 0.1% Triton, 2mM Potassium ferrocyanide, 2mM Potassium ferricyanide, 0.204mg/ml Chloramphenicol, 10% X-Gluc]에 담근 후 37℃ 암 조건에서 48시간을 보관한 후 푸른색의 GUS 발현이 관찰되면 30%, 50%, 70% 에탄올을 단계적으로 처리한 후 70% 에탄올에 보관하면서 40배율의 현미경(Leica L2)에서 관찰하였다(도 4). 그 결과, 뿌리 중에 뿌리털이 발생하는 곳에서 GUS가 강하게 발현됨을 확인하였다.

(3) GUS를 이용한 세포 수준에서의 유전자 발현 관찰(도 5에서 A)

GUS가 발현되는 세포를 해부학적으로 관찰하기 위하여 변이체의 뿌리조직을 50%, 70%, 85%, 95%, 100%의 에탄올에서 각각 90분씩 처리하여 수분을 제거하였다. 이어서 검체를 Eosin에 2시간 동안 염색하고 에탄올과 tert-butanol의 비율 7:3, 5:5, 3:7인 용매에 각각 30분씩 처리하였다. 이어서 검체를 100% Tert-butanol에서 1시간 처리한 후, 용해된 파라핀과 tert-butanol의 혼합물에 12시간씩 4회 처리하고 boats에 용해된 파라핀과 처리된 조직을 넣고 실온에서 굳혔다. 이렇게 마련된 paraffin sample을 microtome으로 자른 후 microscope slide에 올린 후 xylene을 처리하여 파라핀을 제거하고 현미경으로 관찰하였다(도 5 A). 관찰 결과, GUS는 뿌리털이 생성되는 뿌리의 표피세포에서만 발현하는 것을 확인하였다.

(4) in situ mRNA hybridization을 통한 세포 수준에서의 유전자 발현 관찰(도 5에서 B)

GUS는 Ds가 삽입되어 있는 *OsCSLD1::Ds* 변이체에서 가능하고, in situ mRNA hybridization은 정상적인 식물체에서 발현되는 *OsCSLD1* mRNA를 직접 관찰할 수 있게 한다. 따라서 전술한 GUS 염색을 통해 얻은 결과를 보완하기 위하여 아래와 같이 in situ mRNA hybridization 방법으로 정상적인 식물체에서 *OsCSLD1* mRNA 발현을 직접 관찰하였다.

식물체 뿌리 조직을 Kouchi and Hata (Mol Gen Genet. 1993 238:106-119)가 보고한 fixing 용액(0.25% Glutaldehyde, 4% paraformaldehyde, 100mM Na-Phosphate pH7.5)에서 12시간 처리한 후 위 (3)과 같은 방법으로 현미경 관찰용 조직검체를 준비하였다. 이와는 별도로 제작된 *OsCSLD1* antisense RNA를 상기 조직에 hybridization시키고 anti-DIG-AP와 BCIP/NBT를 이용하여 mRNA가 발현되는 세포를 관찰하였다(도 5에서 B). 그 결과, GUS의 발현과 같은 양상으로 뿌리털이 생성되는 뿌리의 표피세포에서만 *OsCSLD1* mRNA가 나타남을 확인 할 수 있었다.

실시예 3 : 본 발명에 의한 *OsCSLD1* 유전자의 기능 분석

(1) 뿌리의 형태학적 특성

돌연변이 식물체 (*OsCSLD1::Ds*)의 뿌리를 형태학적으로 관찰하여 *OsCSLD1* 유전자가 뿌리에서 발휘하는 기능을 확인하였다.

정상적인 식물체(wild-type)와 돌연변이 식물체 (*OsCSLD1::Ds*) 종자를 프로라즈유제를 이용하여 소독한 후 화분 토양에서 10일 동안 키운 다음 식물체의 표현형을 관찰하였다. 그 결과 돌연변이 식물체의 뿌리생장이 정상 식물체에 비해 20% 이상 저해되는 것을 확인하였다. 따라서 뿌리털에서 발현되는 *OsCSLD1*이 뿌리 신장에도 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다(도 6, 표 2).

[표 2]

정상 식물체, 변이식물체 및 과발현 식물체 종자근에서 뿌리 길이생장^a

	wild-type	<i>OsCSLD1::Ds</i> (변이체)	<i>35S::CSLD1</i> (과발현)
Root length	102±12.9 ^b	83.2±15	126.4±7.6

^a흙에서 10일 동안 생육한 seminal root의 길이 측정

^b20개의 뿌리털에 대한 평균값 (± 표준편차)

(unit: mm)

(2) 뿌리털의 형태학적 특성

OsCSLD1 유전자가 뿌리의 세포에 미치는 영향을 세포학적 측면에서 분석하였다.

정상적인 식물체와 돌연변이 식물체 (*OsCSLD1::Ds*)를 MS용액에 2.5% phytigel을 넣은 배지에서 1주일 키운 후 0.05% Toluidine Blue 시약으로 염색하여 현미경 상에서 관찰하였다(도 7에서 A 및 B). 그 결과 정상적인 식물체에서는 뿌리털의 발달이 정상적임에 비해 돌연변이체에서는 뿌리털의 발달이 저해되는 것을 확인하였다. 도 7에서 A는 정상 식물체의 뿌리조직이고, B는 돌연변이 식물체 (*OsCSLD1::Ds*)의 뿌리조직이다.

뿌리털의 미세형태를 전자현미경으로 관찰하였다.

상기 실시예 2에서 얻어진 식물체의 뿌리 조직을 2.5% glutaraldehyde, 0.1% Na-cacodylate pH7.5 용액을 이용하여 12 시간 동안 fixation 하고 1% OsO₄ 시약에 4℃에서 2시간 동안 놓아둔 후 20%, 50%, 70%, 90% 에탄올에서 각각 15분씩 처리하고 100% 에탄올에 30분씩 3회 처리하였다. 이어서 Critical Point Dryer (Tosimis SAMDRI-795)를 시행하여

조직을 경화시키고 Sputter Coater (JFC-1100E)를 이용하여 100mM에서 200초 동안 조직의 표면을 Ion spotting 시켰다. 준비된 시료를 SEM를 통하여 관찰해 본 결과(도 8) 정상적인 식물체에 비해 변이체에서 뿌리털의 발달이 저해되는 것을 볼 수 있었다. 도 8에서 A는 정상적인 식물체의 뿌리털이고, B는 돌연변이 식물체 (*OsCSLD1::Ds*)의 뿌리털이다.

실시예 4: *OsCSLD1* 과발현 형질전환 식물체 제작

OsCSLD1 유전자를 과발현 시킬 경우 나타나는 표현형을 확인하기 위하여 강력한 promoter인 35S promoter를 이용하여 과발현 vector를 제작하고 이를 이용하여 벼를 형질전환하였다.

(1) 형질전환용 벡터의 제작

35S promoter와 GFP를 가지고 있는 벡터 pCAMBIA1302 (CAMBIA사 제품, 호주)에 *OsCSLD1* cDNA를 삽입하여 과발현 벡터인 pCAMBIA-CSLD1을 제작하였다. 상기 벡터 pCAMBIA1302는 식물체 형질전환 전용으로 만들어진 벡터로써 총 10,549bp의 염기로 이루어져 있고, 식물체의 selection marker로 Hygromycin, kanamycin 저항성 유전자를 가지고 있으며, GFP와 fusion 단백질로 발현 시킬 수 있게 제작된 벡터이다.

본 발명에 의한 과발현 벡터 pCAMBIA-CSLD1의 자세한 제작 과정을 설명한다. ① PCR을 통하여 *OsCSLD1* cDNA에서 양쪽 말단에 *SpeI* 제한효소 절단 서열을 갖는 *OsCSLD1*을 증폭하여 pBSK plasmid vector(STRATAGENE사, 미국)에서 크로닝한다. ② T-DNA vector pCAMBIA1302와, CaMV35S promotor와 *CSLD1* cDNA가 들어있는 plasmid vector를 각각 *SpeI* 효소로 digestion한다. ③ 35S promoter와 *CSLD1*의 DNA를 gel에서 elution 한 후 pCAMBIA1302에 16℃에서 O/N 동안 ligation시킨다. ④ Ligation된 DNA를 *E.coli* competent cell 에 transformation 시켜 얻은 clone으로부터 DNA를 뽑아 *SpeI* 효소로 잘라 ligation 여부를 확인하여 형질전환용 벡터로 사용하였다.

완성된 본 발명에 의한 과발현 벡터 pCAMBIA-CSLD1의 주요부를 도 9에 도시하였다. 도시된 바와 같이, 본 발명에 의한 *OsCSLD1* cDNA가 35S promoter와 GFP 유전자 사이에 삽입되어 있다.

(2) 과발현 식물체의 제작

식물체의 형질전환은 통상 사용하는 아그로박테리움법을 적용하였다.

먼저, *OsCSLD1* cDNA를 내재하고 있는 pCAMBIA-CSLD1을 *Agrobacterium* LBA4404 균주에 형질전환(transformation)하였다. 이를 AB plate에서 30℃에서 3일 동안 배양한 뒤 DNA를 추출하여 co-integration을 확인하여 확인된 균주를 다시 3일 동안 키워 infection에 사용하였다. 형질전환된 아그로박테리움 세포를 벼의 calli를 통해 infection하여 3일간 암실배양(AAM, 2N6-AS 배지), 3~4주간 암실에서 선택배양(N6-CH-Hyg50mg), 10일간 암실에서 전-계대배양(Pre-regeneration) (N6-7-CH), 3주 이상 명실에서 1차 계대배양(Regeneration I)(N6S3-CH-I), shooting 때 까지 명실에서 2차 계대배양(Regeneration II) (N6S3-CH-II)한 후 병 배지(MS)에 옮겨 명실에서 배양하여 형질전환 식물체를 획득하였다. 식물체가 형질전환되었는지 여부는 식물체의 genomic DNA를 추출하여 PCR 및 Hygromycin probe을 이용한 Southern blot으로 확인하였다.

실시예 5: 과발현 식물체 뿌리의 신장 촉진 특성 확인

정상 식물체(wild-type), 돌연변이 식물체(*OsCSLD1::Ds*) 및 과발현 식물체(35S::*OsCSLD1*)의 종자를 프로라즈유제를 이용하여 소독한 후 화분토양에 10일 동안 키운 다음 식물체의 표현형을 관찰하였다. 돌연변이 식물체의 뿌리 생장은 정상 식물체에 비해 20% 이상 저해되며, 과발현 식물체의 뿌리 생장은 정상 식물체보다 20% 이상 촉진되는 것을 확인하였다(도 6 및 표 4 참조). 과발현 식물체 뿌리의 신장이 촉진되는 이유는 아래 실시예 6 및 7에서 확인된 바와 같이 뿌리털이 길게 자라면서 영양흡수가 상대적으로 좋아지기 때문으로 판단된다. 도에서 A, B, C는 각각 정상 식물체, 돌연변이 식물체, 과발현 식물체를 의미한다.

실시예 6: 과발현 식물체 뿌리털의 형태학적 특성 확인

정상 식물체(wild-type), 돌연변이 식물체(*OsCSLD1::Ds*) 및 과발현 식물체 (35S::*OsCSLD1*)의 종자를 소독 후 MS 배지에서 3일 동안 기른 다음 식물체의 뿌리 조직을 전술한 실시예 3(2)에서의 SEM 관찰용 처리방법으로 처리하여 전자현미

경으로 관찰하였다(도 10). 사진에서 볼 수 있듯이, 정상적인 식물체(도 10에서 A)보다 변이체(도 10에서 B)에서 뿌리털의 생장이 저조하며, 본 발명에 의한 과발현 식물체(도 10에서 C)의 뿌리털은 정상적인 식물체보다 현저하게 길게 성장함을 확인하였다(표 3).

[표 3]

정상 식물체, 변이식물체 및 과발현 식물체의 뿌리털 길이^a

	wild-type	<i>OsCSLD1::Ds</i> (변이체)	<i>35S::CSLD1</i> (과발현)
Root hair length	178.5±13.3 ^b	77.3±9.1	328.1±18.2
^a 0.5% phytoigel이 첨가된 0.5X MS에서 5일 동안 생육한 종자근의 뿌리털 길이 측정			
^b 200개의 뿌리털에 대한 평균값 (± 표준편차)			
(unit: μm)			

그러나 정상 식물체(wild-type), 돌연변이 식물체(*OsCSLD1::Ds*)와 과발현 식물체 (35S::*OsCSLD1*)의 뿌리털 밀생정도 (뿌리털의 개수)에는 유의미한 차이가 없었다(표 4).

[표 4]

뿌리 표피 단위면적당 (200 μm X 200 μm) 뿌리털 발생개수^a.

	wild-type	<i>OsCSLD1::Ds</i> (변이체)	<i>35S::CSLD1</i> (과발현)
Root Hair 수	15.2±1.2 ^b	14.6±1.5	15.6±1.1
^a 0.5% phytoigel이 첨가된 0.5XMS에서 5일 동안 생육한 종자근을 대상으로 함			
^b 200개의 뿌리에 대한 평균값 (± 표준편차)			

실시에 7: 과발현 식물체의 양분 흡수능 분석

뿌리 및 뿌리털의 신장이 촉진된 본 발명에 의한 *OsCSLD1* 과발현 식물체가 양분 흡수 능력상에 어떤 차이가 있는지 확인하였다.

정상 식물체(wild-type), 돌연변이 식물체(*OsCSLD1::Ds*) 및 과발현 식물체 (35S::*OsCSLD1*)의 종자를 24시간 동안 0.05% prochloraz에서 소독하여 증류수로 세척한 후 9-cm-diam Petri dishes 위에 Whatmman No. 2 filter paper를 깔고 종자를 치상한 다음 30℃의 암조건에서 5일 동안 발아시켰다. 발아 식물체를 양액 [Carmak and Marschner(1992) 0.88mM K₂SO₄, 1mM Ca(NO₃)₂, 1mM (NH₄)₂SO₄, 1mM MgSO₄, 0.25mM KH₂PO₄, 0.1mM KCl, 40uM FeEDTA, 10 μM H₃BO₄, 1 μM MnSO₄, 1 μM ZnSO₄, 0.1 μM CuSO₄ and 0.01 μM (NH₄)₆MoO₂₄]이 담긴 상자로 옮겨 growth camber [16h photoperiod at 30/22℃ day/night and 70% RH, 250mE m⁻² s⁻¹] 안에서 15일 동안 매 2일마다 양액을 교환하며 길렀다. 15일 후 뿌리를 잘라 70℃에서 3일간 건조시킨 후 분말화하였다. 각각의 뿌리 분말을 1N HCl에 넣고 24시간 교반한 후 Whatmman No. 2 paper로 filter하여 추출액을 얻었다.

plasma spectrophotometry로 상기추출액 중의 양분의 미량원소 함량을 측정하였다(도 11). 도에서 볼 수 있듯이 본 발명에 의한 과발현 식물체가 정상적인 식물체 보다 Mg, Zn, Fe, Mn, Cu 등 전체 미량원소 흡수 능력이 현저하게 우수함을 확인하였다.

본 실시예는 실험의 오차를 줄이기 위하여 3회 반복하였다.

발명의 효과

본 발명에 의하여 실험적, 농업적으로 중요한 뿌리와 뿌리털의 발생과 발달을 조절할 수 있는 *OsCSLD1* 유전자의 기능이 구명되었으며 이를 통하여 양분과 수분의 흡수 능력을 향상 시킬 수 있는 식물체를 창출하였다.

도면의 간단한 설명

도 1a 및 b는 본 발명에 의한 *OsCSLD1*의 cDNA 염기서열 및 단백질 아미노산 서열.

도 2는 본 발명에 의한 변이체 *OsCSLD1::Ds* 대립인자의 염색체상의 구조를 보여주는 개념도.

도 3은 식물체의 각 조직에서 본 발명에 의한 유전자가 발현되는 양상을 보여주는 Northern hybridization 결과사진.

도 4는 본 발명에 의한 유전자가 뿌리털에서 발현됨을 간접적으로 보여주는 GUS 염색 결과사진.

도 5는 본 발명에 의한 유전자가 세포 수준에서 발현되는 양상을 보여주는 현미경 사진.

도 6은 정상 식물체와 본 발명에 의한 변이체의 뿌리발달을 보여주는 비교사진.

도 7은 정상 식물체와 본 발명에 의한 변이체의 뿌리털 발달을 보여주는 비교사진.

도 8은 정상 식물체와 본 발명에 의한 변이체의 뿌리털 발달을 보여주는 전사전자현미경 사진.

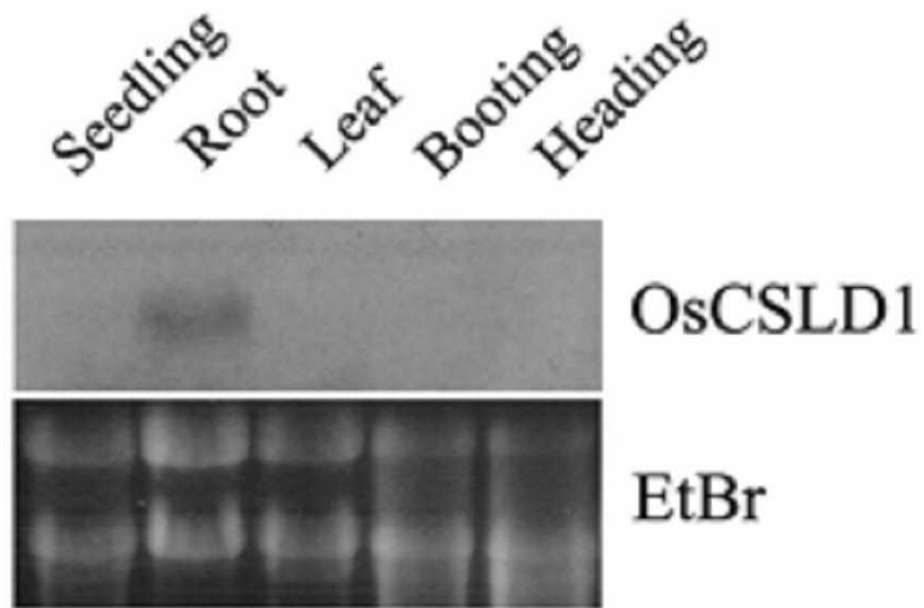
도 9는 본 발명에 의한 과발현 벡터의 개념도.

도 10은 *OsCSLD1* 과발현 형질전환체가 정상적인 식물체에 비해 뿌리털 길이가 훨씬 길어진 것을 보여 주는 사진.

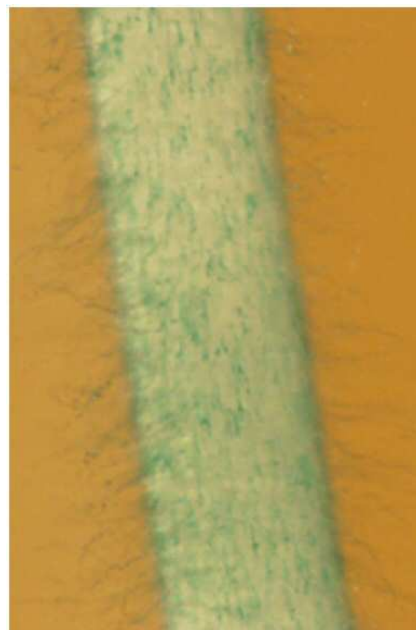
도 11은 *OsCSLD1* 과발현 형질전환체가 양분 특히 미량원소의 흡수능력이 향상되는 것을 보여주는 도표.

도면

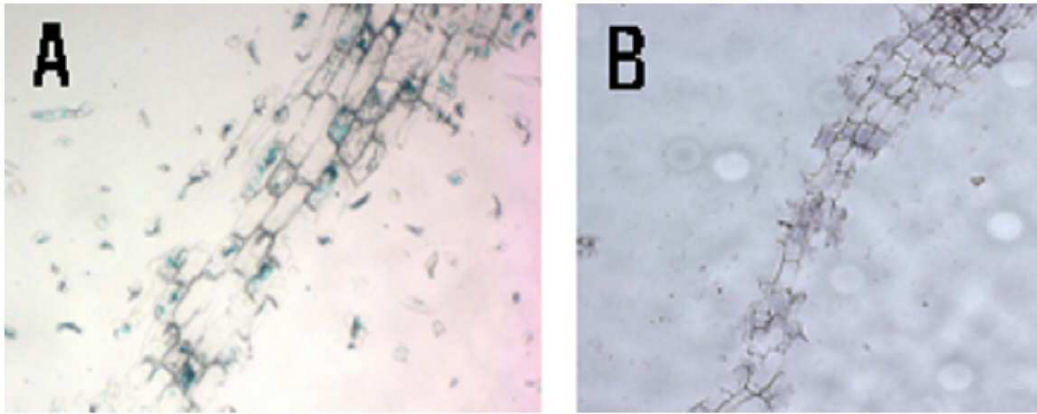
도면3



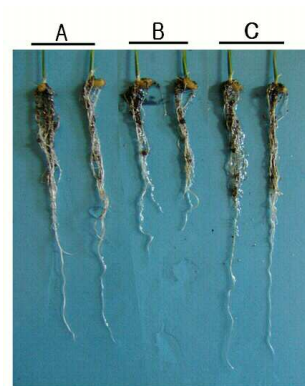
도면4



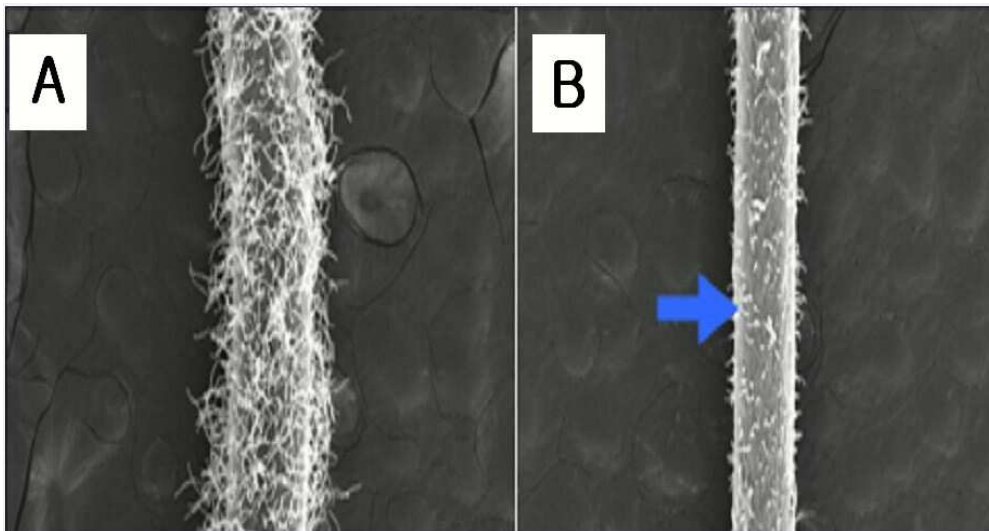
도면5



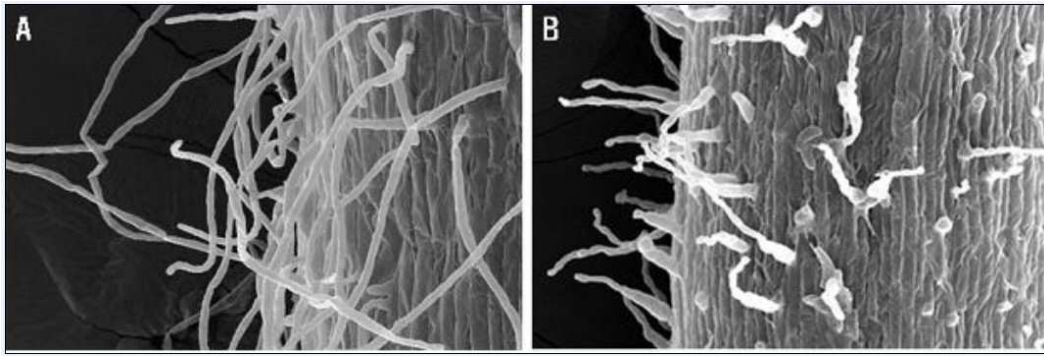
도면6



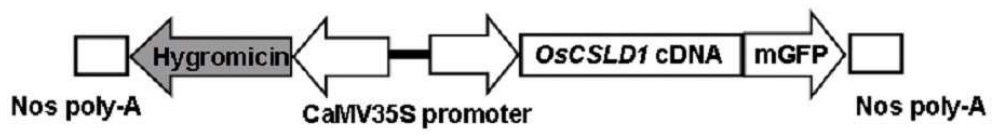
도면7



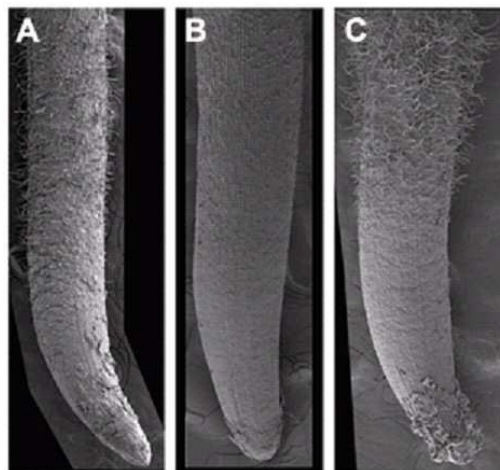
도면8



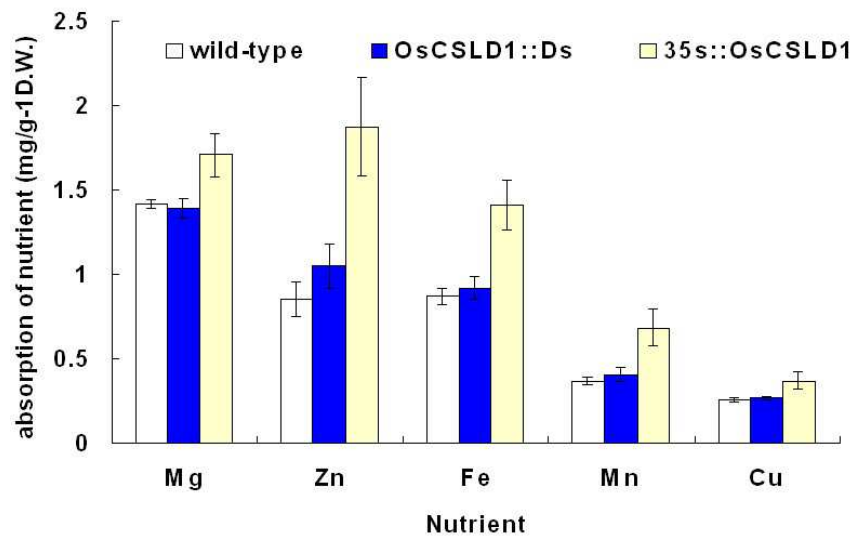
도면9



도면10



도면11



서열목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> A New Gene Controlling the Development and Growth of Root Hairs

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1127

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 1

```

Met Ala Ser Lys Gly Ile Leu Lys Asn Gly Gly Lys Pro Pro Thr Ala
  1              5              10              15

Pro Ser Ser Ala Ala Pro Thr Val Val Phe Gly Arg Arg Thr Asp Ser
      20              25              30

Gly Arg Phe Ile Ser Tyr Ser Arg Asp Asp Leu Asp Ser Glu Ile Ser
      35              40              45

Ser Val Asp Phe Gln Asp Tyr His Val His Ile Pro Met Thr Pro Asp
      50              55              60

Asn Gln Pro Met Asp Pro Ala Ala Gly Asp Glu Gln Gln Tyr Val Ser
      65              70              75              80

Ser Ser Leu Phe Thr Gly Gly Phe Asn Ser Val Thr Arg Ala His Val
      85              90              95

Met Glu Lys Gln Ala Ser Ser Ala Arg Ala Thr Val Ser Ala Cys Met
      100             105             110

Val Gln Gly Cys Gly Ser Lys Ile Met Arg Asn Gly Arg Gly Ala Asp
      115             120             125

Ile Leu Pro Cys Glu Cys Asp Phe Lys Ile Cys Val Asp Cys Phe Thr
      130             135             140

Asp Ala Val Lys Gly Gly Gly Gly Val Cys Pro Gly Cys Lys Glu Pro
      145             150             155             160

Tyr Lys His Ala Glu Trp Glu Glu Val Val Ser Ala Ser Asn His Asp
      165             170             175

Ala Ile Asn Arg Ala Leu Ser Leu Pro His Gly His Gly His Gly Pro
      180             185             190

```

Lys Met Glu Arg Arg Leu Ser Leu Val Lys Gln Asn Gly Gly Ala Pro
 195 200 205
 Gly Glu Phe Asp His Asn Arg Trp Leu Phe Glu Thr Lys Gly Thr Tyr
 210 215 220
 Gly Tyr Gly Asn Ala Ile Trp Pro Glu Asp Asp Gly Val Ala Gly His
 225 230 235 240
 Pro Lys Glu Leu Met Ser Lys Pro Trp Arg Pro Leu Thr Arg Lys Leu
 245 250 255
 Arg Ile Gln Ala Ala Val Ile Ser Pro Tyr Arg Leu Leu Val Leu Ile
 260 265 270
 Arg Leu Val Ala Leu Gly Leu Phe Leu Met Trp Arg Ile Lys His Gln
 275 280 285
 Asn Glu Asp Ala Ile Trp Leu Trp Gly Met Ser Ile Val Cys Glu Leu
 290 295 300
 Trp Phe Ala Leu Ser Trp Val Leu Asp Gln Leu Pro Lys Leu Cys Pro
 305 310 315 320
 Ile Asn Arg Ala Thr Asp Leu Ser Val Leu Lys Asp Lys Phe Glu Thr
 325 330 335
 Pro Thr Pro Ser Asn Pro Thr Gly Lys Ser Asp Leu Pro Gly Ile Asp
 340 345 350
 Ile Phe Val Ser Thr Ala Asp Pro Glu Lys Glu Pro Val Leu Val Thr
 355 360 365
 Ala Asn Thr Ile Leu Ser Ile Leu Ala Ala Asp Tyr Pro Val Asp Lys
 370 375 380
 Leu Ala Cys Tyr Val Ser Asp Asp Gly Gly Ala Leu Leu Thr Phe Glu
 385 390 395 400
 Ala Met Ala Glu Ala Ala Ser Phe Ala Asn Leu Trp Val Pro Phe Cys
 405 410 415
 Arg Lys His Glu Ile Glu Pro Arg Asn Pro Asp Ser Tyr Phe Asn Leu
 420 425 430
 Lys Arg Asp Pro Phe Lys Asn Lys Val Lys Gly Asp Phe Val Lys Asp
 435 440 445
 Arg Arg Arg Val Lys Arg Glu Tyr Asp Glu Phe Lys Val Arg Val Asn
 450 455 460
 Gly Leu Pro Asp Ala Ile Arg Arg Arg Ser Asp Ala Tyr His Ala Arg

465		470		475		480
Glu Glu Ile Gln Ala Met Asn Leu Gln Arg Glu Lys Met Lys Ala Gly						
	485		490		495	
Gly Asp Glu Gln Gln Leu Glu Pro Ile Lys Ile Pro Lys Ala Thr Trp						
	500		505		510	
Met Ala Asp Gly Thr His Trp Pro Gly Thr Trp Leu Gln Ala Ser Pro						
	515		520		525	
Glu His Ala Arg Gly Asp His Ala Gly Ile Ile Gln Val Met Leu Lys						
	530		535		540	
Pro Pro Ser Pro Ser Pro Ser Ser Ser Gly Gly Asp Met Glu Lys Arg						
545		550		555		560
Val Asp Leu Ser Gly Val Asp Thr Arg Leu Pro Met Leu Val Tyr Val						
	565		570		575	
Ser Arg Glu Lys Arg Pro Gly Tyr Asp His Asn Lys Lys Ala Gly Ala						
	580		585		590	
Met Asn Ala Leu Val Arg Ala Ser Ala Ile Met Ser Asn Gly Pro Phe						
	595		600		605	
Ile Leu Asn Leu Asp Cys Asp His Tyr Val Tyr Asn Ser Lys Ala Phe						
	610		615		620	
Arg Glu Gly Met Cys Phe Met Met Asp Arg Gly Gly Asp Arg Leu Cys						
625		630		635		640
Tyr Val Gln Phe Pro Gln Arg Phe Glu Gly Ile Asp Pro Ser Asp Arg						
	645		650		655	
Tyr Ala Asn His Asn Thr Val Phe Phe Asp Val Asn Met Arg Ala Leu						
	660		665		670	
Asp Gly Leu Gln Gly Pro Val Tyr Val Gly Thr Gly Cys Leu Phe Arg						
	675		680		685	
Arg Ile Ala Leu Tyr Gly Phe Asp Pro Pro Arg Ser Lys Asp His Thr						
	690		695		700	
Thr Pro Trp Ser Cys Cys Leu Pro Arg Arg Arg Arg Thr Arg Ser Gln						
705		710		715		720
Pro Gln Pro Gln Glu Glu Glu Glu Thr Met Ala Leu Arg Met Asp						
	725		730		735	
Met Asp Gly Ala Met Asn Met Ala Ser Phe Pro Lys Lys Phe Gly Asn						
	740		745		750	

Ser Ser Phe Leu Ile Asp Ser Ile Pro Val Ala Glu Phe Gln Gly Arg
755 760 765

Pro Leu Ala Asp His Pro Ser Val Lys Asn Gly Arg Pro Pro Gly Ala
770 775 780

Leu Thr Ile Pro Arg Glu Thr Leu Asp Ala Ser Ile Val Ala Glu Ala
785 790 795 800

Ile Ser Val Val Ser Cys Trp Tyr Glu Glu Lys Thr Glu Trp Gly Thr
805 810 815

Arg Val Gly Trp Ile Tyr Gly Ser Val Thr Glu Asp Val Val Thr Gly
820 825 830

Tyr Arg Met His Asn Arg Gly Trp Lys Ser Val Tyr Cys Val Thr His
835 840 845

Arg Asp Ala Phe Arg Gly Thr Ala Pro Ile Asn Leu Thr Asp Arg Leu
850 855 860

His Gln Val Leu Arg Trp Ala Thr Gly Ser Val Glu Ile Phe Phe Ser
865 870 875 880

Arg Asn Asn Ala Leu Phe Ala Ser Ser Lys Met Lys Val Leu Gln Arg
885 890 895

Ile Ala Tyr Leu Asn Val Gly Ile Tyr Pro Phe Thr Ser Val Phe Leu
900 905 910

Ile Val Tyr Cys Phe Leu Pro Ala Leu Ser Leu Phe Ser Gly Gln Phe
915 920 925

Ile Val Gln Thr Leu Asn Val Thr Phe Leu Thr Tyr Leu Leu Ile Ile
930 935 940

Thr Ile Thr Leu Cys Leu Leu Ala Met Leu Glu Ile Lys Trp Ser Gly
945 950 955 960

Ile Ala Leu Glu Glu Trp Trp Arg Asn Glu Gln Phe Trp Leu Ile Gly
965 970 975

Gly Thr Ser Ala His Leu Ala Ala Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Val
980 985 990

Ile Ala Gly Ile Glu Ile Ser Phe Thr Leu Thr Ser Lys Gln Leu Gly
995 1000 1005

Asp Asp Val Asp Asp Glu Phe Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Trp Thr
1010 1015 1020

Ser Leu Met Ile Pro Pro Leu Thr Ile Ile Met Ile Asn Leu Val Ala

1025 1030 1035 1040
 Ile Ala Val Gly Phe Ser Arg Thr Ile Tyr Ser Thr Ile Pro Gln Trp
 1045 1050 1055
 Ser Lys Leu Leu Gly Gly Val Phe Phe Ser Phe Trp Val Leu Ala His
 1060 1065 1070
 Leu Tyr Pro Phe Ala Lys Gly Leu Met Gly Arg Arg Gly Arg Thr Pro
 1075 1080 1085
 Thr Ile Val Tyr Val Trp Ser Gly Leu Val Ala Ile Thr Ile Ser Leu
 1090 1095 1100
 Leu Trp Ile Ala Ile Lys Pro Pro Ser Ala Gln Ala Asn Ser Gln Leu
 1105 1110 1115 1120
 Gly Gly Ser Phe Ser Phe Pro
 1125

<210> 2
 <211> 3471
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<400> 2
 atggcgctcga agggcatcct caagaacggc ggtaagccgc cgacggcgcc atcgtcggcg 60
 gcgcccacgg tgggtgttcgg tcggcggacg gactcggggc gattcatcag ctactcccgc 120
 gacgaccttg actcggagat cagcagcgtg gacttccagg actaccacgt ccacatcccc 180
 atgacgccg acaaccagcc catggaccct gccgcggcg acgagcagca gtacgtgtcc 240
 agctcgctct tcaccggcgg gttcaacagc gtgacacgcg cgcacgtgat ggagaagcag 300
 gcgtcgtcgg cgagggcgac ggtgtcggcg tgcattggtgc aggggtgcgg gtccaagatc 360
 atgcgcaacg ggcgcgggcg cgacatcctc cctgcgagt gcgacttcaa gatctgcgtg 420
 gactgcttca ccgacgccgt caagggcggc ggcggcgtgt gcccggggtg caaggagccg 480
 tacaagcacg cggagtggga ggaggtggtg tcggcgtcca accacgacgc catcaacagg 540
 gcgctgtcgc tgccgcacgg gcacgggcat ggcccgaaga tggagaggcg gctgtcgtg 600
 gtgaagcaga acgggggggc gcccggcgag ttcgaccaca accgctgggt cttcgagacc 660
 aagggcacct acggctacgg caacgcaatc tggcccagg acgacggcgt ggcggggcac 720
 cccaaggagc tgatgagcaa gccatggcgg ccgctgacct gcaagctccg gatccaggcg 780

gcggtgatca gcccgtag gctgctggtc ctgatccggc tgggtggcgct ggggttggtc	840
ctgatgtggc gcatcaagca ccagaacgag gacgccatct ggctgtgggg gatgtccatc	900
gtgtgcgagc tgtggttcgc cttgtcgtgg gtgctggacc agctgcccac gctgtgcccc	960
atcaaccgcg ccaccgacct gagcgtgctc aaggacaagt tcgagacgcc cacgccgagc	1020
aaccccaccg gcaagtccga cctccccggg atcgacatct tcgtctccac cgccgacccg	1080
gagaaggagc ccgtgctggg gacggccaac accatcctct ccatcctggc cgccgactac	1140
cccgtcgaca agttggcgtg ctacgtgtcc gacgacggcg gggcgctgct gacgttcgag	1200
gcatggcgcg aggcggcgag cttcgccaac ctgtgggtgc cattctgccg gaagcacgag	1260
atcgagccga ggaaccccga cagctacttc aacctcaaga gggaccggtt caagaacaag	1320
gtgaagggcg acttcgtcaa ggacaggcg cggtgaagc gggagtacga cgagttcaag	1380
gtccgctca atggcctccc cgacgccatc cgccgccgct ccgacgcgta ccacggccgc	1440
gaggagatcc aggcgatga cctgcagcg gagaagatga aggcggcgcg cgacgagcag	1500
cagctggagc cgataaagat cccaaggcg acgtggatgg cggacggcac gcactggccg	1560
gggacgtggc tgcaggcgtc gccggagcac gcgagggcg accacggcg gatcatacag	1620
gtgatgctaa agcctcccag tcccagtcac agcagcagcg gcggcgacat ggaaaagagg	1680
gtggatttgt cgggcgtgga caccggctg ccgatgctgg tgtacgtgtc gcgggagaag	1740
cggccggggc acgaccacaa caagaaggcg ggcgccatga acgcgctggg gcgggcgtcg	1800
gcgatcatgt ccaacggggc gttcatctc aacctggact gcgaccata cgtgtacaac	1860
tccaaggcgt tccgggaggg gatgtgcttc atgatggacc gcggggcgca ccgcctctgc	1920
tacgtccagt tccgcagcg cttcgagggc atcgaccct ccgaccgcta cgccaaccac	1980
aacaccgtct tcttcgacgt caacatgcgc gccctcgatg gcctccaggg cccgtctat	2040
gtcggaactg gctgcctctt ccgccgcatc gcgctctacg gcttcgacct gccaggtcc	2100
aaggaccaca ccaccccggt gtctgtgtgc ctgccagtc gccgccgaac aagatcccag	2160
cccagcccc agggaggagga ggaggagacg atggccctcc gcatggacat ggacggcgcg	2220
atgaacatgg cgagcttccc caagaagttc ggcaactcga gcttctgat cgactccatc	2280
ccggtggcg agttccagg acggccgctg gcggaccacc cgtcggtgaa gaacggggcg	2340

ccgccggggg cgctgacgat cccgcgggag acgctggacg cgctcgatcgt ggcggaggcg 2400
atcagcgtgg tgtcgtgctg gtacgaggag aagacggagt gggggacgag ggtgggttgg 2460
atatacgggt cggtgacgga ggacgtggtc accggctacc gcatgcacaa ccgggggtgg 2520
aagtccgtct actgcgtcac ccaccgcgac gccttcgcg gcaccgccc catcaacctc 2580
accgaccgcc tccaccaggt cctccgatgg gccactggct ccgtcgagat cttcttctca 2640
cgcaacaacg cactcttcgc ttctctaaag atgaaggtag ctagcttgct attcgatcga 2700
ttatttttct tcttcttctt ctccgcgtgc cgccaaacaa acaattatcc attgcatttg 2760
caggttctcc agcgcacgc ttacctcaac gttggcatct accccttcac ctccgtcttc 2820
ctcatcgtct actgcttcct cccggcgctc tccctcttct cggggcagtt catcgtgcag 2880
acgctcaacg tcaccttcct cacctacctg ctcatcatca ccatcacgct ctgcctcctg 2940
gccatgctgg agatcaagtg gtccggcatc gcgctggagg agtgggtggcg gaacgagcag 3000
ttctggctca tcggcggaac cagcgccac ctgcgcgcg tctgcaggg ctttctcaag 3060
gtcatcgccg gcatcgagat ctcttcacc ctacacctca agcagctcg cgacgacgtc 3120
gacgacgagt tcgccgagct ctacgcggtc aagtggacgt ccctcatgat accgccgctc 3180
accatcataa tgatcaacct cgtcgccatc gccgtcggct tcagccgcac catctacagc 3240
accatcccg agtggagcaa gcttctcggg ggagtcttct tcagcttctg ggtcctcgcg 3300
catctctacc ctttcgcaa gggcctcatg ggcaggagg gaaggacacc caccatcgtc 3360
tacgtctggg ctggcctcgt cgccatcacc atctccttgc tctggattgc aatcaagcct 3420
cttctgcac aagccaactc acagctagga ggatccttct ctttccctg a 3471

<210> 3
<211> 319
<212> DNA
<213> Oryza sativa

<400> 3
caagatccca gccccagccc caggaggagg aggaggagac gatggccctc cgcatggaca 60
tggaaggcgc gatgaacatg gcgagcttcc ccaagaagtt cggcaactcg agcttctga 120
tcgactccat cccggtggcg gagttocagg gacggccgct ggcggaccac ccgtcgggtga 180
agaacgggcg gccgccgggg gcgctgacga ttagggatga aaacgggtcg taacgggtcg 240

taaaatacct ctaccgtttt cattttcata tttaacttgc gggacggaaa cgaaaacggg 300

atataccggt aacgaaaac 319

<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
ttcgacttta acccgaccgg atcgtatcgg ttttcg 36

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
cccgttcgtt ttcgttaccg gtatatcccg ttttcg 36

<210> 6
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
cccgcaagtt aaatatgaaa atgaaaacgg tagagg 36

<210> 7
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
agwgnagwan canaga 16

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
gttaccgacc gttttcatcc 20