(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0121784
(43) 공개일자 2011년11월09일

(51) Int. Cl.
A01H 5/00 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0041233
(22) 출원일자 2010년05월03일
심사청구일자 2010년05월03일

(71) 출원인
수원대학교 산학협력단
경기 화성시 봉담읍 와우리 수원대학교내
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
박훤범
서울특별시 강남구 대치동 삼성아파트 109동 504호
호사인 아미르
경기도 화성시 봉담읍 와우리 산 2-2
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

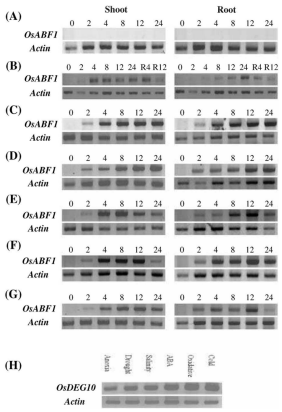
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 벼 유래의 OsABF1 유전자 및 이의 용도

(57) 요 약

본 발명은 벼 유래의 스트레스 내성 관련 OsABF1(*Oryza sativa* abscisic acid responsive element-binding factor 1) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포, 상기 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 식물의 스트레스 내성을 증진시키는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체 및 이의 종자, 상기 재조합 벡터를 이용한 스트레스 내성 형질전환 식물체의 제조 방법 및 상기 유전자를 포함하는 식물의 스트레스 내성을 증진시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

조정일

경기도 용인시 기흥구 보라동 화성파크드림아파트 304동 502호

전종성

경기도 안양시 동안구 호계동 목련아파트 103동 1302호

이용주

충청남도 홍성군 갈산면 상촌리 334-7번지

안철현

경기도 화성시 반송동 13-14번지 장원빌 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KRF-2005-070-C00128

부처명 한국학술진흥재단

연구관리전문기관

연구사업명 순수기초연구그룹지원사업

연구과제명 앱시스산 및 활성산소종을 매개로한 환경 스트레스의 식물신호전달 기작 규명

기여율

주관기관 부산대학교

연구기간 2005년 09월 01일 ~ 2008년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 벼(*Oryza sativa*) 유래의 스트레스 내성 관련 OsABF1(*Oryza sativa* abscisic acid responsive element-binding factor 1) 단백질.

청구항 2

제1항의 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 4

제2항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 6

제4항의 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *OsABF1* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 스트레스 내성을 증진시키는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 스트레스는 무산소, 건조, 염, 산화 또는 저온 스트레스인 것을 특징으로 하는 식물의 스트레스 내성을 증진시키는 방법.

청구항 8

제6항의 방법에 의해 제조된 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체.

청구항 9

제8항에 따른 식물체의 종자.

청구항 10

제4항의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 스트레스 내성 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 11

제2항의 유전자를 포함하는, 식물의 스트레스 내성을 증진시키기 위한 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 벼 유래의 OsABF1 단백질 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 벼 유래의 스트레스 내성 관련 OsABF1(*Oryza sativa* abscisic acid responsive element-binding factor 1) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포, 상기 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 식물의 스트레스 내성을 증진시키는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 스

트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체 및 이의 종자, 상기 재조합 벡터를 이용한 스트레스 내성 형질전환 식물체의 제조 방법 및 상기 유전자를 포함하는 식물의 스트레스 내성을 증진시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물의 생장 및 생산성은 건조, 고염 및 저온과 같은 환경 스트레스에 의해 크게 영향을 받는다. 비생물적 스트레스 조건에 노출되면, 식물은 생리학적 적응에서 유전자 발현까지 다양한 변화를 겪는다. 많은 스트레스-유도성(inducible) 유전자 중에는 환경 스트레스에 대해 직접적으로 보호하는 삼투보호제(osmoprotectants), 샤페론(chaperone) 및 해독 효소(detoxification enzymes)와 같은 유전자들이 있다. 상기 유전자들 외에는 스트레스 반응 동안에 유전자 발현 및 신호전달을 조절하는 전사 인자 및 단백질 키나제(kinases)가 포함된다(Seki et al, 2003, Curr Opin Biotech 14, 194-199). 따라서, 스트레스-반응성(responsive) 유전자의 시기적절한 발현은 다른 환경 스트레스 조건하에서 생존하기 위한 식물의 능력에 결정적이다(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006, Annu Rev Plant Biol 57, 781-803; Chinnusamy et al, 2007, Trends Plant Sci 12, 444-451; Shinozaki and ,2007, J Exp Bot 58,221-227).

[0003] 트랜스크립톰(transcriptome) 분석을 포함하는 많은 실험들은 bZIPs, 징크 핑거(zinc finger) 단백질, AP2/EREBPs, bHLHs 및 NACs를 포함하는 비생물적 스트레스에 반응하는 많은 전사 인자들을 확인하였다(Chen et al, 2002, Plant Cell 14, 559-574; Seki et al, 2002, Funct Integr Genomics 2, 282-291; Rabanni et al, 2003, Plant Physiol 133, 1755-1767; Oh et al, 2005, Plant Physiol 138, 341-351; Nijhawan et al, 2008, Plant Physiol 146, 333-350; Oh et al, 2009, Plant Physiol 150, 1368-1379). 다양한 전사 인자들은 스트레스 반응성 유전자의 프로모터에 있는 특이적 시스-액팅 인자(*cis*-acting elements)에 결합하고, 그로 인해 비생물적 스트레스에 대한 식물 내성의 주된 매개체로서 작용한다(Meshi and Iwabuchi, 1995, Plant Cell Physiol 36, 1405-1420; Yanagisawa, 1998, J Plant Res 111, 363-371; Liu et al, 1999, Eur J Biochem 262, 247-257; Riechmann and Ratcliffe, 2000, Curr Opin Plant Biol 3, 423-434; Fode et al, 2008, Plant Cell 20, 3122-3135). 따라서, 상기 스트레스-유도성 전사 인자들은 비생물적 스트레스에 반응하여 복잡한 신호전달 네트워크를 형성한다.

[0004] bZIP 단백질은 염기성 영역(basic region) 및 류신 지퍼(leucine zipper)로 이루어진 bZIP 도메인을 갖는 많은 전사 인자 패밀리를 포함한다(Hurst, 1994, Protein Profiles 1, 123-168; Jakoby, et al, 2002, Trends Plant Sci 7, 106-111). 보존된 염기성 영역은 서열-특이적 DNA 결합에 관련 있는 반면, 덜 보존된 류신 지퍼 영역은 코일드-코일(coiled-coil) 형태에 양친매성(amphipathic) 서열을 포함하고 이합체화 특이성(dimerization specificity)을 부여한다. 따라서 상기 류신 지퍼 서열은 bZIP 전사 인자의 호모-및/또는 헤테로-이합체화를 매개한다. 식물에서, bZIP 전사 인자 유전자는 기관-특이적(organ-specific), 자극-반응성(stimulus-responsive), 발달-의존성(development-dependent) 및 세포주기-특이적(cell cycle-specific) 같은 다양한 방식으로 발현된다(Schindler et al, 1992, EMBO J 11, 1261-1273; Minami et al, 1993, Plant Mol Biol 23, 429-434; de Vetten and Ferl, 1995, Plant J 7, 589-601; Chern et al, 1996, Plant J 10, 135-148; Uno et al, 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97, 11632-11637; Rodriguez-Uribe and O'Connell, 2006, J Exp Bot 57, 1391-1398).

[0005] 식물호르몬인 앱시스산(abscisic acid)은 건조, 저온 및 고염을 포함하는 비생물적 스트레스에 대한 식물의 적응 반응에서 필수적인 역할을 한다. 앱시스산은 종자의 성숙, 휴면(dormancy), 세포분열의 억제 및 발아와 같은 식물 생장 및 발달의 다양한 양태에 또한 관여한다(Leung and Giraudat, 1998, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49, 199-222; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005, Trends Plant Sci 10, 88-94; Christmann et al, 2006, Plant Biol 8, 314-325; Kim, 2007, J Plant Biol 50, 117-121). 많은 bZIP 전사 인자들이 앱시스산 및/또는 스트레스 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있다(Lopez-Molina et al, 2002, Plant J 32, 317-328; Fujita et al, 2005, Plant Cell 17, 3470-3488). bZIP 전사 인자들은 많은 앱시스산-유도성 유전자의 프로모터 영역에서, 보존된 모티프(motif)인 PyACGTGGC 를 갖고 있는 특이적인 앱시스산-반응성 인자(ABA-responsive elements, ABRE)와 상호작용하며, 그로 인해 하위유전자 발현을 전이활성화(transactivation)시킨다(Niu et al, 1999, Plant Mol Biol 41, 1-13; Kim et al, 1997, Plant J 11, 1237-1251). 따라서, bZIP 전사 인자들은 앱시스산 반응성 인자-결합 인자(ABRE-binding factors; ABFs) 또는 ABRE-결합 단백질(ABRE-binding proteins; AREBs)로서 나타낼 수 있다. 애기장대에는, 75개의 bZIP 전사 인자 중 13개가 서브패밀리 10개 중 ABF 유전자를 포함하는 A 그룹에 속한다.

[0006] 애기장대 bZIP 전사 인자 패밀리 유전자인 ABF2/AREB1, ABF4/AREB2 및 ABF3의 발현은 앱시스산, 탈수 및 염 스

트레스에 의해 영양 조직(vegetative tissues)에서 상향조절된다. 원형질체(protoplast)를 이용한 일시적 실험에서, ABRE에 의해 유도되는 리포터 유전자의 전사는 상기 bZIP 전사 인자에 의해 또한 활성화된다(Nakashima et al, 2006, Plant Mol Biol 60, 51-68). 애기장대 및 벼에서 ABF3의 구성적 과발현은 증진된 건조 내성을 나타내었다(Kang et al, 2002, Plant Cell 14, 343-357). 또한, 앱시스산 신호전달의 양성 조절자인 벼 OsbZIP23 및 OsbZIP72의 과발현은 비생물적 스트레스 내성을 증진시킨다(Lu et al, 2008, Planta 229, 605-615; Xiang et al, 2008, Plant Physiol 148, 1938-1952). ABF 단백질은 식물의 생장 및 발달에 또한 작용을 한다. 예를 들어, 애기장대 *abi5* 돌연변이체는 종자의 발아 동안에 앱시스산 신호전달을 방해함으로써 앱시스산에 대한 민감도의 감소를 보여주는데, 이는 AtABI5가 종자에서의 유전자 발현과 앱시스산 신호전달을 연결한다는 것을 나타낸다(Finkelstein and Lynch, 2000, Plant Cell 12, 599-609). 단자엽 식물에서, AtABI5의 벼 및 보리 상동체(homolog)인 TRAB1 및 HvABI5는 그에 상응하는 AtABI3 상동체인 OsVP1 및 HvVP1와 물리적으로 상호작용하고, 앱시스산-유도성 유전자 발현을 조절한다(Hobo et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96, 15348-15353; Nakamura et al, 2001, Plant J 26, 627-635; Casaretto and Ho, 2003, Plant Cell 15, 271-284). 게다가, bZIP 전사 인자인 OsABI5는 벼의 번식력 및 스트레스 내성에 관여한다(Zou et al, 2008, Plant Mol Biol 66, 675-683). 상기 데이타는 쌍자엽 및 단자엽 식물 종에서 ABF 단백질이 보존된 ABA 신호 전달 경로에서 작용한다는 것을 제안한다.

[0007] 벼는 가장 중요한 주요 작물 중 하나이며 단자엽 식물 종의 모델이다. 그러나 스트레스 신호전달에 관여하는 많은 bZIP 전사 인자들이 애기장대에서 현재 확인된 반면, 벼에서 공지된 89개의 bZIP 전사 인자 중 기능적으로 규명된 것은 거의 없다.

[0008] 본 발명에서, 발명자들은 벼에서 비생물적 스트레스-유도성 bZIP 전사 인자인 *OsABF1* 을 확인하였다. *OsABF1*의 발현 패턴은 다양한 스트레스 조건에 노출된 벼 신초 및 뿌리에서 조사되었다. OsABF1의 ABRE 결합 활성 및 전이활성화 능력이 효모 원-하이브리드(one-hybrid) 시스템을 이용하여 평가되었다. OsABF1의 생체내(in vivo) 기능을 조사하기 위해, *OsABF1*의 T-DNA 삽입 돌연변이체를 염 및 건조 처리하에 분석하였다. 또한, 공지된 앱시스산 반응성 유전자의 발현이 상기 돌연변이체에서 조사되었다. 벼의 앱시스산-의존성 비생물적 스트레스 신호전달에서 *OsABF1*의 역할이 조사되었다.

[0009] 한국등록특허 제10-0599211호에는 비생물적 스트레스 내성 유전자인 *Os1ti32* 가 개시되어 있으며, 한국등록특허 제10-0781075호에는 스트레스 저항성 유전자인 *OsMSRPK1* 이 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 벼 유래의 *OsABF1* 유전자가 비생물적 스트레스 처리하에 상향조절되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 벼(*Oryza sativa*) 유래의 스트레스 내성 관련 OsABF1(*Oryza sativa* abscisic acid responsive element-binding factor 1) 단백질을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 OsABF1 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 식물의 스트레스 내성을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 이용한 스트레스 내성 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 식물의 스트레스 내성을 증진시키기 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 벼 유래 *OsABF1* 유전자는 앱시스산 및 다양한 비생물적 스트레스의 처리하에 발현이 증가하였다. 따라서 *OsABF1* 유전자를 이용하면 환경 스트레스에 내성이 강한 형질전환 식물체를 개발하는데 유용할 것으로 사료된다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 애기장대 및 벼 유래의 그룹 A bZIP 단백질과 OsABF1 단백질의 계통 분석을 나타낸다. 분기점에 있는 숫자는 백분율로 나타낸 부트스트랩 값이다.

도 2는 벼 유묘의 신초(shoot) 및 뿌리(root)에서 *OsABF1* 유전자의 발현 패턴을 나타낸다. (A) 스트레스 처리 없이 정상 조건(증류수)하에서 0, 2, 4, 8, 12 및 24시간에 벼 유묘에서 *OsABF1* 유전자의 발현. (B) 무산소 처리 0, 2, 4, 8, 12 및 24시간 후 그리고, 상기 스트레스로부터의 회복 4시간(R4) 및 12시간(R12) 후에, 벼 유묘의 신초 및 뿌리에서 *OsABF1* 유전자의 발현. (C-G) 건조(10% 폴리에틸렌 글리콜), 염(250 mM 염화나트륨), 산화 스트레스(10 mM 과산화수소), 저온(4℃) 조건 및 앱시스산(100 μM) 처리 동안 벼 유묘의 신초 및 뿌리에서 스트레스 시작 0, 2, 4, 8, 12 및 24시간 후 *OsABF1* 유전자의 발현 패턴. (H) 무산소, 건조(10% 폴리에틸렌 글리콜), 염(250 mM 염화나트륨), 앱시스산(100 μM), 산화(10 mM 과산화수소) 또는 저온(4℃) 스트레스 조건의 12시간 후, 벼 유묘의 신초에서 *OsDEG10* 의 발현 패턴. 벼 *actin1* 유전자는 내부 대조군으로서 사용되었다.

도 3은 트랜스펙션(transfection)된 옥수수 엽육 원형질체에서 GFP-OsABF1 및 OsABF1-GFP 융합 단백질의 세포하 위치를 나타낸다. (A) GFP-OsABF1; (B) OsABF1-GFP. 엽록소(chlorophyll) 자가형광 및 NLS-RFP가 엽록체 및 핵 마커로서 각각 사용되었다. GFP(녹색) 및 RFP(적색) 형광으로부터 구별하기 위해, 위색(false color)(청색)이 엽록소 자가형광에 대해 사용되었다.

도 4는 OsABF1 단백질의 전이활성화(transactivation) 분석법을 나타낸다. (A) 효모 원-하이브리드 분석법에 사용된 벡터. (B) 효모에서 전이활성화 활성. 베타-갈락토시다제 활성은 밀러(Miller) 유닛으로 나타내었다. pYESTrp2/AtABF3 및 pYESTrp2 빈 벡터는 양성 및 음성 대조군으로서 각각 사용되었다. 막대기는 SD 값을 나타낸다.

도 5는 비생물적 스트레스하에서 *OsABF1* 돌연변이 식물의 생존율을 나타낸다. (A) 돌연변이 대립유전자 *Osabf1-1* 및 *Osabf1-2* 에서 *OsABF1* 게놈구조 및 T-DNA 삽입부위의 모식도(schematic diagram). 박스 및 실선은 엑손 및 인트론을 각각 나타낸다. T-DNA의 위치는 삼각형에 의해 나타내었다. (B) 야생형 벼 식물인 화영(HY) 및 동진(DJ), 그리고 그에 상응하는 T-DNA 돌연변이체에서 앱시스산(100 μM) 처리 12시간 후, RT-PCR에 의한 *OsABF1* 의 발현 분석. (C) 고염(250 mM 염화나트륨) 처리를 했을 때 *Osabf1* 돌연변이체의 생존율. (D) 고염을 처리한 야생형 및 T-DNA 돌연변이체의 전형적인 표현형. 왼쪽 및 오른쪽 식물은 각각 생존 및 죽은 야생형 식물이다. (E) 탈수 처리한 *Osabf1* 돌연변이체의 생존율. (F) 탈수 처리한 야생형 및 T-DNA 돌연변이체의 전형적인 표현형. 왼쪽 및 오른쪽 식물은 각각, 각 라인으로부터의 전형적인 생존 및 죽은 식물이다.

도 6은 *Osabf1* 돌연변이체 및 야생형 벼 식물에서 앱시스산/스트레스 조절 유전자의 RT-PCR 분석을 나타낸다. (A) 화영 및 *Osabf1-1*; (B) 동진 및 *Osabf1-2*. 마커 유전자의 발현은 앱시스산(100 μM) 처리 0, 2, 4, 8, 12 및 24시간 후 돌연변이체 및 대조군 식물에서 분석되었다. 벼 *actin1* 유전자는 내부 대조군으로서 사용되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 벼((*Oryza sativa*) 유래의 스트레스 내성 관련 OsABF1(*Oryza sativa* abscisic acid responsive element-binding factor 1) 단백질을 제공한다.

[0022] 본 발명에 따른 OsABF1 단백질의 범위는 벼로부터 분리된 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물의 스트레스 내성을 증진시키는 활성을 의미한다.

[0023] 본 발명은 또한 OsABF1 단백질의 단편, 유도체 및 유사체(analogues)를 포함한다. 본원에 사용된, 용어 "단편", "유도체" 및 "유사체"는 본 발명의 OsABF1 폴리펩티드와 실질적으로 같은 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는

폴리펩티드를 말한다. 본 발명의 단편, 유도체 및 유사체는 (i) 하나 이상의 보존적(conservative) 또는 비보존적 아미노산 잔기(바람직하게는 보존적 아미노산 잔기)가 치환된 폴리펩티드(상기 치환된 아미노산 잔기는 유전암호에 의해 암호화될 수도, 되지 않을 수도 있다) 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산 잔기에서 치환기(들)를 가지는 폴리펩티드, 또는 (iii) 또 다른 화합물(폴리펩티드의 반감기를 연장할 수 있는 화합물, 예를 들면 폴리에틸렌 글리콜)과 결합된 성숙 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드, 또는 (iv) 부가적인 아미노산 서열(예를 들면, 선도 서열, 분비 서열, 상기 폴리펩티드를 정제하는데 사용된 서열, 프로테이노젠(proteinogen) 서열 또는 융합 단백질)과 결합된 상기 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드일 수 있다. 본원에 정의된 상기 단편, 유도체 및 유사체는 당업자에 잘 알려져 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 OsABF1 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 유전자는 OsABF1 단백질을 코딩하는 DNA 또는 RNA 일 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA 또는 인위적인 합성 DNA를 포함한다. DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. DNA는 코딩(coding) 가닥 또는 넌코딩(non-coding) 가닥일 수 있다.

[0025] 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0026] 서열번호 2로 표시되는 성숙(mature) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 오직 성숙 폴리펩티드만을 암호화하는 코딩 서열; 성숙 폴리펩티드 및 다양한 부가적인 코딩 서열을 암호화하는 서열; 성숙 폴리펩티드(및 임의의 부가적인 코딩 서열) 및 넌코딩 서열을 암호화하는 서열을 포함한다.

[0027] 용어 "폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드"는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 부가적인 코딩 및/또는 넌코딩 서열을 더 포함하는 폴리뉴클레오티드를 말한다.

[0028] 또한, 본 발명은 본원에 기재된 것과 동일한 아미노산 서열, 또는 이의 단편, 유사체, 및 유도체를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드의 변이체에 관한 것이다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 자연적으로 발생하는 대립유전자 변이체 또는 비자연적으로 발생하는 변이체일 수 있다. 상기 뉴클레오티드 변이체는 치환 변이체, 결실 변이체, 및 삽입 변이체를 포함한다. 당업계에 공지된 바와 같이, 대립유전자 변이체는 폴리뉴클레오티드의 대안(alternative)이며, 이는 하나 이상의 치환, 결실 또는 삽입된 뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 변이체에 의해 암호화된 폴리펩티드에서 실질적인 기능 변화를 초래하지는 않는다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 기재된 서열번호 1의 염기서열 및 상기 기재된 서열번호 1의 염기서열과 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 70%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%의 동일성을 가지는 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 발명은 특히, 스트린전트 조건하에 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 발명에서, "스트린전트 조건"은 (1) 0.2 × SSC, 0.1% SDS, 60℃와 같은 더 낮은 이온강도 및 더 높은 온도하에서의 혼성화 및 세척; 또는 (2) 50%(v/v) 포름아미드, 0.1% 소혈청/0.1% Ficoll 및 42℃ 등과 같은 변성제의 존재하에 혼성화; 또는 (3) 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 동일성을 가지는 단지 2개의 서열 사이에서 발생하는 혼성화를 말한다. 게다가, 혼성화가 가능한 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드의 생물학적 기능 및 활성은 서열번호 2 표시되는 성숙 폴리펩티드의 생물학적 기능 및 활성과 동일하다.

[0030] 본 발명의 구현예에 따라, *OsABF1* 유전자는 바람직하게는 벼 유래라는 것을 이해해야 한다. 그러나, 본 발명의 구현예는 벼 *OsABF1* 유전자와 높은 상동성(예를 들면, 60% 이상, 즉 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 심지어 98%의 서열 동일성)을 갖고 다른 식물로부터 유래한 다른 유전자를 또한 포함한다. 서열정렬 방법, 및 서열 동일성 또는 상동성을 결정하기 위한 수단(예를 들면, BLAST)은 당업계에 주지되어 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 *OsABF1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0032] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0033] 본 발명에서, OsABF1 단백질을 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 재조합 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절

요소(translation control element)를 가지는 것이다.

[0034] OsABF1 단백질-암호화 DNA 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보좀 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다. 바람직하게는, 상기 재조합 벡터는 pKBS1-1 벡터, pBI101 벡터 및 pCAMBIA 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0036] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 재조합 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0038] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0039] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 본 발명의 벡터를 원핵세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0040] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다.

[0041] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0042] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및/(또는) 조직 배양기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적

당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *OsABF1* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 스트레스 내성을 증진시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 스트레스는 무산소, 건조, 염, 산화 또는 저온 스트레스일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0044] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다. 바람직하게는, 상기 식물체는 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0045] 상기 단자엽 식물은 택사과(Alismataceae), 자라풀과(Hydrocharitaceae), 지채과(Juncaginaceae), 장지채과(Scheuchzeriaceae), 가래과(Potamogetonaceae), 나자스말과(Najadaceae), 거머리말과(Zosteraceae), 백합과(Liliaceae), 지모과(Haemodoraceae), 용설란과(Agavaceae), 수선화과(Amaryllidaceae), 마과(Dioscoreaceae), 물옥잠과(Pontederiaceae), 붓꽃과(Iridaceae), 버먼초과(Burmanniaceae), 골풀과 (Juncaceae), 닭의장풀과(Commelinaceae), 곡정초과(Eriocaulaceae), 화본과(벼과, Gramineae, Poaceae), 천남성과(Araceae), 개구리밥과(Lemnaceae), 흑삼릉과 (Sparganiaceae), 부들과(Typhaceae), 사초과(방동사니과, Cyperaceae), 파초과(Musaceae), 생강과(Zingiberaceae), 홍초과(Cannaceae) 또는 난초과(Orchidaceae)일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0046] 상기 쌍자엽 식물은 암매과(돌매화나무과, Diapensiaceae), 매화오리나무과(Clethraceae), 노루발과(Pyrolaceae), 진달래과(Ericaceae), 자금우과(Myrsinaceae), 앵초과(Primulaceae), 갯질경이과(Plumbaginaceae), 감나무과(Ebenaceae), 때죽나무과(Styracaceae), 노린재나무과, 회목과(Symplocaceae), 물푸레나무과(목서과, Oleaceae), 마전과(Loganiaceae), 용담과(Gentianaceae), 조름나물과(Menyanthaceae), 협죽도과(마삭나무과, Apocynaceae), 박주가리과(Asclepiadaceae), 꼭두서니과(Rubiaceae), 꽃고비과(Polemoniaceae), 메꽃과(Convolvulaceae), 지치과(Boraginaceae), 마편초과(Verbenaceae), 꿀풀과(Labiatae), 가지과(Solanaceae), 현삼과(Scrophulariaceae), 능소화과(Bignoniaceae), 쥐꼬리망초과(Acanthaceae), 참깨과(Pedaliaceae), 열당과 (Orobanchaceae). 제스네리아과(Gesneriaceae), 통발과(Lentibulariaceae), 파리풀과(Phrymaceae), 질경이과(Plantaginaceae), 인동과(Caprifoliaceae), (연복초과 Adoxaceae), 마타리과(Valerianaceae), 산토끼꽃과(Dipsacaceae), 초롱꽃과 (Campanulaceae), 국화과(Compositae), 소귀나무과(Myricaceae), 가래나무과 (Juglandaceae), 버드나무과(Salicaceae), 자작나무과(Betulaceae), 너도 밤나무과(참나무과, Fagaceae), 느릅나무과(Ulmaceae), 뽕나무과(Moraceae), 쐐기풀과 (Urticaceae), 단향과(Santalaceae), 겨우살이과(Loranthaceae), 마디풀과(여뀌과, Polygonaceae), 자리공과(상륙과, Phytolaccaceae), 분꽃과(Nyctaginaceae), 석류풀과(Aizoaceae), 쇠비름과(Portulacaceae), 석죽과(Caryophyllaceae), 명아주과 (Chenopodiaceae), 비름과(Amaranthaceae), 선인장과(Cactaceae), 목련과(Magnoliaceae), 붓순나무과(Illiciaceae), 녹나무과(Lauraceae), 계수나무과 (Cercidiphyllaceae), 미나리아재비과(Ranunculaceae), 매자나무과(Berberidaceae), 으름덩굴과(Lardizabalaceae), 새모래덩굴과(방기과, Menispermaceae), 수련과(Nymphaeaceae), 붕어마름과(Ceratophyllaceae), 어항마름과(Cabombaceae), 삼백초과(Saururaceae), 후추과(Piperaceae), 홀아비꽃대과(Chloranthaceae), 쥐방울덩굴과(Aristolochiaceae), 다래나무과(Actinidiaceae), 차나무과(동백나무과, Theaceae), 물레나물과(Guttiferae), 끈끈이주걱과(Droseraceae), 양귀비과(Papaveraceae), 풍접초과(Capparidaceae), 십자화과(겨자과, Cruciferae), 플라타너스과(버즘나무과, Platanaceae), 조록나무과(금루매과, Hamamelidaceae), 꿩의비름과(돌나물과, Crassulaceae), 범의귀과(Saxifragaceae), 두충과(Eucommiaceae), 돈나무과(Pittosporaceae), 장미과(Rosaceae), 콩과(Leguminosae), 괭이밥과(Oxalidaceae), 쥐손이풀과(Geraniaceae), 한련과(Tropaeolaceae), 남가새과(Zygophyllaceae), 아마과(Linaceae), 대극과(Euphorbiaceae), 별이끼과(Callitrichaceae), 운향과(Rutaceae), 소태나무과(Simaroubaceae), 멀구슬나무과(Meliaceae), 원지과(Polygalaceae), 옻나무과(Anacardiaceae), 단풍나무과(단풍과, Aceraceae), 무환자나무과(Sapindaceae), 칠엽수과(Hippocastanaceae), 나도 밤나무과(Sabiaceae), 봉선

화과(물봉선과, Balsaminaceae), 감탕나무과(Aquifoliaceae), 노박덩굴과(화살나무과, Celastraceae), 고추나무과(Staphyleaceae), 회양목과 (Buxaceae), 시로미과(Empetraceae), 갈매나무과(Rhamnaceae), 포도과(Vitaceae), 담팔수과(Elaeocarpaceae), 피나무과(Tiliaceae), 아욱과(Malvaceae), 벽오동과 (Sterculiaceae), 팥꽃나무과(서향나무과, Thymelaeaceae), 보리수나무과 (Elaeagnaceae), 이나무과(Flacourtiaceae), 제비꽃과(Violaceae), 시계꽃과 (Passifloraceae), 위성류과(Tamaricaceae), 물별과(Elatinaceae), 베고니아과(Begoniaceae), 박과(Cucurbitaceae), 부처꽃과(배롱나무과, Lythraceae), 석류나무과(Punicaceae), 바늘꽃과(Onagraceae), 개미탑과(Haloragaceae), 박쥐나무과 (Alangiaceae), 층층나무과(산수유나무과, Cornaceae), 두릅나무과(오갈피나무과, Araliaceae) 또는 산형과(미나리과)(Umbelliferae(Apiaceae))일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

[0048] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 스트레스 내성 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0049] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefiaciens*)에 의해 매개될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[0050] 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0051] 본 발명은 또한, 본 발명의 OsABF1 유전자를 포함하는, 식물의 스트레스 내성을 증진시키기 위한 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물에서, 상기 OsABF1 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다. 본 발명의 조성물은 유효 성분으로서 벼 유래의 OsABF1 유전자를 포함하며, 상기 유전자 OsABF1를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 스트레스 내성을 증진시킬 수 있는 것이다. 상기 식물은 전술한 바와 같다.

[0052] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0053] **재료 및 방법**

[0054] **식물 재료, 생장 조건 및 스트레스 처리**

[0055] 벼(*Oryza sativa* L. cultivars Dongjin and Hwayoung) 종자는 70% 에탄올로 살균처리하여 하루 동안 증류수에 담가둔 후, 식물 생장 챔버(28±1℃, 80% 상대습도 및 14시간-광/10시간-암의 광주기)에서 14일 동안 배양되었다. 14일 된 유묘는 0, 2, 4, 8, 12 및 24시간 동안 무산소 조건하에 두었고, 상기 스트레스로부터의 회복 기간이 4 및 12시간 이어졌다. 산소 제거는 AtmosBag™-inflatable polyethylene isolation chambers (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) (Kato-Noguchi and Morokuma 2007)에서 순수한 질소 기체를 사용하여 수행되었다. 다른 스트레스 처리를 위해, 종자 표면을 살균처리하여 증류수에 담궜으며, 생장 챔버(28±1℃, 80% 상대습도 및 14시간-광/10시간-암의 광주기)로 이동하여 14일 동안 증류수에서 배양하였다. 그 후, 유묘는 0, 2, 4, 8, 12 및 24시간 동안 건조(10% 폴리에틸렌 글리콜), 염(250 mM 염화나트륨), 산화 스트레스(10 mM 과산화수소), 저온(4℃) 및 앱시스산(100 μM)을 포함하는 다른 조건에서 처리되었다.

[0056] *OsABF1*, *Osabf1-1* 및 *Osabf1-2*의 T-DNA 삽입 돌연변이체 라인은 벼 T-DNA 삽입 서열 데이타베이스(Jeong et al, 2006, Plant J 45, 123-132; http://www.postech.ac.kr/life/pfg/risd/index.html)로부터 확인되었다. *Osabf1-1*및 *Osabf1-2*의 동형접합체(homozygous) 라인은 *OsABF1* 유전자-특이적 및 T-DNA 특이적 프라이머를 사용한 PCR 스크리닝에 의해 분리되었다.

[0057] **cDNA 클로닝**

[0058] *OsABF1* 전장 cDNA 클론은 벼(*O. sativa* L. cv. Dongjin) 유묘의 건조-처리 신초로부터 추출된 총 RNA와 프라이머 쌍, 5'-AAGCTTATGATGGCGTCGAGGGTG-3' (정방향; 서열번호 3) 및 5'-GGTACCCTACCACTCCATCGAGTT-3' (역방향;

서열번호 4)을 이용하여 RT-PCR에 의해 분리되었다. PCR 산물은 pLUG-TA 벡터(iNTRON Biotechnology, Seoul, Korea)내로 삽입되었고, cDNA 서열은 GenBank에 등록되었다(등록번호: GQ904238).

[0059]

[0060] **RT-PCR**

[0061] Trizol 시약(BRL, Grand island, NY)을 사용하여 스트레스-처리 유묘로부터 총 RNA가 추출되었다. PrimeScritpt™ Reverse Transcriptase(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 사용하여 2 ㎍의 정제된 총 RNA로부터 제1가닥 cDNA를 합성하였다. Oligo(dT)는 프라이머로서 사용되었고, RT 반응은 42℃에서 1시간 동안 총 부피 25 ㎕로 수행되었다. 유전자 특이적 프라이머는 다른 스트레스 처리하에서 벼 유묘의 다른 전사체를 포함하여 *OsABF1*의 발현패턴을 조사하기 위해 사용되었다. *OsDEG10*은 다른 비생물적 스트레스 처리 효과를 확인하기 위한 양성 PCR 마커로서 사용되었다(Park et al, 2009, Biochem Biophys Res Commun 380, 597-602).

[0062] 유전자 발현 분석을 위해, T-DNA 돌연변이체 라인 및 그 각각의 야생형 식물의 앱시스산-처리 유묘 신초로부터 총 RNA가 또한 분리되었다. 벼 액틴 유전자는 cDNA의 상대적인 양을 정량하기 위해 내부 대조군으로서 증폭되었다(McElroy et al, 1990, Plant Cell 2, 163-171). *OsABF1* 유전자, 조절(regulatory) 유전자 및 벼 액틴의 RT-PCR 분석을 위해 사용된 프라이머 서열은 표 1에 나타내었다.

표 1

[0063] RT-PCR 분석에 사용된 프라이머

유전자	프라이머 서열(5'→3')
OsABF1	정방향: TCG CAC ACG GCA TCG GAT CT (서열번호 5)
	역방향: AGT TGC GTG ACC AGC GAC TC (서열번호 6)
OsDEG10	정방향: AGC GGA TCG ACA AGT TAT TG (서열번호 7)
	역방향: AAC ACA ACC AGC ACC TCA TG (서열번호 8)
SKC1	정방향: AGC TCT GCC GAT GAA GAC CAG (서열번호 9)
	역방향: AGT TGG CGA ACG TCG AGA CGA (서열번호 10)
Asr1	정방향: ACC ACC TGT TCC ACC ACA AGA (서열번호 11)
	역방향: TCT TCT CGT GGT GCT CGT GGA (서열번호 12)
Sa1T	정방향: AGG ACA TCA GTG TGC CAC CCA (서열번호 13)
	역방향: TGC GTC GAT AAG CGT TCC AGA (서열번호 14)
OsNAC	정방향: TGT ACG GAG AGA AGG AGT GGT (서열번호 15)
	역방향: TCA TCC AAC CTG AGG CTG TTC (서열번호 16)
OsLEA3	정방향: ATA CCA AGG AGG CGA CGA AGG (서열번호 17)
	역방향: TCA TCC CCA GCG TGC TCA TCA (서열번호 18)
OsABA45	정방향: TCT TCA ACA CCT GGA GCC GCA (서열번호 19)
	역방향: ACG GCC TTG TCA TAG CTA ACG (서열번호 20)
Actin1	정방향: GAT ATG GAG AAG ATC TGG CA (서열번호 21)
	역방향: TAG CTC TTC TCC ACG GAG GA (서열번호 22)

[0064]

[0065] **계통 분석(Phylogenetic analysis)**

[0066] Clustal W, Pole BioInformatique Lyonnasis (PBIL) 프로그램(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html)이 다중 서열 정렬을 수행하기 위해 사용되었다. 계통수는 neighbor-joining 방법을 통해 MEGA software version 4.0을 사용하여 구축되었다(Tamura et al, 2007, Mol Biol Evol 24, 1596-1599). 1,000개의 반복(replicates)을 가지고 부트스트랩(bootstrap) 분석이 수행되었고, 부트스트랩 값(values)은 백분율로 나타내었다.

[0067]

[0068] **GFP 융합 단백질의 세포하 위치(subcellular localization)**

[0069] *OsABF1* 유전자의 전장 cDNA는 프라이머 쌍, 5'-CACCATGATGGCGTCGAGGGTGATGGCG-3'(정방향; 서열번호 23) 및 5'-

CTACCACTCCATCGAGTTTGTTCT-3'(역방향, N-말단 GFP 융합; 서열번호 24) 또는 5'-CCACTCCATCGAGTTTGTTCTTCT-3'(역방향, C-말단 GFP 융합; 서열번호 25)을 사용하여 PCR에 의해 증폭되었다. PCR 산물은 pENTR/D-TOPO 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA)내로 삽입되었다. 그 후, 검증된 cDNA 삽입체는 LR clonase(Invitrogen)를 이용하여, N-말단 GFP 융합을 위한 p2FGW7 또는 C-말단 GFP 융합을 위한 p2GWF7 내로 서브클로닝되었다(Karimi et al, 2002, Trends Plant Sci 7, 193-195). CaMV35S 프로모터에 의해 유도된 생성된 GFP-OsABF1 및 OsABF1-GFP 융합 구축물은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-칼슘 매개 방법을 사용하여 옥수수 엽육 원형질체(mesophyll protoplasts) 내로 운반되었다(Hwang and Sheen, 2001, Nature 413, 383-389). 이어서, 일시적인(transient) 발현을 가능케 하는 12 내지 24시간의 인큐베이션이 수행되었다. 엽록소 자가형광 및 OsHXK5NLS-RFP는 엽록체 및 핵의 마커로서 각각 사용되었다(Cho et al, 2009, Plant Physiol 149, 745-759). 융합 구축물의 발현은 공초점 현미경(LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 모니터링 되었다.

[0070]

[0071] **효모 원-하이브리드 실험**

[0072] 종결코돈을 제외한 전체 *OsABF1* 오픈 리딩 프레임(ORF), 종결코돈을 제외한 C-말단 bZIP 영역(OsABF1ΔN), 및 bZIP 도메인을 제외한 N-말단 영역(OsABF1ΔC)의 cDNA 서열이 적절한 프라이머 쌍을 이용한 PCR에 의해 각각 증폭되었다. 상기 PCR 산물은 pLUG-TA 클로닝 벡터 시스템을 사용하여 클로닝 및 시퀀싱된 후, pYESTrp2/OsABF1, pYESTrp2/OsABF1ΔN, 및 pYESTrp2/OsABF1ΔC 를 구축하기 위해 GAL4 DNA 결합 도메인을 포함하는 pYESTrp2 벡터와 프레임(frame)에 맞게 융합되었다. pYC7-Int 플라스미드를 운반하는 효모 균주(strain)는 *lacZ* 리포터 시스템으로서사용되었다. pYC7-Int/ABRE 구축물은 Em1a 인자의 삼량체(GGACACGTGGCG)를 pYC7-Int의 *Sma*I 부위내로 삽입함으로써 제조되었다. pYESTrp2/OsABF1, pYESTrp2/OsABF1ΔN 및 pYESTrp2/OsABF1ΔC 는 pYC7-Int 또는 pYC7-Int/ABRE 를 운반하는 효모세포내로 형질전환되었다. 또한, pYESTrp2 빈(empty) 벡터 및 pYESTrp2/AtABF3(Choi et al, 2000, J Biol Chem 275, 1723-1730)가 음성 및 양성 대조군으로서 효모세포내로 각각 형질전환되었다. 상기 형질전환체들은 양성 클론이 관찰될 때까지 SD-Ura-Trp 플레이트에서 30℃ 조건으로 인큐베이션되었다. 확인된 양성 클론은 콜로니를 정제하기 위해 신선한 SD-Ura-Trp 플레이트에 스트리킹(streaking) 되었다.

[0073]

[0074] **효모에서 전이활성화 분석법(transactivation assay)**

[0075] 4 내지 5개의 효모 콜로니가 30℃, SD 액체 배지에서 밤새 배양되었다. 그 다음에 상기 배양액은 신선한 효모 추출물-펩톤-덱스트로스(YPD) 배지에 여러 번 희석되었고, 3 내지 5시간 동안 30℃에서 배양되었다. 그 후 A_{600}이 생장기의 끝에서 측정되었고, 각 배양액 1.5 mL이 간단한 원심분리에 의해 수확되어 1.5 mL의 Z 완충액(60 mM $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 40 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7.0)에 현탁되었다. 상기 배양액은 원심분리에 의해 다시 수확되어 0.3 mL의 Z 완충액에 재현탁되었고, 세포를 라이시스(lysis)하기 위해 액체 질소를 사용하여 3번 동결-해동된 분취액 0.1 mL 로 나뉘었다. 그 후, 베타-머캅토에탄올이 보충된 Z 완충액(100 mL Z 완충액 및 0.27 mL의 베타-머캅토에탄올)의 분취액 0.7 mL이 상기 제조물에 첨가되었다. 반응은 O-니트로페닐 베타-D-갈락토피라노시드(O-nitrophenyl β-D-galactopyranoside, ONPG) 스톡 용액(4 mg/mL) 0.16 mL의 첨가에 의해 30℃에서 개시되었다. 색이 노란색으로 변한 후, 1 M Na_2CO_3을 0.4 mL 첨가함으로써 상기 반응은 종료되었다. A_{420}에서 베타-갈락토시다제 활성은 밀러(Miller) 유닛으로 나타내었다.

[0076]

[0077] **벼 돌연변이체에서 스트레스 내성**

[0078] 염분 처리를 위해, 벼 식물은 생장 챔버(28±1℃, 80% 상대습도 및 14시간-광/10시간-암의 광주기)에서 14일 동안 수경재배되었고, 그 다음에 250 mM 염화나트륨 용액에 3일 동안 옮겨졌다. 그 후, 상기 식물은 정상적인 생장 조건에 12시간 동안 옮겨졌다. 탈수 처리를 위해, 14일 동안 배양된 벼 식물은 12시간 동안 디쉬(dish)로 옮겨졌고, 그 후 재수화되어 14일 동안 배양되었다. 계속해서 생장한 식물의 수가 계산되었다.

[0079] **실시예 1: *OsABF1* 전사 인자의 동정**

[0080] 본 발명자들은 비생물적 스트레스 조건하에서 발현이 변화된 벼 유전자를 모니터링하기 위해 마이크로어레이 실

험을 수행하였다(데이타 미제시). 상기 분석으로부터, 본 발명자들은 비생물적 스트레스의 다양한 유형에 의해 유도된다고 밝혀진 bZIP 전사 인자인 *OsABF1*를 선발하고 규명하였다. *OsABF1*의 801 bp cDNA 클론은 TIGR 벼 게놈 Annotation 데이타베이스(http://blast.jcvi.org/euk-blast/index.cgi?project=osa1; LOC_Os01g64730)를 기초로 한 유전자 특이적 프라이머를 사용하여, 벼 유묘로부터 분리되었다. 서열 분석은 OsABF1이 OsZIP 패밀리 리스트(Nijhawan et al, 2008, Plant Physiol 146, 333-350) 유래의 추정(predicted) 유전자 *OsZIP12*와 동일하다는 것을 나타낸다. 다른 클로닝된 bZIP 단백질과 OsABF1의 비교는, 그룹 A bZIPs로서 이전에 분류된 전사 인자인 OsbZIP40, GBF4 및 AtbZIP13와 가장 높은 상동성(homology)을 보인다는 것을 나타내었다(Lu et al, 2008, Planta 229, 605-615). OsABF1 bZIP 도메인의 염기성 영역은 상기 3가지 bZIP 단백질의 염기성 도메인과 높은 서열 유사성을 나타내었다. OsABF1의 류신 지퍼 영역은 5개의 heptad repeats를 포함한다. 따라서, OsABF1은 ABF 패밀리를 구성하는 그룹 A bZIPs 중 하나로서 분류될 수 있다.

[0081] 다른 bZIPs로부터 OsABF1의 디버전스(divergence)를 평가하기 위해, 애기장대 및 벼의 그룹 A bZIPs에 대한 계통수가 구축되었다. 상기 분석은 벼 및 애기장대 bZIPs를 각각 포함하여, 모든 그룹 A bZIPs가 3개의 서브그룹으로 분류될 수 있다는 것을 나타낸다(도 1). 따라서 상기 서브그룹의 디버전스는 단자엽 및 쌍자엽 식물의 디버전스를 추정한다는 것을 제안한다.

[0082]

[0083] **실시예 2: 비생물적 스트레스 처리하에서 *OsABF1* 발현**

[0084] 무산소, 건조, 염, 저온, 삼투 및 산화 스트레스, 그리고 앱시스산과 같은 다양한 처리하에서 *OsABF1* 유전자의 발현 패턴은 벼 유묘의 신초 및 뿌리에서 RT-PCR에 의해 분석되었다(도 2). 처리되지 않은 대조군 샘플에서 *OsABF1* 전사체는 검출되지 않았다(도 2A). 대조적으로, *OsABF1*은 무산소 처리에 반응하여 4시간 후에 뿌리보다 신초에서 더 강하게 상향조절되었다(도 2B). 건조 및 염 처리 유묘에서, *OsABF1* 발현은 2시간 후에 높게 유도되었다(도 2C 및 2D). 산화 스트레스(과산화수소) 및 저온(4℃) 처리하에는, *OsABF1* 유전자가 2시간 이내에는 유사하게 유도되었고, 8 내지 12시간 후에는 최대 수준에 이르렀으며, 그 후 점차 감소되었다(도 2D 및 2F). 상기 결과는 실험한 모든 비생물적 스트레스 조건하에서 *OsABF1*이 빠르게 상향조절된다는 것을 증명한다. 게다가, 본 발명자들은 *OsABF1*이 식물호르몬인 앱시스산 처리에 대해 반응하는지를 조사하였고, 앱시스산-처리 유묘에서 2시간 이내에 높게 유도되는 것을 발견하였다(도 2G). 주지된 비생물적 스트레스 유도성 유전자인 *OsDEG10*은 상기 실험에서 양성 대조군으로서 사용되었으며, 상기 유전자의 전사체 수준은 무산소, 염, 건조, 염화나트륨, 메틸 비올로젠(methyl viologen) 및 저온의 조건하에 증가한다는 것이 이미 알려져 있다(Park et al, 2009, Biochem Biophys Res Commun 380, 597-602). 본 발명의 분석은 *OsDEG10* 이 모든 스트레스-처리 벼 유묘에서 12시간 이내에 발현되는 것을 확인하였다(도 2H).

[0085]

[0086] **실시예 3: OsABF1의 세포하 위치**

[0087] OsABF1 단백질의 세포하 위치를 결정하기 위해, 본 발명자들은 CaMV35S 프로모터의 조절하에서 GFP-OsABF1 및 OsABF1-GFP 융합 구축물을 제조하였다. 그 다음에 상기 구축물은 옥수수 엽육 원형질체에서 발현되었다. 상기 실험의 결과는 핵 마커인 OsHXK5NLS-RFP를 이용한 상기 융합 단백질의 공위치(colocalization)에 의해 확인된 바와 같이, OsABF1-GFP 및 GFP-OsABF1 융합 단백질이 옥수수 원형질체의 핵에서 발현된다는 것을 나타내었다(도 3A 및 3B) (Cho et al, 2009, Plant Physiol 149, 745-759). 따라서 상기 데이타는 OsABF1이 다운스트림 유전자의 발현을 조절하는 전사 인자로서 작용할 수 있는 핵 단백질이라는 것을 나타낸다.

[0088]

[0089] **실시예 4: OsABF1의 전이활성화 능력**

[0090] 효모 원-하이브리드 실험이 OsABF1의 전이활성화 능력을 시험하기 위해 수행되었다. 효모 GAL1 프로모터의 조절하에 B42 도메인을 포함하는 효모 발현 벡터인 pYESTrp2 내로 *OsABF1*, *OsABF1ΔC*, 및 *OsABF1ΔN* 서열이 클로닝되었다(도 4A). 따라서, B42 활성화 도메인에 융합된 cDNA 삽입체의 발현은 글루코스에 의해 유도될 수 있다. 상기 구축물은 보존된 ABRE 도메인인 EM1a 인자의 삼량체를 갖는 효모 균주 pYC7-Int를 형질전환하기 위해 사용되었다. SD-Ura-Trp에서 배양된 pYESTrp2/OsABF1으로 형질전환된 효모 균주에서, 베타-갈락토시다제 활성은 대조군 구축물에 비해 3배 더 높은 것이 발견되었다(도 4B). 상기 전이활성화 능력은 OsABF1ΔC에 대해서는 남아있지만, OsABF1ΔN을 포함하는 효모 균주에서는 N-말단 영역에 대한 요구(requirement)를 보여주며 관찰되지 않았다. 따라서, 본 발명의 결과는 OsABF1이 ABRE 코어(core) 서열을 포함하는 시스-액팅 인자와 결합하고, 그로

인해 다운스트림 유전자의 전사를 유도한다는 것을 제안한다. 이점에 있어서, ABRE 프로모터가 없는 pYC7-Int 균주에 대한 본 발명의 분석에서 효소 활성이 검출되지 않는다는 것은 주목할 만한 점이다(데이타 미제시).

[0091]

[0092] **실시예 5: *OsABF1* 돌연변이체의 분석**

[0093] 비생물적 스트레스 조건 동안에 OsABF1의 기능을 조사하기 위해, 본 발명자들은 화영(HY) 및 동진(DJ) 야생형 식물로부터 각각 만들어진, 2개의 *OsABF1*의 독립적 T-DNA 돌연변이 대립유전자인 *Osabf1-1* 및 *Osabf1-2* 를 분리하였다. *Osabf1-1*은 두 번째 엑손에 T-DNA 삽입을 포함하는 반면, *Osabf1-2*는 상기 삽입을 첫 번째 인트론에 갖는다(도 5A). 동형접합 돌연변이체에서 OsABF1 전사체의 결핍(absence)은 RT-PCR에 의해 확인되었고, 그 후 상기 식물에서 스트레스 내성 시험이 수행되었다(도 5B). 상기 실험에서, 상기 돌연변이체 및 그에 상응하는 야생형 식물은 14일 동안 수경재배되었고, 250 mM 염화나트륨 용액으로 옮겨 3일 동안 더 배양되었다. 염분 처리 후, 상기 식물은 수경 용액(hydroponic solution)에서 12일 동안 회복되었다. 상기 처리에서 생존한 돌연변이 식물은 없는 반면, 야생형 식물의 22% 내지 29%는 실험기간의 종료시점에 생존하였다(도 5C 및 5D). 상기 결과는 *Osabf1* 돌연변이체가 야생형 식물보다 고염에 더 감수성이 있다는 것을 증명한다.

[0094] 본 발명자들은 14일 된 유묘를 12시간 동안 건조 조건에 노출시킨 후 수경용액에서 14일 동안 회복시킴으로써, 탈수에 대한 평행 스트레스 내성 분석법을 수행하였다. 상기 결과는 돌연변이 식물의 23% 내지 42% 및 야생형 식물의 54% 내지 65%가 생존하였다는 것을 보여주었다(도 5E 및 5F). 따라서 야생형 식물은 Osabf1 돌연변이체보다 탈수에 대해 더 내성이 있다. 상기 결과는 또한, 고염 및 탈수를 포함하는 비생물적 스트레스 조건에 대한 벼 식물의 내성을 증진시키는데 OsABF1가 중요한 역할을 한다는 것을 제안한다.

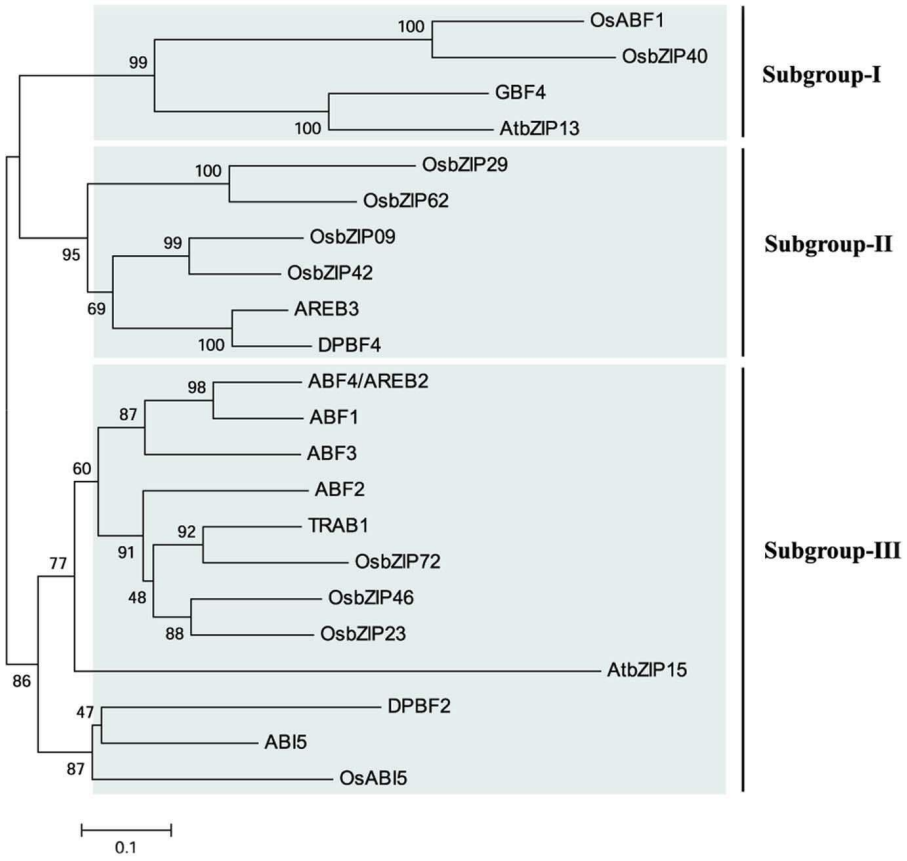
[0095]

[0096] **실시예 6: *Osabf1* 돌연변이체에서 앱시스산/스트레스-조절된 유전자의 발현**

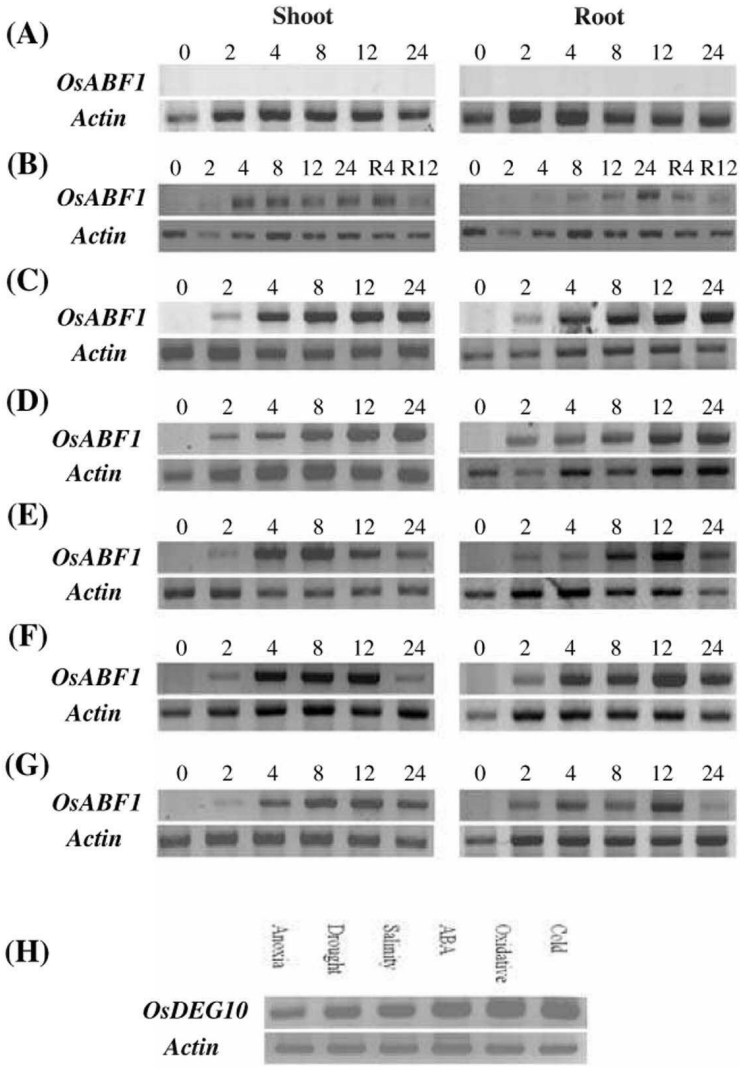
[0097] 앱시스산-의존성 및 독립 조절 시스템은 스트레스-반응성 유전자 발현의 조절에 관여한다는 것이 알려져 있다(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005, Trends Plant Sci 10, 88-94; 2006, Annu Rev Plant Biol 57, 781-803). OsABF1의 가능한 조절 역할을 평가하기 위해, 본 발명자들은 앱시스산을 처리한 Osabf1 돌연변이체 및 야생형 벼 유묘에서 앱시스산/스트레스-조절된 유전자의 발현 패턴을 비교하였다. 6개의 비생물적 스트레스-유도성 유전자가 OsABF1의 조절 기능을 조사하기 위해 선발되었다: 벼 유묘에서 저온, 건조, 고염 및 앱시스산에 의해 유도되는 OsABA45(LOC_Os12g29400), *Asr1*(LOC_Os02g33820), *Sa1T*(LOC_Os01g24710) 및 *OsNAC*(LOC_Os01g66120) (Rabanni et al, 2003, Plant Physiol 133, 1755-1767); 앱시스산에 의해 유도되는 late embryogenesis abundant 단백질을 암호화하는 *OsLEA3* (LOC_Os05g46480); 및 벼 유묘에서 염 반응에 관여하는 양이온 트랜스포터(cation transporter)를 암호화하는 *SKC1*(LOC_Os01g20160) (Zou et al, 2008, Plant Mol Biol 66, 675-683). 흥미롭게도, 앱시스산에 노출된 야생형 식물에서 *OsNAC*, *OsLEA3*, 및 *OsABA45* 유전자의 상향조절된 발현은, *Osabf1* 돌연변이체에서는 현저하게 억제되었다(도 6). 발현 프로파일에서 현저한 차이는 다른 유전자에 대해서는 발견되지 않았다. 상기 데이타는 OsABF1이 특이적 앱시스산/스트레스-유도성 유전자의 발현 동안에 조절 역할을 한다는 것을 나타낸다.

도면

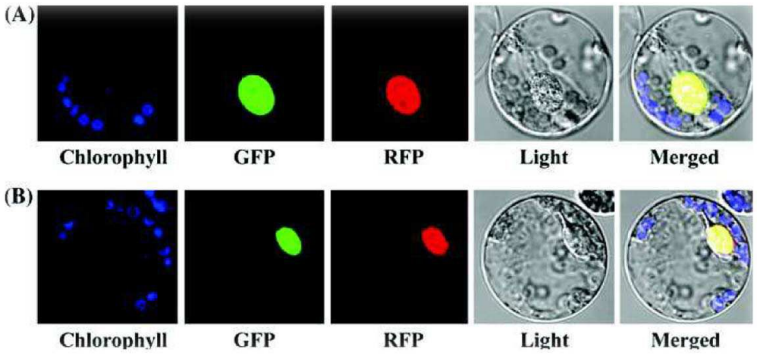
도면1


OsABF1
OsbZIP40
GBF4
AtbZIP13
Subgroup-I
OsbZIP29
OsbZIP62
OsbZIP09
OsbZIP42
AREB3
DPBF4
Subgroup-II
ABF4/AREB2
ABF1
ABF3
ABF2
TRAB1
OsbZIP72
OsbZIP46
OsbZIP23
AtbZIP15
DPBF2
ABI5
OsABI5
Subgroup-III
100
99
100
100
100
99
95
69
100
98
87
60
92
91
77
48
88
86
47
87
0.1

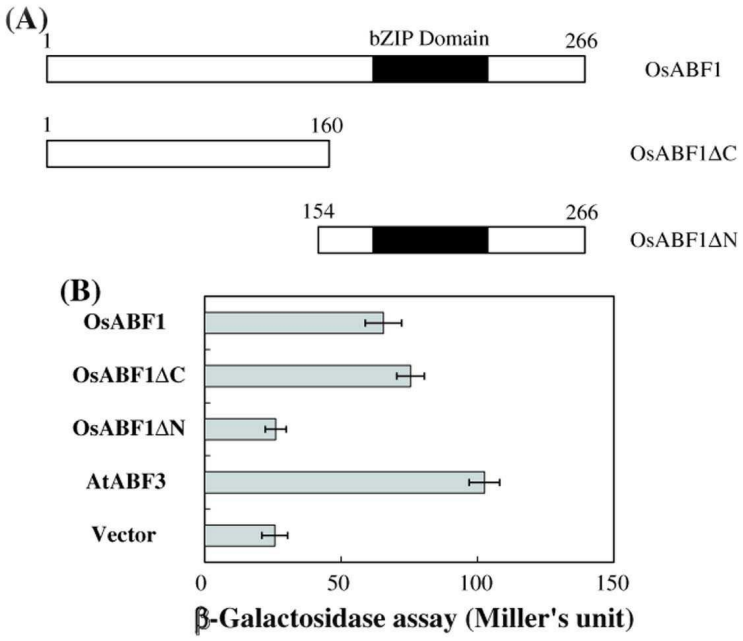
도면2


(A)
Shoot
Root
0 2 4 8 12 24
OsABF1
Actin
(B)
0 2 4 8 12 24 R4 R12
(C)
(D)
(E)
(F)
(G)
(H)
Anoxia
Drought
Salinity
ABA
Oxidative
Cold
OsDEG10

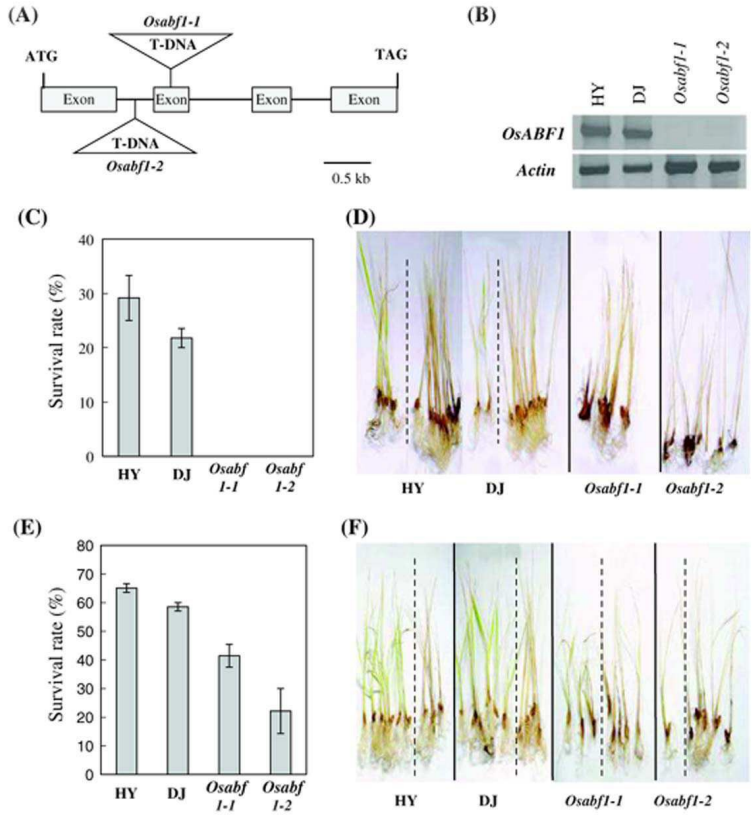
도면3


(A)
(B)
Chlorophyll
GFP
RFP
Light
Merged

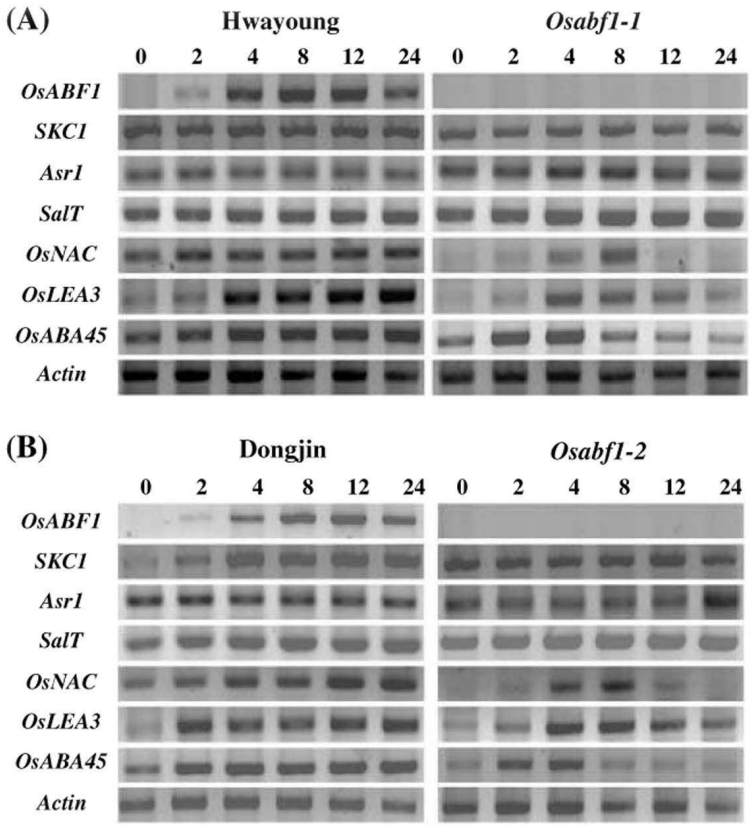
도면4


(A)
1
bZIP Domain
266
OsABF1
1
160
OsABF1ΔC
154
266
OsABF1ΔN
(B)
OsABF1
OsABF1ΔC
OsABF1ΔN
AtABF3
Vector
0
50
100
150
β-Galactosidase assay (Miller's unit)

도면5


(A)
Osabf1-1
T-DNA
ATG
TAG
Exon
Exon
Exon
Exon
T-DNA
Osabf1-2
0.5 kb
(B)
HY
DJ
Osabf1-1
Osabf1-2
OsABF1
Actin
(C)
Survival rate (%)
40
30
20
10
0
HY
DJ
Osabf 1-1
Osabf 1-2
(D)
HY
DJ
Osabf1-1
Osabf1-2
(E)
Survival rate (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
HY
DJ
Osabf 1-1
Osabf 1-2
(F)
HY
DJ
Osabf1-1
Osabf1-2

도면6



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Foundation University Suwon

University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> OsABF1 gene from Oryza sativa and uses thereof

<130> PN10048

<160> 25

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 801

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

atgatggcgt cgagggtgat ggcgtcgtcg tcgccgtcgc acacggcatc ggatctcgcg 60

cggttcgcgg cggggagggg tgggggcggg agcgcggggc tggggtcgat gaacgtggag 120

gagatcctcc gcggcatcta cgccgacatg ccgacgccgg cgctgcccct cgtcggcggt 180

gacaggccga tgtcgccgct cccggcgccg gatgtcgccg ccgcgccgcg gacggcggag 240

gaggtctgga aggagataac tggtgcgggc gtcgccgccg ccgccggcgg cgtggtgccc 300

cctgctgctg ctgctgctgc tgccccggcc gtcgtcgctg gcgctggcgc tggcaccggc 360

gcggagatga cgctggagga ctttctggcg agggagggcg cggtgaagga agacgaggct 420

gtggtcaccg atccctcggc ggccaagggg caggtggtga tggggttcct gaacggggca 480

gaggtcaccg gaggcgtcac cggcggcagg agcaggaaga ggcacctgat ggatccgatg 540

gaccgcgccg cgatgcagcg gcagaagcga atgatcaaaa atcgcgagtc ggcggcgagg 600

tcacgggaga ggaagcaggc ctatattgct gagctcgagt cgctggtcac gcaactcgag 660

gaggagaacg ccaagatgtt caaagaacag gaggagcaac atcagaaacg acttaaagag 720

ctcaaggaaa tggttgttcc agtcatcatt aggaaaacgt cagcacgaga tcttagaaga 780

acaaactcga tggagtggta g 801

<210> 2

<211> 266

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Met Ala Ser Arg Val Met Ala Ser Ser Ser Pro Ser His Thr Ala
1 5 10 15

Ser Asp Leu Ala Arg Phe Ala Ala Gly Arg Gly Gly Gly Gly Ser Ala
20 25 30

Gly Leu Gly Ser Met Asn Val Glu Glu Ile Leu Arg Gly Ile Tyr Ala
35 40 45

Asp Met Pro Thr Pro Ala Leu Pro Leu Val Gly Gly Asp Arg Pro Met
50 55 60

Ser Pro Leu Pro Ala Pro Asp Val Ala Ala Ala Pro Arg Thr Ala Glu
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Glu Ile Thr Gly Ala Gly Val Ala Ala Ala Ala Gly

85 90 95

Gly Val Val Pro Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Val Val
100 105 110

Ala Gly Ala Gly Ala Gly Thr Gly Ala Glu Met Thr Leu Glu Asp Phe
115 120 125

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

130 135 140

Pro Ser Ala Ala Lys Gly Gln Val Val Met Gly Phe Leu Asn Gly Ala

145 150 155 160

Glu Val Thr Gly Gly Val Thr Gly Gly Arg Ser Arg Lys Arg His Leu

165 170 175

Met Asp Pro Met Asp Arg Ala Ala Met Gln Arg Gln Lys Arg Met Ile

180 185 190

Lys Asn Arg Glu Ser Ala Ala Arg Ser Arg Glu Arg Lys Gln Ala Tyr

195 200 205

Ile Ala Glu Leu Glu Ser Leu Val Thr Gln Leu Glu Glu Glu Asn Ala

210 215 220

Lys Met Phe Lys Glu Gln Glu Glu Gln His Gln Lys Arg Leu Lys Glu

225 230 235 240

Leu Lys Glu Met Val Val Pro Val Ile Ile Arg Lys Thr Ser Ala Arg

245 250 255

Asp Leu Arg Arg Thr Asn Ser Met Glu Trp

260 265

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 3

aagcttatga tggcgtcgag ggtg 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 4

ggtaccctac cactccatcg agtt 24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsABF1 forward primer

<400> 5

tcgcacacgg catcggatct 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsABF1 reverse primer

<400> 6

agttgcgtga ccagcgactc 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsDEG10 forward primer

<400> 7

agcggatcga caagttattg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsDEG10 reverse primer

<400> 8

aacacaacca gcacctcatg 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SKC1 forward primer

<400> 9

agctctgccg atgaagacca g 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SKC1 reverse primer

<400> 10

agttggcgaa cgtcgagacg a 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Asr1 forward primer

<400> 11

accacctgtt ccaccacaag a 21

<210> 12

<

211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Asr1 reverse primer

<400> 12

tcttctcgtg gtgctcgtgg a 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SalT forward primer

<400> 13

aggacatcag tgtgccaccc a 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SalT reverse primer

<400> 14

tgcgtcgata agcgttccag a 21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsNAC forward primer

<400> 15

tgtacggaga gaaggagtgg t 21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsNAC reverse primer

<400> 16

tcatccaacc tgaggctgtt c 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsLEA3 forward primer

<400> 17

ataccaagga ggcgacgaag g 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsLEA3 reverse primer

<400> 18

tcatccccag cgtgctcatc a 21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsABA45 forward primer

<400> 19

tcttcaacac ctggagccgc a 21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsABA45 reverse primer

<400> 20

acggccttgt catagctaac g 21

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Actin1 forward primer

<400> 21

gatatggaga agatctggca 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Actin1 reverse primer

<400> 22

tagctcttct ccacggagga 20

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 23

caccatgatg gcgtcgaggg tgatggcg 28

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 24

ctaccactcc atcgagtttg ttct 24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 25

ccactccatc gagtttgttc ttct 24