

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12N 15/29 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년08월28일 10-0616369 2006년08월21일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2004-7006353	(65) 공개번호	10-2005-0043729
(22) 출원일자	2004년04월28일	(43) 공개일자	2005년05월11일
번역문 제출일자	2004년04월28일		
(86) 국제출원번호	PCT/JP2002/011585	(87) 국제공개번호	WO 2003/040363
국제출원일자	2002년11월06일	국제공개일자	2003년05월15일

(30) 우선권주장	JP-P-2001-00343002	2001년11월08일	일본(JP)
	JP-P-2002-00009729	2002년01월18일	일본(JP)
	JP-P-2002-00167345	2002년06월07일	일본(JP)
	JP-P-2002-00234412	2002년08월12일	일본(JP)

(73) 특허권자           도꾸리쓰교세이호징 가가꾸 기쥬쓰 신키꼬 기꼬  
                          일본 사이따마켄 가와구찌시 혼쵸 4쵸메 1방 8고

(72) 발명자            키쿠치카즈히로  
                          일본국아이치켄오카자키시오오니시초아자닌다29-1-201

                          히라노히로유키  
                          일본국도쿄도아다치쿠아오이2-16-4-312

                          와다마사미즈  
                          일본국도쿄도세타가야쿠카미키타자와3-25-7

(74) 대리인            특허법인 원전

심사관 : 정의준

(54) 벼의 트랜스포존 유전자

요약

본 발명은 벼의 비자립적 트랜스포존 유전자, 자립적 트랜스포존 유전자 및 트랜스포사아제 유전자, 및 트랜스포존 유전자를 전이시키는 방법 및 이 전이에 의해 형질전환한 식물에 관한 것이다.

발명자는, 벼 게놈 염기서열을 조사한 결과, 벼의 비자립적 트랜스포존 유전자, 자립적 트랜스포존 유전자 및 트랜스포사아제 유전자를 발견하고, 이로부터 유전자를 도입한 벼 품종에 있어서 트랜스포존의 전이를 확인했다.

대표도

도 1

## 색인어

트랜스포존, 자립, 비자립, 트랜스포사아제

## 명세서

### 기술분야

본 발명은 벼의 비자립적 트랜스포존 유전자, 자립적 트랜스포존 유전자 및 트랜스포사아제 유전자, 및 트랜스포존 유전자를 전이시키는 방법 및 이 전이에 의해 형질전환한 식물에 관한 것이다.

### 배경기술

벼(*Oryza sativa*)의 게놈의 기능해석의 일수단으로서 유전자 파괴법이 사용되고 있다. 벼의 유전자파괴에는, 액티베이터 인자의 트랜스포사아제(전이효소) 유전자를 도입한 고체와 분리인자를 도입한 고체를 교배시켜, 분리인자를 활성화시키는 방법, T-DNA를 사용하는 방법, 레트로트랜스포존에 의한 방법 등이 알려져 있지만, 벼의 자연돌연변이체를 해석하여도, 활성이 있는 트랜스포존의 존재는 알려져 있지 않았다(세포공학별책 식물세포공학시리즈14 「식물의 게놈연구 프로토콜」 2000년 2월(수윤사)).

한편, 게놈프로젝트에 의해 벼를 비롯하여 많은 식물의 유전자의 염기서열이 명확하게 되고, 그들의 결과는 차례로 데이터베이스화되어 있다. 더욱이 동식물에 있어서 작동 유전자로서 트랜스포존 유전자는 어느 정도 특유한 염기서열을 가지고 있으므로, 그 정보에 근거하여 트랜스포존의 가능성을 갖는 유전자의 연구가 이루어지고 있지만, 아직 충분한 해명이 이루어져 있지 않다.

또, 벼를  $\gamma$ 선 조사하는 것에 의해 유발된 돌연변이체로부터 트랜스포존이라고 생각되는 서열이 발견되어 있다(테즈야 나카자키 등 「용이변성세립유전자 slg와 영역에 있어서 트랜스포존 유사 서열의 삽입다형성」, 일본육종학회 제 10회 추계대회, 2001년 10월).

### 발명의 상세한 설명

본 발명은, 벼게놈 염기서열을 조사한 결과, 트랜스포존에 특징적인 역방향 반복서열을 발견하고, 트랜스포존으로 보이는 서열에 관하여 많은 시험을 행한 결과, 이것이 트랜스포존(비자립적 트랜스포존)이라는 확증을 얻었다.

더욱이, 본 발명자는, 이 비자립적 트랜스포존 유전자를 기초로 하여, 자립적 트랜스포존 유전자를 발견하고, 더욱이 그 유전자를 전이시키는 트랜스포사아제 유전자를 특정하였다.

### 과제를 해결하기 위한 수단

본 발명자는, 데이터베이스에 순차적으로 등록되는 벼게놈 염기서열을 가지고, 1번 염색체로부터 시작하여, 반복서열(LTR)을 조사하여 왔다. 표 1에 나타내는 엑세션넘버 AP002843의 클론에 있어서, LTR에 주목하여, 이 영역에 관해서 상세하게 해석한 결과, LTR의 직후의 144459~144473 및 144874~144888의 장소에서, 트랜스포존에 특징적인 역방향 반복서열을 발견하였다(도 1, 서열번호 6). 후술하는 실시예에서 명확하게 되지만, 이 반복서열에 끼워진 서열(서열번호 1)은, 꽃밥 배양 등의 인위적 조작에 의해 현저하게 가동성을 나타내는 비자립적 트랜스포존인 것을 알 수 있었다.

### [표 1]

AP002843 *Oryza sativa* genomic DNA, chromosome 1, PA

```

ACCESSION AP002843   NCBI SRS Genome-Net
ORGANISM   Oryza sativa NCBI SRS

LOCUS      AP002843   148762 bp   DNA   PLN   26-JAN-2001

FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..148762
                        /chromosome="1"
                        /clone="P0407B12"
                        /cultivar="Nipponbare"
                        /organism="Oryza sativa"
                        /sequenced_mol="DNA"

     LTR                139482..139690
                        /note="5' LTR"

     CDS                139739..144052
                        /gene="P0407B12.28"
                        /note="probably inactive due to frameshifts in CDS"
                        /note="pseudogene, similar to Oryza longistaminata
                        probable gag/pol polyprotein U72725"
                        /pseudo

     LTR                144047..144255
                        /note="3' LTR"

     CDS                join(144653..144692,145148..145311)
                        /codon_start=1
                        /gene="P0407B12.29"
                        /note="hypothetical protein"
                        /protein_id="BAB17191.1"
                        /translation="MRRSHGGGGGRKRSVPSSSHPEKKAIDRIKREDAGRGRAGRSLVQ
                        PLAAFPAIDGGGGGLARLLRW"
    
```

다음에, 이 비자립적 트랜스포존(서열번호 1)을 Query(호몰로지 탐색용 DNA)로서 사용하여 BLAST법에 의해 호몰로지 검색을 행하였다. 검색결과 다수는, 이 비자립적 트랜스포존(서열번호 1) 자체였지만, 그 밖에 트랜스포존으로 기대되는 엑세션넘버 AP004236과 AP003968이 발견되었다. 이들 AP004236과 AP003968을 비교한 결과, 모두 제 6 염색체상의 클론이고, 중복한 동일 영역의 서열이었다.

그 때문에, 비자립적 트랜스포존(서열번호 1)의 1~253과 AP004236의 89360~89612의 사이에서는, 상동성은 252/253(99%)이고, 비자립적 트랜스포존(서열번호 1)의 254~430과 AP004236의 94524~94700의 사이에서는, 상동성은 177/177(100%)로 보존되어 있었다.

상기 비자립적 트랜스포존(서열번호 1, 430bp)과 트랜스포존(서열번호 2, 5341bp)은 모두 15bp의 역방향 반복서열을 갖고, TTA 또는 TAA를 인식하여 삽입되어 있다.

서열번호 2(5341bp)의 서열을 기초로 Open Reading Frame(ORF)을 탐색한 결과, 2종류의 추측되는 ORFI와 ORFII가 검색되었다.

서열번호 2로 표시되는 염기서열을 갖는 트랜스포존 유전자의 구조를 도 9의 상단에 나타낸다. 비자립적 트랜스포존(서열번호 1, 430bp)은 1~253 및 5165~5341, ORFI는 1526~1914 및 1939~2663, ORFII는 3190~4557에 각각 위치하고 있었다.

더욱이, 서열번호 2로 표시되는 염기서열과 유사한 유전자를 단리하기 위해서 서열번호 2를 Query(호몰로지 탐색용 DNA)로 하여 BLAST법에 의해 호몰로지 검색을 한 결과, 서열번호 2로 표시되는 염기서열 이외에 엑세션넘버 AP004753(제 2 염색체)와 AP003714(제 6 염색체)가 발견되었다. 이 2종류의 클론은 동일한 서열(서열번호 3)이고, 다른 염색체에 위치하고 있었다(수개의 카피(copy) 존재). 인디카형에도 존재하는 것으로 보아, 일본형으로부터 인디카형까지, 많은 품종에 유지되어 있는 유전자이다. 이 서열번호 3(5166bp)으로 표시되는 염기서열은, 서열번호 2로 표시되는 염기서열과 동일하게, 역방향 반복을 갖고, TAA(3bp)를 인식하여 삽입되어 있었다.

서열번호 3의 서열을 기초로 Open Reading Frame(ORF)를 탐색한 결과, ORFI와 ORF II가 검색되어 2종류의 단백질을 코드하고 있다고 생각되었다.

서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 갖는 트랜스포존 유전자의 구조를 도 9의 하단에 나타낸다. 비자립적 트랜스포존(서열번호 1, 430bp)은 1~170 및 5092~5166에 위치하고 있지만, 비자립적 트랜스포존(서열번호 1, 430bp)과의 일치도가 도중에서 없어서 있다. 또한, ORFI는 1630~2652, ORFII는 2959~4407에 각각 위치하고 있었다.

염기서열 3으로 표시되는 염기서열을 차포니카(AP004753 및 AP003714)와 인디카(Scaffold6962)에서 비교해 보면, 도 10에 나타낸 바와 같이, 90% 이상의 상동성이 확인되었다. 또, 비자립적 트랜스포존(서열번호 1, 430bp)의 인디카에 있어서 변이빈도를 조사해 보면, 도 11에 나타낸 바와 같이, 95% 이상의 상동성이 확인되었다.

현재, 서열번호 2 및 3의 ORF I의 기능에 대하여는 어떤 것도 유추하지 못하고 있다.

다음에, ORF II가 트랜스포사아제(전이효소)를 코드하고 있는지 여부를 명확하게 하기 위해서, ORF II의 아미노산 서열에 관해서, 이미 알려진 트랜스포사아제의 보존영역의 유무를 조사하였다. 서열번호 2의 ORF II와 서열번호 3의 ORF II의 아미노산서열을 서열번호 4와 서열번호 5에 나타낸다. 이들 2개의 ORF II의 아미노산서열의 비교를 도 12에 나타내는데, 그들 사이의 상동성은 75% 이상(77%)으로 상당히 높았다. 이들 2종의 아미노산 서열은, 모두 DXG/AF/F motif와 YREK motif를 갖기 때문에(Q.H.Le, K. Turcotte and T. Bureau, Genetics 158: 1081~1088(2001)), IS transposase family에 속한다고 결론내려진다.

또한, 서열번호 2의 ORF II의 염기서열과, 서열번호 3의 ORF II의 서열번호와의 상동성은 75% 이상(79.3%)이었다.

즉, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열에 적어도 95% 상동인 DNA로 이루어지는 벼의 트랜스포존 유전자이다. 서열번호 1로 표시되는 염기서열에 적어도 95% 상동인 DNA는, 꽃밥배양 또는 약제로 처리하는 것에 의해 전이하는 비자립적 트랜스포존으로서의 기능을 갖는 유전자라고 생각된다.

또한, 본 발명은, 인헨서 또는 프로모터가 그 내부에 삽입된 청구항 1에 기재된 트랜스포존 유전자이다.

더욱이, 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열에 적어도 90% 상동인 DNA로 이루어지는 벼의 트랜스포존 유전자이다. 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열에 적어도 90% 상동인 DNA는, 꽃밥배양 또는 약제로 처리하는 것에 의해 전이하는 자립적 트랜스포존으로서의 기능을 갖는 유전자라고 생각된다.

또한, 본 발명은 서열번호 2의 3190위치~4557위치의 염기서열 또는 서열번호 3의 2959위치~4407위치의 염기서열에 적어도 75% 상동인 DNA로 이루어지는 벼의 트랜스포사아제 유전자이다. 이들 염기서열에 적어도 75% 상동인 DNA는, 상기의 트랜스포존 유전자를 전이시키는 기능을 갖는 유전자라고 생각된다.

또한, 본 발명은 서열번호 4 또는 서열번호 5로 표시되는 아미노산서열, 또는 이 아미노산 서열에 있어서 1 또는 수개의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산서열을 갖는 단백질로 이루어지는 트랜스포사아제이다. 또한, 이 트랜스포사아제는, 서열번호 4 또는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열에 적어도 75% 상동인 아미노산 서열을 갖는 벼의 트랜스포존 유전자라고 말할 수 있다.

더욱이, 본 발명은 이 단백질을 코드하는 트랜스포사아제 유전자이다.

본 발명은, 또한, 상기에 기재된 어느 트랜스포존 유전자를 함유하는 플라스미드이다. 더욱이, 본 발명은 프로모터 및 상기에 기재한 어느 트랜스포사아제 유전자를 함유하는 플라스미드이다. 여기에서 사용할 수 있는 플라스미드로서, Ti플라스미드, pBI-121플라스미드 등의 바이너리벡터를 들 수 있다. 여기에서 사용할 수 있는 프로모터로서는, 칼리플라워모자이크월스의 35S 프로모터 · 열쇼크프로모터 · 화학물질유도성 프로모터 등을 들 수 있다. 또한 프로모터 및 상기 유전자의 결합방법에 특별히 제한은 없고, 통상의 유전자 공학적 수법에 따라서 적절하게 행하면 좋다.

또한, 본 발명은, 상기의 어느 트랜스포존 유전자가 도입된 형질전환체이다. 이 숙주는 식물인 것이 바람직하고, 숙주로서는, 벼, 보리, 밀 또는 옥수수가 바람직하다. 이와 같은 식물을 형질전환하는 데에는, 통상의 유전자공학적 수법을 사용하여, 이 유전자를 상기 플라스미드에 삽입하고, 이 식물을 형질전환하면 된다.

더욱이, 본 발명은, 프로모터 및 상기 트랜스포사아제 유전자가 도입된 형질전환체이다. 필요에 따라서 이들 이외의 트랜스포존 유전자를 도입하여도 좋다. 프로모터로서는 상기의 것을 사용할 수 있다. 이 숙주는 식물인 것이 바람직하고, 숙주로서는 보리, 밀 또는 옥수수가 바람직하다. 이와 같은 식물을 형질전환하는 데에는, 통상의 유전자 공학적 수법을 사용하여, 이 유전자를 상기 플라스미드에 삽입하고, 이 식물을 형질전환하면 된다.

본 발명은 또한, 상기의 어느 형질전환체를 꽃밥배양 또는 약제로 처리하는 것에 의해, 상기의 어느 트랜스포존 유전자를 전이시키는 방법이다.

더욱이, 본 발명은 상기의 어느 방법에 의해, 상기 트랜스포존 유전자가 전이하여 형질전환한 식물 또는 그 종자이다. 이 식물로서 벼, 또는 벼의 근린종인 보리, 밀 또는 옥수수가 바람직하다.

또한 본 발명은, 상기 어느 트랜스포존 유전자를 전이시키는 방법에 의해 상기의 어느 트랜스포존 유전자를 전이시키는 단계, 전단계에서 얻은 식물로부터 DNA를 추출하는 단계, 상기 DNA를 트랜스포존 유전자 내에 절단부위가 없는 제한효소로 소화하는 단계, 전단계에서 얻어진 DNA 단편을 리게이션하는 단계, 전단계에서 얻어진 DNA 단편을 PCR을 행하는 단계, 얻어진 PCR 산물의 염기서열을 결정하는 단계로 이루어지는, 트랜스포존 유전자의 삽입영역을 특정하는 방법에 있어서, 상기 PCR을 행하기 위해 사용하는 프라이머로서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 5'말단으로부터 적어도 10염기, 바람직하게는 10~20염기, 보다 바람직하게는 10~15염기의 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 3'말단으로부터 적어도 10염기, 바람직하게는 10~20염기, 보다 바람직하게는 10~15염기의 올리고뉴클레오티드 또는 이들에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 사용하는 방법이다. 이 프라이머는, 상기 올리고뉴클레오티드의 염기수가 15염기 이하인 경우에는, 염기서열의 5'말단으로부터 10~15염기의 올리고뉴클레오티드가 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 3'말단으로부터 10~15염기를 겸할 수 있으므로, 1종류로 할 수 있다. 즉, 이 경우에는, PCR을 행하기 위해서 사용하는 프라이머로서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 5'말단으로부터 10~15염기의 올리고뉴클레오티드 또는 이것에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 사용하면 된다. 이와 같이 하여 트랜스포존 유전자의 삽입영역을 특정할 수 있으면, 트랜스포존 유전자의 삽입에 의해 파괴된 유전자를 알 수 있다.

#### 도면의 간단한 설명

도 1은, 액세션넘버 AP002843의 유전자서열의 일부(서열번호 6)를 나타낸다. 트랜스포존에 특징적인 역방향 반복서열이 LTR의 직후의 144459~144473 및 144874~144888의 장소에 존재하고 있다.

도 2는, 4종의 벼 품종의 성엽(成葉)의 트랜스포존 DNA를 포함하는 영역(액세션넘버 AP002843)의 아가로스겔 전기영동을 나타낸다(실시예 2). 일본청(日本晴:Nihonbare)에 있어서 약 850bp의 밴드가 얻어지고, 트랜스포존 유전자(430bp)가 삽입되어 있는 것을 나타낸다. 한편, 코시히카리, 히토메보레, 야마호우시에서는 약 420bp의 밴드가 얻어지고, 트랜스포존 유전자가 삽입되어 있지 않은 것을 나타낸다.

도 3은, 일본청의 종자 유래 캘러스의 트랜스포존 DNA를 포함하는 영역(액세션넘버 AP002843)의 아가로스겔 전기영동을 나타낸다(비교예 1).

도 4는, 일본청의 꽃밥 유래 캘러스의 트랜스포존 DNA를 포함하는 영역(액세션넘버 AP002843)의 아가로스겔 전기영동을 나타낸다(실시예 3). 420bp의 밴드는 트랜스포존 유전자가 결실되어 있는 것을 나타낸다.

도 5는 일본청의 꽃밥 유래 캘러스의 아가로스겔 전기영동을 나타낸다(실시예 4). No.1은 일본청(콘트롤), No.2~10은 꽃밥 유래 캘러스로부터의 재분화 식물체를 나타낸다. 트랜스포존 DNA중의 서열로 이루어지는 프로브를 사용하였다. No.2와 No.6에, 콘트롤인 일본청 품종에는 없는 신규한 위치에 밴드(화살표)를 확인할 수 있다.

도 6은, 실시예 4에서 재분화한 벼 중에 형질이 변이한 것이 있는 것을 나타내는 사진이다. 이 벼는 잎이 오그라져있고 짧다.

도 7은, 일본청의 종자 유래 캘러스의 트랜스포존 DNA를 포함하는 영역의 아가로스겔 전기영동을 나타낸다(실시예 5). 상단의 숫자는 5-아자시티딘의 농도를 나타낸다. 300bp의 밴드는 트랜스포존 유전자(430bp)가 결실되어 있는 것을 나타낸다.

도 8은, 트랜스포존 유전자(430bp)가 결실되어 있는 4종의 클론의 염기서열을 나타낸다.

도 9는, 염기서열 2 및 3으로 표시되는 염기서열을 갖는 트랜스포존 유전자의 구조를 나타낸다.

도 10은, 자포니카(AP004753 및 AP003714)와 인디카(Scaffold6962)에 있어서 염기서열 3으로 표시되는 염기서열의 상동성을 나타낸다.

도 11은, 인디카에 있어서 트랜스포존(염기서열 1, 430bp)의 변이빈도를 나타낸다.

도 12는, 서열번호 2의 ORF II와 서열번호 3의 ORF II의 아미노산서열의 비교를 나타낸다. 이들의 상동성은 75% 이상 (77.8%)이고(도면중, 상동개소를 \*표시로 나타낸다.), 모두 DXG/AF/F motif와 YREK motif를 갖는다. 상단은 서열번호 4의 아미노산서열(서열번호 2의 ORFII에 상당한다.), 하단은 서열번호 5의 아미노산서열(서열번호 3의 ORFII에 상당한다.)을 나타낸다.

도 13의 왼쪽은, 일본청의 꽃밥 유래 캘러스의 트랜스포존 DNA를 포함하는 영역(엑세션넘버 AP004236)의 아가로스겔 전기영동을 나타낸다(실시에 6). 1.2Kb의 밴드는 트랜스포존 유전자가 결실되어 있는 것을 나타낸다. 도 13의 오른쪽은, 일본청의 종자 유래 캘러스의 트랜스포존 DNA를 포함하는 영역(엑세션넘버 AP004236)의 아가로스겔 전기영동을 나타낸다(비교예 2).

도 14는, 각 품종에 있어서 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2, 도면의 상단에 나타낸다.)의 유무를 나타내는 전기영동도이다(실시에 7). 일본청(1)과 코시히카리(2)에는 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 나타내는 밴드(화살표)가 보이지만, 대중(台中) 65호(3)와 카사라스(4)에는 이 밴드가 나타나지 않는다.

도 15는, 일본청의 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 도입한 대중 65호의 꽃밥 유래 캘러스의 전기영동도이다(실시에 8). 대중 65호에는 나타나지 않은 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 나타내는 밴드(화살표)가 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 도입한 대중 65호의 꽃밥 유래 캘러스(No.3~6)에서는 확인된다.

도 16은, 일본청의 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 도입한 대중 65호의 꽃밥 유래 캘러스의 비자립적 트랜스포존 유전자를 포함하는 영역의 전기영동도이다(실시에 8). L06 유전자좌에 있어서 비자립적 트랜스포존 유전자가 결실된 것으로 생각되는 사이즈의 밴드가 관찰되었다(화살표).

도 17은, L02 유전자좌에 존재하는 비자립적 트랜스포존 유전자가 결실된 것으로 생각되는 사이즈의 밴드의 DNA단편의 염기서열을 나타낸다. 비자립적 트랜스포존 유전자서열(서열번호 1)이 결실되어 있다.

도 18은, L06 유전자좌에 존재하는 비자립적 트랜스포존 유전자가 결실된 것으로 생각되는 사이즈의 밴드의 DNA단편의 염기서열을 나타낸다. 비자립적 트랜스포존 유전자서열(서열번호 1)이 결실되어 있다.

## **발명의 실시의 형태**

본 발명은, 우선 전장 430bp의 벼의 비자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 1)이다. 이 트랜스포존 유전자는 15bp의 터미널 인버티드 리피트(terminal inverted repeats)를 가지고, 215bp(CT)와 대칭구조를 이루고 있다.

다음에, 2종류의 트랜스포존 유전자(서열번호 2 및 3)는, 모두 트랜스포사아제(서열번호 4 및 5)를 코드하고 있고, 자립적 트랜스포존이다.

자립적 트랜스포존은, 트랜스포사아제를 코드하고 있는 것이 특징이고, 스스로 가동할 수 있으며, 비자립적 트랜스포존의 전이를 유발하는 것이다. 한편, 비자립적 트랜스포존은, 상기 트랜스포사아제가 결실된 것이고, 스스로 가동할 수 없으며, 가동에는 자립적 트랜스포존의 도움이 필요하다. 구조상, 자립적 트랜스포존과 비자립적 트랜스포존을 비교하면, 결실한 것 이외의 영역에서는 상동성이 보존되어 있는 것이 특징이다.

본 발명의 트랜스포존을 갖는 식물, 본 발명의 트랜스포존으로 형질전환시킨 식물, 또는 본 발명의 트랜스포사아제 유전자를 갖는 식물, 또는 본 발명의 트랜스포사아제 유전자로 형질전환된 식물은, 방사선 조사, 약제에 의한 처리, 또는 꽃밥 배양 등에 의해 활성화시키는 것에 의해 본 발명의 트랜스포존을 전이시킬 수 있다. 이와 같은 수단에 의해 트랜스포존이 현저하게 활성화하기 때문에, 용이하게 인공적인 트랜스포존의 전이가 일어난다.

약제에 의한 처리는, 벼 등의 식물의 종자, 잎, 뿌리, 줄기 또는 액아(腋芽), 또는 그것에 유래하는 캘러스를 약제로 처리하여 행한다. 약제, 예컨대 5-아자시티딘 또는 5-아자데옥시시티딘에 의한 처리를 행하기 위해서는, 이들 약제를 0.01~5mM, 바람직하게는 0.05~2mM 포함하는 고체 또는 액체배지에, 이들 식물의 캘러스를 이식하여 행하는 것이 일반적이다. 이 캘러스는, 뿌리, 잎, 줄기 등의 식물기관을 옥신이나 사이토키닌을 적당량 첨가한 배지에서 조직배양하는 것에 의해 분화된 식물기관으로부터 탈분화하여 형성된 세포 덩어리를 말한다. 이 세포 덩어리는 미분화이고, 분화전능성을 갖는다. 분화전능성이란, 싹, 뿌리 등의 새로운 기관으로 재분화하는 능력이고, 예컨대 캘러스를 매개하므로써 1장의 잎으로부터 수백의 클론식물체를 얻는 것이 가능하다.

또한, 꽃밥 배양은 반수체 육종법의 일종이고, 벼의 수술의 선단에 있는 꽃밥을 취출하여, 옥신 등의 호르몬을 주체로 하고, 코르시틴 등의 배수처리제 등을 첨가한 배지에서 배양한다. 꽃밥은 유전자를 1세트밖에 갖지 않는 반수체이지만, 반수체는 배화(倍化)하기 쉽기 때문에, 용이하게 순계를 얻을 수 있다. 벼의 꽃밥 유래 캘러스는, 배양기간이 길게 되면, 자연히 배화하여 반수체 배화계통으로 된다. 이 캘러스를 재분화배양하면, 변이식물체인 호모형의 종자가 얻어진다. 이 재분화배지로서는, 사이토키닌 등의 호르몬을 주체로 한 배지를 사용한다.

또한, 트랜스포존의 서열중의 적당한 2개의 서열을 프라이머로서 사용하여 PCR법에 의해 제작한 프로브를 사용하면, 전이한 트랜스포존이 삽입되는 것에 의해 파괴된 유전자를 특정할 수 있다. 이와 같이 형질전환된 벼의 변이체와 그 유전자와의 상관을 해명하는 것에 의해, 그 유전자의 기능을 알 수 있다.

트랜스포존 태그 계통에 의하여 파괴된 유전자를 간편하게 동정하는 것은, 매우 중요한 과제이다. 트랜스포존 삽입위치의 조사에는, 트랜스포존 디스플레이 등 다양한 방법이 있지만, 각각 번잡한 조작이 필요하다. 따라서, 본 발명자는 inverse PCR법을 사용한 간편한 방법을 확립하였다. 이 경우, 트랜스포존내에 설계한 PCR 프라이머가 성공의 열쇠가 된다. 식물체 등으로부터 게놈 DNA를 추출후, 트랜스포존내에 절단부위가 없는 제한효소(본 실험에서는 AluI을 사용)로 소화시키고, 리가아제(셀프)로 리게이션을 행한다. 이것을 템플레이트로 하고, 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 5'말단으로부터 적어도 10염기의 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 3'말단으로부터 적어도 10염기의 올리고뉴클레오티드 또는 이들에 상보적인 올리고뉴클레오티드, 특히 터미널 인버티드 리피트영역(서열번호 1로 표시되는 염기서열의 5'말단으로부터 15염기, 및 3'말단으로부터 15염기의 영역)에 작성한 PCR 프라이머를 사용하여 PCR을 행하고, 얻어진 PCR 산물의 염기서열을 결정하여, 트랜스포존의 삽입위치를 알 수 있다.

비자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 1)의 이용법의 하나로서, 이 비자립적 트랜스포존 유전자의 내부에 인핸서 또는 프로모터를 삽입하고, 이들을 비자립적 트랜스포존과 함께 전이시킬 수 있다. 즉, 인핸서나 프로모터 등이 삽입된 유전자를 벼 또는 그 밖의 식물에 도입하여, 꽃밥 배양이나 약제처리하는 것에 의해, 이 유전자의 전이를 유발하면, 이 유전자의 전이선의 근방에 있는 다른 유전자를 적극적으로 발현시키는 것이 가능하게 되고, 그 결과, 효율 좋게 gain of function의 변이체를 작출할 수 있다. 이 프로모터로서, 예컨대 칼리플라워모자이크바이러스의 35S프로모터 등을 사용할 수 있고, 또한 인핸서로서는, 예컨대 칼리플라워모자이크바이러스의 35S프로모터중의 인핸서영역(-90~-440) 4개를 일렬로 연결한 것 등을 들 수 있다. 인핸서의 삽입 개소는, 서열번호 1의 유전자내의 인버티드 리피트 영역을 제외한 장소이면, 특별히 제한은 없다. 또한 프로모터의 삽입개소는, 서열번호 1의 유전자내의 인버티드 리피트 영역을 제외한 장소에서 메티오닌이 하류에 존재하지 않으면, 특별히 제한은 없다. 이들은 모두 트랜스포존의 전이에 지장이 없으면, 서열번호 1의 250bp부근에 삽입하는 것이 바람직하다. 인핸서나 프로모터 등의 삽입방법은, 서열번호 1의 염기서열을 이분하도록 하는 제한효소사이트 또는 PCR법을 사용하여 그 중에 클로닝사이트를 작성하여, 삽입할 수 있다.

본 발명은 종래 벼에 있어서 가동성을 나타내는 트랜스포존 유전자가 알려져 있지 않았지만, 가동성을 나타내는 벼의 트랜스포존 유전자를 처음으로 밝혀내었다. 더욱이, 발명자는 꽃밥 배양 등의 간단한 수단에 의해, 비자립적 트랜스포존 유전자가 전이하는 것을 확인하였다. 즉, 인위적으로 비자립적 트랜스포존 유전자를 전이시키는 수단을 제공하는 것에 성공하였다.

또한 실시예에 있어서, 꽃밥 배양 등의 인위적 조작에 의해, 비자립적 트랜스포존 유전자가 결실된 것을 밝혀내고, 더욱이 비자립적 트랜스포존 유전자가 삽입된 유전자좌를 직접 확인하였다. 이와 같이 인위적으로 전이시킬 수 있는 트랜스포존 유전자를 발견할 수 있으므로, 인위적으로 트랜스포존 태그 계통을 벼에서 처음으로 작출하는 것에 성공하였다.

더욱이, 본 발명은 벼의 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2 및 3)를 밝혀내고, 더욱이, 이들에 포함되는 트랜스포사아제 유전자를 밝혀내었다. 발명자는, 이와 같은 자립적 트랜스포존 유전자를 도입한 벼에 있어서, 꽃밥 배양이나 약물투여

라는 간단한 수단에 의해, 이 트랜스포존 유전자가 전이하는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명은 이 자립적 트랜스포존 유전자나 트랜스포사아제 유전자를 벼 및 그 이외의 다른 식물에 도입하고, 이러한 인위적 조작을 실시하는 것에 의해 이들 식물을 용이하게 인위적으로 형질전환시키는 수단을 제공한다.

본 발명의 자립적 트랜스포존의 이용법으로서, 이것을 변이원으로서 이용하여, 벼나 그 밖의 식물에 있어서, 트랜스포존 태그 계통을 작출할 수 있다.

본 발명을 이용하여 랜덤하게 본 트랜스포존을 전이시킨 계통을 수만계통 만들어낼 수 있다. 자연계에서 생육한 식물에서의 전이는 매우 드물기 때문에, 식물조직배양에 의해 유도한 꽃밥 유래 캘러스나 5-아자시티딘(5-azacytidine) 처리한 종자유래 캘러스 등에 의하여 고빈도로 전이를 유발한다. 벼 이외의 식물에 있어서도 형질전환법에 의해 본 발명의 자립적 트랜스포존을 도입하면, 동일하게 전이를 유발하는 것이 가능하다. 이와같이 하여 얻은 변이체는 유전학적 해석법이나 역유전학적 해석법에 의하여 해석할 수 있다.

상기 유전학적 해석법이란, 변이체의 표현형으로부터 그 원인유전자를 단리하는 방법으로, 본 트랜스포존과 변이체의 표현형이 링크해 있으면, 이 태그(트랜스포존)를 이용하여, 용이하게 원인 유전자의 단리를 행할 수 있다. 예컨대, 염에 강한 벼를 찾고 싶으면, 트랜스포존 태그 계통의 종자로부터 배양한 벼의 내염성을 조사하여, 원하는 벼를 선별하면 된다.

또한, 역유전학적 해석법이란, 유전자로부터 그 유전자의 기능이 상실된 변이체를 단리하는 방법이다. 다수의 변이체로부터 DNA를 추출하여 풀(pool)을 만든다. 트랜스포존 태그 계통의 DNA를 구입하여, 그중에서 목적하는 유전자에 트랜스포존이 삽입된 변이체를 PCR법에 의하여 분리할 수 있다.

또한, 최근의 게놈프로젝트에 의하여 망라적인 해석으로서, 벼의 전체유전자에 대항한 변이체를 작출하고, 트랜스포존의 삽입위치를 데이터베이스화할 수 있다. 이용자는 목적에 맞추어 데이터베이스를 검색하여 목적한 변이체의 종자를 주문할 수 있다.

이하 실시예에 의하여 본 발명을 예증하지만, 이것들은 본 발명을 제한하는 것을 의도한 것은 아니다.

## 실시예

### 실시예 1

벼 품종, 일본청의 성엽(成葉)으로부터 DNA를 추출했다(Kikuchi et al. (1998) Plant Biotechnology 15:45~48). 트랜스포존 DNA의 양단에 있는 역방향 반복서열 사이의 영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, PCR 프라이머로서 서열번호 7의 DNA서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용하였다. PCR에는 GeneAmp9600 시스템(ABI 사)을 사용하여 행하였다. 반응액 100 $\mu$ l 중에는 200ng DNA, 2.5 유닛 TaKaRa Ex 태그(TaKaRa 사), 10 $\mu$ l 10 $\times$ Ex 태그 버퍼, 8 $\mu$ l dNTP 혼합물(각 2.5mM) 및 200pmol 프라이머가 포함되어 있다. PCR의 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 30초간의 변성(denaturation), 55 $^{\circ}$ C에서 1분간의 어닐링(annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 12분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 35사이클 반응시켰다. 반응후 1% SeaKem GTG 아가로스(FMC 사)로 분획하였다. 증폭된 약 450bp의 DNA 단편을 겔로부터 회수하여, TA클로닝 kit(In Vitrogen)를 사용한 플라스미드 pCRII-TOPO에 서브클로닝하였다. 얻어진 클론의 염기서열을 310 DNA 시퀀서(sequencer; ABI 사)를 사용하여 결정하였다. 결정된 염기서열은 430bp로 이루어진 서열번호 1에 나타난 것이었다.

### 실시예 2

4종의 벼 품종(일본청, 코시히카리, 히토메보레 및 야마호우시)의 성엽(成葉)으로부터 DNA를 추출했다. 트랜스포존 DNA를 포함하는 영역(엑세션넘버 AP002843)을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, PCR 프라이머로서 서열번호 8과 서열번호 9의 DNA서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용하였다. 반응액 100 $\mu$ l 중에는 200ng DNA, 2.5 유닛 앰플리태그 골드(ABI 사), 10 $\mu$ l GeneAmp 10 $\times$ PCR 버퍼(15mM의 MgCl<sub>2</sub>를 포함), 10 $\mu$ l Gene Amp 혼합물(dNTP 각 2mM), 200pmol 프라이머가 포함되어 있다. PCR의 조건은 96 $^{\circ}$ C에서 30초간의 변성, 55 $^{\circ}$ C에서 1분간의 어닐링, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 35사이클 반응시켰다. 반응후 2% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획하였다. 도2에 상기 아가로스 겔전기영동을 나타내었다. 일본청에서만 약 850bp의 밴드가 얻어졌다. 약 850bp의 밴드는 실시예 1에서 나타난 서열번호 1의 트랜스포존 유전자(430bp)가 삽입되어 있는 단편이다. 한편, 코시히카리, 히토메보레 및 야마호우시에서는 약 420bp의 밴드가 얻어져, 트랜스포존 유전자가 삽입되어 있지 않은 단편이었다. 이와 같은 품종중에서 일본청에만 특이적인 것은, 이 유전자가 트랜스포존으로서의 기능을 갖고 있을 가능성을 시사하고 있다.



비교예 1

일본청의 종자를 3% 차아염소산나트륨 용액에서 15~30분간 살균, 멸균수로 세정하고, 9개의 종자를 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샤알레(iwaki 사) 내에 놓고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염(Basal Salt) 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로페녹시 초산(sigma 사), 0.3g 카사미노산(DIFCO), 0.1g 미오-이노시톨(sigma), 2.878g 프로린(WAKO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g의 젤라이트(WAKO)를 포함한 고체배지를 사용했다. 유도배양 10일째에 유도된 종자 유래 캘러스는 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샤알레(iwaki 사) 내에 이식하고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 증식배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로페녹시 초산(sigma 사), 0.3g 카사미노산(DIFCO), 0.1g 미오-이노시톨(sigma), 2.878g 프로린(WAKO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 개체배지를 사용했다.

증식배양 2주일째의 종자유래 캘러스로부터 DNA를 추출했다. 트랜스포존 DNA를 포함한 영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, 실시예 2와 동일하게 PCR 프라이머로서 서열번호 8과 서열번호 9의 DNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용했다. 반응액 100 $\mu$ l 중에는 200ng DNA, 2.5 유닛 앰플리태그 골드(ABI 사), 10 $\mu$ l GeneAmp 10×PCR 버퍼(15mM의 MgCl<sub>2</sub>를 포함), 10 $\mu$ l Gene Amp 혼합물(dNTP 각 2mM), 200pmol 프라이머가 포함되어 있다. PCR의 조건은 96℃에서 30초간의 변성, 55℃에서 1분간의 어닐링, 72℃에서 1분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 35사이클 반응시켰다. 반응후 2% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다. 도3에 상기 아가로스겔 전기영동을 나타내었다. 약 850bp의 1개의 밴드만이 얻어졌다. 약 850bp의 밴드는 트랜스포존 유전자가 삽입된 상태의 사이즈이다. 기대되었던 트랜스포존 유전자가 결실된 밴드의 사이즈인 약 420bp의 밴드는 얻어지지 않았다. 약 420bp의 밴드가 얻어지는 확률은 64캘러스 중에 0캘러스(0%)였다. 이것에 의하여, 종자(배반(胚盤)) 유래 캘러스에 있어서 트랜스포존 유전자는 작동하고 있지 않는 것이 확인되었다.

실시예 3

일본청의 출아 전의 이삭을 채취하여, 10℃의 온도에서, 10일간의 저온처리를 행한 후, 1% 차아염소산나트륨 용액에서 1분간의 살균, 멸균수로 세정하고, 날꽃으로부터 꽃밥을 적출하고, 50개의 꽃밥을 3ml의 액체배지가 들어있는 35×10mm의 샤알레(CORNING 사) 내에 뿌리고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로페녹시 초산(sigma 사), 30g 슈크로오스(WAKO)를 포함하는 액체배지를 사용했다. 유도배양 3~4주째에 유도된 꽃밥 유래의 캘러스는, 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샤알레(iwaki 사) 내에 이식하고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 증식배양했다. 1L의 배지중에, 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2ml의  $\alpha$ -나프탈렌 아세트산 용액(sigma 사), 2ml 키네틴 용액(sigma 사), 3g 카사미노산(DIFCO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다.

증식배양 2주째에 꽃밥 유래 캘러스로부터 DNA를 추출했다. 트랜스포존 DNA를 포함하는 영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, 실시예 2와 동일하게 PCR 프라이머로서 서열번호 8과 서열번호 9의 DNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용했다. 반응액 100 $\mu$ l 중에는 200ng DNA, 2.5 유닛 앰플리태그 골드(ABI 사), 10 $\mu$ l GeneAmp 10×PCR 버퍼(15mM의 MgCl<sub>2</sub>를 포함), 10 $\mu$ l Gene Amp 혼합물(dNTP 각 2mM), 200pmol 프라이머가 포함되어 있다. PCR의 조건은 96℃에서 30초간의 변성, 55℃에서 1분간의 어닐링, 72℃에서 1분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 35사이클 반응시켰다. 반응후 2% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다. 도4에 상기 아가로스겔 전기영동을 나타내었다. 도면중에, 약 850bp와 약 420bp의 2개의 밴드가 얻어졌다. 약 850bp의 밴드는 트랜스포존 유전자가 삽입된 상태의 사이즈이다. 한편, 약 420bp의 밴드는 트랜스포존 유전자가 결실된 것을 나타낸다. 약 420bp의 밴드가 얻어지는 확률은 64캘러스 중에 11캘러스(17.2%)였다.

또한, 본 실시예에 있어서 트랜스포존 유전자가 결실된 사이즈인 약 420bp의 밴드가 얻어진 꽃밥 유래 캘러스 중에서, 증폭된 약 420bp의 DNA 단편(N=5)을 겔로부터 회수하고, TA 클로닝 kit(In Vitrogen)를 사용한 플라스미드 pCRII-TOPO에 서브클로닝했다. 얻어진 클론에 대해서 염기서열을 310 DNA 시퀀서(ABI 사)를 사용하여 결정하였다. 이것들의 염기서열을 비교한 결과, 트랜스포존 유전자 서열은 보이지 않았다(그 결과는 여기에 나타내지 않는다.). 이것에 의하여, 트랜스포존 유전자의 결실이 염기서열로부터도 확인되었다.

비교예 1에 있어서는, 배반(종자) 유래의 배양세포에서는 트랜스포존 유전자의 가동성은 확인되지 않았던 것에 대하여, 본 실시예에 있어서는, 꽃밥 유래의 배양세포에 있어서 트랜스포존 유전자의 극히 고빈도의 가동성이 확인되었다.

#### 실시예 4

일본청의 출아 전의 이삭을 채취하여, 10℃의 온도에서, 10일간의 저온처리를 행한 후, 1% 차아염소산나트륨 용액에서 1분간의 살균, 멸균수로 세정하고, 낱꽃으로부터 꽃밥을 적출하고, 50개의 꽃밥을 3ml의 액체배지가 들어있는 35×10mm의 샤알레(CORNING 사) 내에 뿌리고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로페녹시 초산(sigma 사), 30g 슈크로오스(WAKO)를 포함하는 액체배지를 사용했다. 유도배양 3~4주째에 유도된 꽃밥 유래의 캘러스는, 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샤알레(iwaki 사) 내에 이식하고, 30℃의 온도, 24시간의 밝은 곳에서 증식배양했다. 1L의 배지중에, 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2ml의 α-나프탈렌 아세트산 용액(sigma 사), 2ml 키네틴 용액(sigma 사), 3g 카사미노산(DIFCO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다.

증식배양 2주째에 증식한 꽃밥 유래 캘러스는, 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샤알레(iwaki 사) 내에 이식하고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 재분화배양했다. 1L의 배지중에, 4.3g의 MS 바살 염 혼합물(Gibco) 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 10ml의 6-벤질아미노-퓨린 용액(sigma 사), 2ml α-나프탈렌 아세트산 용액(sigma 사), 2g 카사미노산(DIFCO), 30g 솔비톨(WAKO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다. 재분화배양 3~4주째에 재생되어온 식물체는 생육배지내에 이식되고, 성장한 후 흠에 심어졌다. 생육배지는, 1L의 배지중에, 4.3g의 MS 바살 염 혼합물(Gibco) 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다.

꽃밥 유래 캘러스로부터 재분화한 9개의 어린 싹으로부터 CTAB법에 의하여 DNA를 추출했다. 추출한 DNA를 제한효소 HindIII로 소화후, 0.8% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획하고, 알칼리 블롯팅법으로 나일론멤브레인(HybondN+) (Amersham 사)에 전사했다. 서던 하이브리드화는 DIG 발광검출kit(Roche 사)를 사용하여 행하였다. 트랜스포존 DNA의 내부영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, PCR 프라이머로서 서열번호 10 및 서열번호 11의 DNA 서열(모두 서열번호 1(트랜스포존 유전자) 중의 서열이다.)을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 프로브를 제작했다. 도5에 상기 아가로스겔 전기영동을 나타내었다. 도5에 나타난 바와 같이 No. 2 및 No. 6에 있어서 콘트롤의 일본청 품종에는 없는 새로운 위치에 밴드(화살표)가 나타났다. 이 밴드는 트랜스포존 유전자가 삽입되어 파괴된 유전자좌를 나타내고 있다.

본 실시예에 의해, 새로운 유전자좌에 트랜스포존 유전자가 삽입된 것이 명확하게 되었다. 또한, 본 실시예에서 재분화한 벼에는 도6에 나타난 것과 같은 형질이 변이한 것도 확인되어(유전자는 미확인), 이와 같은 형질에 관한 유전자가 이와 같은 트랜스포존에 의해 파괴되어 있는 것을 시사한다.

#### 실시예 5

일본청의 종자를 3% 차아염소산나트륨 용액에서 15~30분간의 살균, 멸균수로 세정하고, 9개의 종자를 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샤알레(iwaki 사) 내에 뿌리고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(sigma 사), 0.3g 카사미노산(DIFCO), 0.1g 미오-이노시톨(sigma), 2.878g 프로린(WAKO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다.

수일후, 벼 종자 내의 배반조직으로부터, 캘러스가 형성되기 시작하고, 10일째에는 5mm 정도의 크림색의 캘러스가 되었다. 이 5mm 정도의 크림색 캘러스를 5-아자시티딘(sigma 사)을 0mM, 0.01mM, 0.03mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.3mM의 농도로 포함하는 증식배지에 이식하고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 증식배양했다. 1L의 배지중에, 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(sigma 사), 0.3g 카사미노산(DIFCO), 0.1g 미오-이노시톨(sigma), 2.878g 프로린(WAKO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다.

증식배양 2주째의 종자유래 캘러스로부터 Dneasy plant mini kit(QIAGEN)에 의하여 DNA를 추출했다. 트랜스포존 DNA를 포함하는 영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, PCR 프라이머로서 서열번호 12 및 서열번호 13의 DNA 서열을 갖

는 올리고뉴클레오티드를 사용했다. PCR 반응액은 HotStarTaq Master Mix Kit(QIAGEN)를 사용했다. PCR의 조건은 96°C에서 30초간의 변성, 55°C에서 1분간의 어닐링, 72°C에서 1분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 45사이클 반응시켰다. 반응후 2% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다.

0.03mM~0.3mM의 5-아자시티딘 첨가구에 있어서, 약 730bp와 약 300bp의 2개의 밴드를 얻었다(도7), 약 730bp의 밴드는 트랜스포존 유전자가 삽입된 상태의 사이즈이다. 한편, 약 300bp의 밴드는 트랜스포존 유전자(430bp)가 결실된 밴드의 사이즈였다.

이러한 DNA 단편을 겔로부터 회수하여, TA 클로닝 키트(In Vitrogen)를 사용한 플라스미드 pCRII-TOPO에 서브클로닝했다. 얻어진 4종류의 클론에 대해서, 염기서열을 310 DNA 시퀀서(ABI 사)를 사용하여 결정했다. 4종류의 클론의 염기서열을 비교하였다(도8). 그 결과, 트랜스포존 유전자 서열은 전혀 보이지 않았다.

본 실시예에 의하여, 종자 유래 캘러스에 있어서도, 탈메틸화제인 5-아자시티딘을 사용하므로써, 본 트랜스포존의 전이를 유발할 수 있다는 것을 알았다. 이에 의하여, 1개의 종자로부터 본 트랜스포존이 전이한 수백의 클론 식물체를 얻을 수 있다고 기대된다.

## 실시예 6

벼 품종, 일본청의 출아 전의 이삭을 채취하여, 10°C의 온도에서, 10일간의 저온처리를 행한 후, 1%의 차아염소산나트륨 용액에서 1분간의 살균, 멸균수로 세정하고, 날꽃으로부터 꽃밥을 적출하고, 50개의 꽃밥을 3ml의 액체배지가 들어있는 35×10mm의 샬레(CORNING 사) 내에 뿌리고, 30°C의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(sigma 사), 30g 슈크로오스(WAKO)를 포함하는 액체배지를 사용했다. 유도배양 3~4주째에 유도된 꽃밥 유래의 캘러스는, 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샬레(CORNING 사) 내에 이식하고, 30°C의 온도, 24시간 밝은 곳에서 증식배양했다. 1L의 배지중에, 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2ml의 α-나프탈렌 아세트산 용액(sigma 사), 2ml 키네틴 용액(sigma 사), 3g 카사미노산(DIFCO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다. 증식배양 2주째에 꽃밥 유래 캘러스로부터 DNA를 추출했다(Kikuchi et al. (1998) Plant Biotechnology 15:45~48). 트랜스포존 DNA를 함유하는 영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, PCR 프라이머로 서열번호 14(AP004236의 88933~88962) 및 서열번호 15(AP004236의 95545~95574)의 DNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용했다. 반응액 100μl 중에는 200ng DNA, 2.5 유닛 TaKaRa LA Taq(TaKaRa 사), 10μl 10×LA PCR 버퍼II, 6μl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 8μl dNTP 혼합물(dNTP 각 2.5mM), 100pmol 프라이머가 포함되어 있다. PCR의 조건은 96°C에서 30초간의 변성, 68°C에서 12분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 35사이클 반응시켰다. 반응후 0.8% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다. 약 6.6kbp의 밴드는 본발명의 트랜스포존 유전자(5341bp)가 삽입된 상태의 사이즈이다. 본 발명의 트랜스포존 유전자는 약 5.4kbp이기 때문에, 이 트랜스포존 유전자가 결실된다면 약 1.2kbp의 밴드가 반드시 나타난다. 본 실시예에서는 약 1.2kbp의 밴드가 얻어졌다(도 13). 이에 따라 꽃밥 유래 캘러스에 있어서는 동작하고 있다는 것이 명확하게 되었다. 약 1.2kb의 밴드를 얻을 확률은 64캘러스중 3캘러스(4.7%)였다. 본 실시예는, 꽃밥 유래 캘러스에서 서열번호 2로 표시되는 DNA서열로 이루어지는 벼의 MITE가 움직인다는 것을 증명한다.

## 비교예 2

벼 품종, 일본청의 종자를 3% 차아염소산나트륨 용액에서 15~30분간의 살균, 멸균수로 세정하고, 9개의 종자를 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샬레(iwaki 사) 내에 뿌리고, 30°C의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(sigma 사), 0.3g 카사미노산(DIFCO), 0.1g 미오-이노시톨(sigma), 2.878g 프로린(WAKO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다. 유도배양 10일째에 유도된 종자 유래 캘러스는 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샬레(iwaki 사) 내에 이식하고, 30°C의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(sigma 사), 0.3g 카사미노산(DIFCO), 0.1g 미오-이노시톨(sigma), 2.878g 프로린(WAKO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다. 증식배양 2주째에 종자 유래 캘러스로부터 DNA를 추출했다(Kikuchi et al. (1998) Plant Biotechnology 15:45~48). 트랜스포존 DNA를 함유하는 영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, PCR 프라이머로 서열번호 14 및 서열번호 15의 DNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용했다. 반응액 100μl 중에는 200ng DNA, 2.5 유닛 TaKaRa LA Taq(TaKaRa 사), 10μl 10×LA PCR 버퍼II, 6μl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 8μl dNTP 혼합물(dNTP 각 2.5mM), 100pmol 프라이머가 포함되어 있다. PCR의 조건은 94°C에서 30초간의 변성, 68°C에서 12분간의 신장반응을 1

사이클로 하여, 35사이클 반응시켰다. 반응후 0.8% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다. 그 결과 약 6.6kbp의 1개의 밴드만이 얻어졌고, 약 1.2kbp의 밴드는 얻어지지 않았다(도 13). 이에 따라, 종자 유래 캘러스에 있어서는 작동하고 있지 않다는 것이 명확해졌다. 약 1.2kb의 밴드를 얻을 확률은 64캘러스중 0캘러스(0%)였다.

**실시에 7**

본 실시예에서는, 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 갖고 있지 않은 품종을 찾아, 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)의 유무에 따른 비자립적 트랜스포존 유전자의 전이의 차이를 명확하게 하기 위하여, 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 갖고 있지 않은 품종의 꽃밥 유래 캘러스를 유도하고, 비자립적 트랜스포존 유전자의 전이를 조사하였다.

며 품종, 일본청, 코시히카리, 대중 65호 및 카사라스의 4품종을 사용하여, 각각의 품종의 잎으로부터, CTAB법에 의하여 DNA를 추출했다. 추출한 DNA를 제한효소 HindIII로 소화후, 1.0% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획하고, 알칼리 블롯팅법으로 나일론멤브레인(HybondN+)(Amersham 사)에 전사했다. 서던 하이브리드화는 DIG 발광검출키트(Roche 사)를 사용하여 행하였다. 프로브 제작에는 PCR DIG 프로브 합성 키트(Roche 사)를 사용하였다. 자립적 트랜스포존 유전자에 특이적인 내부영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, PCR 프라이머로서 서열번호 16과 서열번호 17의 DNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 프로브를 제작하였다. 서던 하이브리드화 결과, 일본청 및 코시히카리에는 각각 자립적 트랜스포존 유전자가 1카피 계층중에 존재하지만, 대중 65호 및 카사라스에는 존재하지 않는 것을 알았다(도 14).

다음으로, 대중 65호의 꽃밥 유래 캘러스를 유도하여, 비자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 1)의 전이를 조사하였다.

며 품종, 대중 65호의 출아 전의 이삭을 채취하여, 10℃의 온도에서, 10일간의 저온처리를 행한 후, 1% 차아염소산나트륨 용액에서 1분간의 살균, 멸균수로 세정하고, 날꽃으로부터 꽃밥을 적출하고, 50개의 꽃밥을 3ml의 액체배지가 들어있는 35×10mm의 샤알레(CORNING 사) 내에 뿌리고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(sigma 사), 30g 슈크로오스(WAKO)를 포함하는 액체배지를 사용했다. 유도배양 3~4주째에 유도된 꽃밥 유래의 캘러스는, 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샤알레(iwaki 사) 내에 이식하고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 증식배양했다. 1L의 배지중에, 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2ml의 α-나프탈렌 아세트산 용액(sigma 사), 2ml 키네틴 용액(sigma 사), 3g 카사미노산(DIFCO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다. 각각 증식배양 2주째에 꽃밥 유래 캘러스로부터 상기 문헌(Kikuchi et al. (1998) Plant Biotechnology 15:45~48)에 기재된 방법에 따라, DNA를 추출했다. 트랜스포존 DNA를 포함하는 영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, PCR 프라이머로서 서열번호 18과 서열번호 19(LO2), 서열번호 20과 서열번호 21(LO6), 서열번호 22와 서열번호 23(LO7)의 DNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용했다. 반응액 100μl 중에는 200ng DNA, 2.5 유닛 앰플리태그 골드(ABI 사), 10μl GeneAmp 10×PCR 버퍼(15mM의 MgCl<sub>2</sub>를 포함), 10μl Gene Amp 혼합물(dNTP 각 2mM), 200pmol 프라이머가 포함되어 있다. PCR의 조건은 96℃에서 30초간의 변성, 55℃에서 1분간의 어닐링, 72℃에서 1분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 35사이클 반응시켰다. 반응후 2% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다. 그 결과 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 1)를 갖지 않는 대중 65호에서는 LO2, LO6 및 LO7 유전자좌에 존재하는 비자립적 트랜스포존 유전자의 전이가 일어나지 않았다(표 2 상단). 그러나, 하기 비교예 3에 나타낸 바와 같이, 꽃밥 유래 캘러스에 있어서 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 갖는 일본청에서는 10.9~31.3%의 고빈도로 비자립적 트랜스포존 유전자가 전이했다.

[표 2]

	L2	L6	L7
꽃밥 유래 캘러스	0/64	0/64	0/64
유전자 도입한 꽃밥 유래 캘러스	2/38	1/38	0/38
	5.3%	2.6%	0%

**비교예 3**

일본청의 출아 전의 이삭을 채취하여, 10℃의 온도에서, 10일간의 저온처리를 행한 후, 1% 차아염소산나트륨 용액에서 1분간의 살균, 멸균수로 세정하고, 날꽃으로부터 꽃밥을 적출하고, 50개의 꽃밥을 3ml의 액체배지가 들어있는 35×10mm의 샤알레(CORNING 사) 내에 뿌리고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(sigma 사), 30g 슈크로오스(WAKO)를 포함하는 액체배지를 사용했다. 유도배양 3~4주째에 유도된 꽃밥 유래의 캘러스는, 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샤알레(iwaki 사) 내에 이식하고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 증식배양했다. 1L의 배지중에, 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2ml의 α-나프탈렌 아세트산 용액(sigma 사), 2ml 키네틴 용액(sigma 사), 3g 카사미노산(DIFCO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다.

증식배양 2주째에 꽃밥 유래 캘러스로부터 DNA를 추출했다. 트랜스포존 DNA를 포함하는 영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, 실시예 7과 같이 PCR 프라이머로서 서열번호 5 및 서열번호 1의 DNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용했다. 반응액 100μl 중에는 200ng DNA, 2.5 유닛 앰플리태그 골드(ABI 사), 10μl GeneAmp 10×PCR 버퍼(15mM의 MgCl<sub>2</sub>를 포함), 10μl Gene Amp 혼합물(dNTP 각 2mM), 200pmol 프라이머가 포함되어 있다. PCR의 조건은 96℃에서 30초간의 변성, 55℃에서 1분간의 어닐링, 72℃에서 1분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 35사이클 반응시켰다. 반응 후 2% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다. 그 결과 약 850bp와 420bp의 2개의 밴드가 얻어졌다. 약 850bp의 밴드는 트랜스포존 유전자가 삽입된 상태의 사이즈이다. 한편, 약 420bp의 밴드는 트랜스포존 유전자가 결실된 것을 나타낸다. 약 420bp의 밴드를 얻을 확률은 64캘러스중 11캘러스(17.2%)였다.

### 실시예 8

본 실시예에서는, 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 포함하는 게놈 영역을 단리하여, 이것을 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 갖지 않는 품종(대중 65호)에 도입하여, 비자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 1)의 전이를 조사했다.

벼 품종, 일본청으로부터 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 포함하는 게놈 영역을 단리하기 위하여, 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 사이에 두도록 서열번호 24 및 서열번호 25의 DNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 설계하여, PCR의 프라이머로 사용하였다. 일본청의 잎으로부터, CTAB법에 의하여 추출한 DNA를 이용하였다. 반응액 100μl 중에는 200ng DNA, 2.5 유닛 TaKaRa LA Taq(TaKaRa 사), 10μl 10×LA PCR 버퍼II, 6μl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 8μl dNTP 혼합물(dNTP 각 2.5mM), 100pmol 프라이머가 포함되어 있다. PCR의 조건은 94℃에서 30초간의 변성, 68℃에서 12분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 35사이클 반응시켰다. 반응 후 0.8% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다. 자립적 트랜스포존 유전자가 삽입되어 있는 약 6.6kbp의 밴드를 얻었다.

상기 DNA 단편(약 6.6kbp)을 겔로부터 회수하여, TA 클로닝 키트(In Vitrogen)를 사용한 플라스미드 pCRII-TOPO에 서브클로닝했다. 다음으로 pCRII-TOPO에 존재하는 멀티클로닝 사이트(ApaI과 KpnI)를 이용하여, 선발 마커로서 하이그로마이신(hygromycin) 내성유전자를 갖는 식물감염용 바이너리 벡터(binary vector)에 서브클로닝해서, 전기천공법(electroporation)에 의하여 아그로박테리아 EHA101에 도입했다. 감염에 사용하기 3일전에 카나마이신(Wako)과 하이그로마이신(Wako)을 포함하는 AB배지에 스트리크(streak)하여, 꽃밥 유래 캘러스로의 감염에 사용했다.

다음에, 아그로박테리아를 매개하여, 벼 품종, 대중 65호의 꽃밥 유래의 캘러스에 상기에서 얻은 자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 2)를 포함하는 게놈 영역(약 6.6kbp)을 도입했다.

벼 품종, 대중 65호의 출아 전의 이삭을 채취하여, 10℃의 온도에서, 10일간의 저온처리를 행한 후, 1% 차아염소산나트륨 용액에서 1분간의 살균, 멸균수로 세정하고, 날꽃으로부터 꽃밥을 적출하고, 50개의 꽃밥을 3ml의 액체배지가 들어있는 35×10mm의 샤알레(CORNING 사) 내에 뿌리고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(sigma 사), 30g 슈크로오스(WAKO)를 포함하는 액체배지를 사용했다. 유도배양 3~4주째에 유도된 꽃밥 유래의 캘러스는, 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샤알레(iwaki 사) 내에 이식하고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 증식배양했다. 1L의 배지중에, 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2ml의 α-나프탈렌 아세트산 용액(sigma 사), 2ml 키네틴 용액(sigma 사), 3g 카사미노산(DIFCO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다.

증식배양 2주째인 대증 65호의 꽃밥 유래 캘러스에 아그로박테리아를 감염시켰다. AB배지에 도포후 3일된 아그로박테리아를 손가락으로 취하여, 10mg/l의 아세토시린곤(acetosyringone)을 첨가한 AAM배지(25ml)에 넣어 잘 흔들어, 혼합된 감염용 액을 샤알레(IWAKI)에 넣었다. 증식배양 2주째에 꽃밥 유래 캘러스를 금망(金網)에 넣고, 2분간 감염용 액에 담갔다. 금망을 멸균시킨 종이 타월상에 놓고, 여분의 수분을 제거한 후, 핀셋으로 여과지를 간 공존배지에 캘러스를 놓고, 외과용 테이프를 실링하여 28℃ 암흑하에서 3일간 배양하였다. 공존배지는 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 30g 슈크로오스(WAKO), 10g의 글루코오스(WAKO), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(Sigma 사), 2g 젤라이트(WAKO), 10mg 아세토시린곤을 포함하는 고체배지를 사용했다. 공존배양 3일된 캘러스를 100ml 멸균수가 들어있는 삼각플라스크에 넣고서 잘 흔들어준 다음, 물만 제거했다. 멸균수로의 세정을 수회 반복한 후, 500mg/ml의 카르베니실린을 넣은 세정액으로 씻은 후, 선택배지에 캘러스를 샤알레 1개에 9개 이식하고, 외과용 테이프를 실링하여 25℃ 밝은 곳에서 한달간 배양했다. 선택배지는 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 30g 슈크로오스(WAKO), 0.3g 카사미노산(DIFCO), 2.878g 프로린(ICN), 0.1g 미오-이노시톨(Sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(Sigma 사), 500mg 하이그로마이신(Wako), 50mg 카르베니실린(Wako), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용하였다.

다음으로, 선택배지에 심은 후 3~4주 후에, 증식된 하이그로마이신 내성 캘러스에 있어서, 일본청의 자립적 트랜스포존 유전자의 도입과 비자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 1)의 전이를 조사하였다.

내성 캘러스로부터 상기 문헌(Kikuchi et al. (1998) Plant Biotechnology 15:45~48)에 기재된 방법에 따라, DNA를 추출했다. 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 사이에 두도록 설계한 서열번호 24 및 서열번호 25의 DNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 PCR의 프라이머로 사용하여 PCR 반응을 행했다. 반응액 100μl 중에는 200ng DNA, 2.5 유닛 TaKaRa LA Taq(TaKaRa 사), 10μl 10×LA PCR 버퍼II, 6μl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 8μl dNTP 혼합물(dNTP 각 2.5mM), 100pmol 프라이머가 포함되어 있다. PCR의 조건은 94℃에서 30초간의 변성, 68℃에서 12분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 35사이클 반응시켰다. 반응후, 0.8% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다. 그 결과, 내성 캘러스에 있어서, 일본청의 자립적 트랜스포존 유전자의 도입을 확인할 수 있었다(도 15).

다음으로, 비자립적 트랜스포존 유전자를 포함하는 영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, PCR 프라이머로서 서열번호 18과 서열번호 19(LO2), 서열번호 20과 서열번호 21(LO6), 서열번호 22와 서열번호 23(LO7)의 DNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용했다. PCR 반응액은, HotStarTaq Master Mix Kit(QIAGEN)를 사용하였다. PCR의 조건은 96℃에서 30초간의 변성, 55℃에서 1분간의 어닐링, 72℃에서 2분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 45사이클 반응시켰다. 반응후, 2% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다. 그 결과, 38개의 자립적 트랜스포존 유전자가 도입된 캘러스에 있어서 비자립적 트랜스포존 유전자의 결실을 조사한 바, LO6 유전자좌에 있어서 결실했다고 생각되어지는 사이즈의 밴드를 얻었다(도 16). LO2, LO6 및 LO7 유전자좌에 존재하는 비자립적 트랜스포존 유전자의 결실빈도는 0~5.3%정도였다(표2 하단).

LO2 및 LO6 유전자좌에 존재하는 비자립적 트랜스포존 유전자가 결실되었다고 생각되어지는 사이즈의 밴드의 DNA 단편을 겔로부터 회수하여, TA 클로닝 키트(In Vitrogen)를 사용한 플라스미드 pCRII-TOPO에 서브클로닝했다. 얻어진 클론에 대하여, 염기서열을 310 DNA 시퀀서(ABI 사)를 사용하여 결정하였다. 비자립적 트랜스포존 유전자서열은 보이지 않았다(도 17, 도 18).

이 결과는, 일본청의 자립적 트랜스포존 유전자를 도입하므로써 대증 65호의 꽃밥 유래 캘러스에 있어서 비자립적 트랜스포존 유전자의 전이를 유발한 것을 나타내고 있다. 이에 따라, 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어지는 트랜스포존은, 꽃밥 유래 캘러스에 있어서 자립적으로 전이함과 함께, 비자립적 트랜스포존 유전자의 전이를 제어한다고 결론지을 수 있다.

### 실시예 9

본 실시예에서는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열의 전이활성을 꽃밥 유래 캘러스와 5-아자시티딘 처리한 배반 유래 캘러스에 관하여 조사하였다.

벼 품종, 일본청의 출아 전의 이삭을 채취하여, 10℃의 온도에서, 10일간의 저온처리를 행한 후, 1% 차아염소산나트륨 용액에서 1분간의 살균, 멸균수로 세정하고, 낱꽃으로부터 꽃밥을 적출하고, 50개의 꽃밥을 3ml의 액체배지가 들어있는 35×10mm의 샤알레(CORNING 사) 내에 뿌리고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의

CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로페녹시 초산(sigma 사), 30g 슈크로오스(WAKO)를 포함하는 액체배지를 사용했다. 유도배양 3~4주째에 유도된 꽃밥 유래의 캘러스는, 20~30ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샤알레(iwaki 사) 내에 이식하고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 증식배양했다. 1L의 배지중에, 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2ml의 α-나프탈렌 아세트산 용액(sigma 사), 2ml 키네틴 용액(sigma 사), 3g 카사미노산(DIFCO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다. 각각 증식배양 2주째에 꽃밥 유래 캘러스로부터, 상기 문헌(Kikuchi et al. (1998) Plant Biotechnology 15:45~48)에 기재된 방법에 따라, DNA를 추출했다.

벼 품종, 일본청의 종자를 3% 차아염소산나트륨 용액에서 15~30분간의 살균, 멸균수로 세정하고, 9개의 종자를 20~30 ml 배지가 들어있는 90×20mm의 샤알레(iwaki 사) 내에 뿌리고, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 유도배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(sigma 사), 0.3g 카사미노산(DIFCO), 0.1g 미오-이노시톨(sigma), 2.878g 프로린(WAKO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다. 유도배양 10일째에 유도된 종자 유래 캘러스는 5-아자시티딘(sigma)을 0mM, 0.1mM, 0.5mM의 농도로 포함하는 증식배지에 이식하여, 30℃의 온도, 24시간 밝은 곳에서 증식배양했다. 1L의 배지중에 4g의 CHU(N6) 바살 염 혼합물(sigma 사), 1ml MS 비타민 용액(sigma 사), 2mg/l 2,4-디클로로-페녹시 초산(sigma 사), 0.3g 카사미노산(DIFCO), 0.1g 미오-이노시톨(sigma), 2.878g 프로린(WAKO), 30g 슈크로오스(WAKO), 2g 젤라이트(WAKO)를 포함하는 고체배지를 사용했다. 증식배양 2주째에 종자 유래 캘러스로부터, Dneasy plant mini kit(QIAGEN)로 DNA를 추출했다.

트랜스포존 DNA를 포함하는 영역을 PCR법에 의하여 증폭하기 위하여, PCR 프라이머로서 서열번호 26 및 서열번호 27의 DNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용했다. 반응액 100μl 중에는 200ng DNA, 2.5 유닛 TaKaRa LA Taq (TaKaRa 사), 10μl 10×LA PCR 버퍼II, 6μl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 8μl dNTP 혼합물(dNTP 각 2.5mM), 100pmol 프라이머가 포함되어 있다. PCR의 조건은 94℃에서 30초간의 변성, 68℃에서 12분간의 신장반응을 1사이클로 하여, 35사이클 반응시켰다. 반응후 0.8% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다.

그 결과, 꽃밥 유래 캘러스 및 배반 유래 캘러스에서는, 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 갖는 트랜스포존은 전이하지 않지만, 5-아자시티딘으로 처리했던 배반 유래 캘러스에서 고빈도로 전이가 일어났다(표 3).

[표 3]

	결실빈도	
꽃밥 유래 캘러스(일본청)	0/64	(0%)
배반 유래 캘러스(일본청)	0/64	(0%)
0mM 5-아자시티딘	0/8	(0%)
0.1mM 5-아자시티딘	2/8	(25%)
0.5mM 5-아자시티딘	7/8	(87.5%)

서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 갖는 트랜스포존은, 구조상, 트랜스포사아제를 코딩하는 자립적 트랜스포존 유전자이고, 5-아자시티딘의 처리에 의하여 활성화하며, 비자립적 트랜스포존 유전자(서열번호 1)의 전이를 제어하고 있다고 생각된다.

#### 실시에 10

벼 품종, 카사라스의 성엽으로부터, Dneasy plant mini kit(QIAGEN)로 DNA를 추출했다. 삽입되어 있는 트랜스포존 DNA의 인접영역을 PCR에 의해 증폭하기 위하여 inversePCR법을 사용하였다. inverse용의 PCR 프라이머로는 서열번호 1의 5' 말단으로부터 15염기의 염기서열의 올리고뉴클레오티드(5'-CCATTGTGACTGGCC-3')를 사용하였다. PCR에는, GeneAmp 9600 시스템(ABI 사)을 사용하여 행하였다. PCR 반응액은, HotStarTaq Master Mix kit(QIAGEN)를 사용하였다. PCR의 조건은 96℃에서 30초간의 변성, 44~58℃에서 1분간의 어닐링, 72℃에서 1분간의 신장반응을 1사이클로

하여, 45사이클 반응시켰다. 반응후, 2% LO3 아가로스(TaKaRa 사)로 분획했다. 증폭된 DNA 단편을 TA 클로닝 키트(In Vitrogen)를 사용한 플라스미드 pCRII-TOPO에 서브클로닝했다. 얻어진 클론의 염기서열을 310 DNA 시퀀서(ABI 사)를 사용하여 결정하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 벼의 트랜스포존 유전자.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 인핸서 또는 프로모터가 그 내부에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 벼의 트랜스포존 유전자.

청구항 3.

서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어지는 벼의 트랜스포존 유전자.

청구항 4.

삭제

청구항 5.

서열번호 4 또는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 코딩하는 트랜스포사아제 유전자.

청구항 6.

서열번호 4 또는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질로 이루어지는 트랜스포사아제.

청구항 7.

제 1항 내지 제 3항중 어느 한 항에 기재된 트랜스포존 유전자를 포함하는 플라스미드.

청구항 8.

프로모터 및 제 5항에 기재된 트랜스포사아제 유전자를 포함하는 플라스미드.

청구항 9.

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 기재된 트랜스포존 유전자가 도입된 벼 세포.

청구항 10.

삭제



**청구항 11.**

삭제

**청구항 12.**

프로모터 및 제 5항에 기재된 트랜스포사아제 유전자가 도입된 벼 세포.

**청구항 13.**

삭제

**청구항 14.**

삭제

**청구항 15.**

제 9항에 기재된 벼 세포를 꽃밥 배양 또는 약제로 처리하는 것을 포함하는, 제 1항에 기재된 트랜스포존 유전자를 전이시키는 방법.

**청구항 16.**

제 12항에 기재된 벼 세포를 꽃밥 배양 또는 약제로 처리하는 것에 의하여 제 1항에 기재된 트랜스포존 유전자를 전이시키는 방법.

**청구항 17.**

제 15항에 있어서, 상기 약제가 5-아자시티딘 또는 5-아자데옥시시티딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18.**

제 16항에 있어서, 상기 약제가 5-아자시티딘 또는 5-아자데옥시시티딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19.**

벼를 꽃밥 배양, 또는 벼의 종자, 잎, 뿌리, 줄기 또는 액아, 또는 그것에 유래하는 캘러스를 포함하는 산물을 5-아자시티딘 또는 5-아자데옥시시티딘으로 처리하는 것을 포함하는, 제 1항에 기재된 트랜스포존 유전자를 전이시키는 방법.

**청구항 20.**

제 15항에 기재된 방법에 의하여 전이된 트랜스포존 유전자를 포함하는, 형질전환된 벼 세포.

**청구항 21.**

제 16항에 기재된 방법에 의하여 전이된 트랜스포존 유전자를 포함하는, 형질전환된 벼 세포.

**청구항 22.**

제 17항에 기재된 방법에 의하여 전이된 트랜스포존 유전자를 포함하는, 형질전환된 벼 세포.

**청구항 23.**

제 18항에 기재된 방법에 의하여 전이된 트랜스포존 유전자를 포함하는, 형질전환된 벼 세포.

**청구항 24.**

제 19항에 기재된 방법에 의하여 전이된 트랜스포존 유전자를 포함하는, 형질전환된 벼 세포.

**청구항 25.**

삭제

**청구항 26.**

삭제

**청구항 27.**

삭제

**청구항 28.**

제 15항에 기재된 방법에 의하여 제 1항에 기재된 트랜스포존 유전자를 전이시키는 단계, 상기 단계에서 얻어진 식물로부터 DNA를 추출하는 단계, 상기 DNA를 트랜스포존 유전자 내에 절단부위를 갖지 않는 제한효소로 소화하는 단계, 상기 단계에서 얻어진 DNA 단편을 리게이션하는 단계, 상기 단계에서 얻은 DNA 단편을 PCR하는 단계, 얻어진 PCR 산물의 염기서열을 결정하는 단계를 포함하는 방법으로서, 상기 PCR을 행하기 위하여 사용하는 프라이머로서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 5'말단으로부터 적어도 10염기의 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 3' 말단으로부터 적어도 10염기의 올리고뉴클레오티드 또는 이것들에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 사용하는 트랜스포존 유전자의 삽입영역을 특정하는 방법.

**청구항 29.**

제 16항에 기재된 방법에 의하여 제 1항에 기재된 트랜스포존 유전자를 전이시키는 단계, 상기 단계에서 얻어진 식물로부터 DNA를 추출하는 단계, 상기 DNA를 트랜스포존 유전자 내에 절단부위를 갖지 않는 제한효소로 소화하는 단계, 상기 단계에서 얻어진 DNA 단편을 리게이션하는 단계, 상기 단계에서 얻은 DNA 단편을 PCR하는 단계, 얻어진 PCR 산물의 염기서열을 결정하는 단계를 포함하는 방법으로서, 상기 PCR을 행하기 위하여 사용하는 프라이머로서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 5'말단으로부터 적어도 10염기의 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 3' 말단으로부터 적어도 10염기의 올리고뉴클레오티드 또는 이것들에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 사용하는 트랜스포존 유전자의 삽입영역을 특정하는 방법.

**청구항 30.**

제 19항에 기재된 방법에 의하여 제 1항에 기재된 트랜스포존 유전자를 전이시키는 단계, 상기 단계에서 얻어진 식물로부터 DNA를 추출하는 단계, 상기 DNA를 트랜스포존 유전자 내에 절단부위를 갖지 않는 제한효소로 소화하는 단계, 상기 단

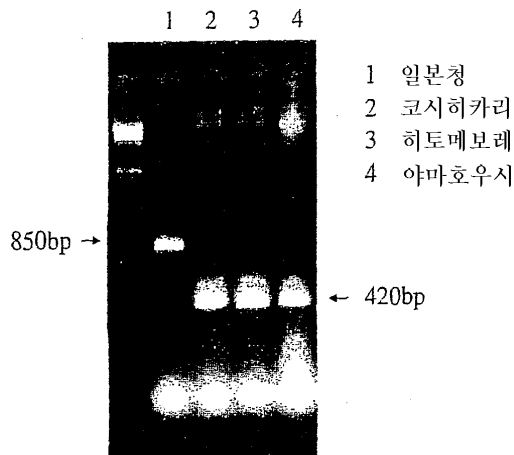
계에서 얻어진 DNA 단편을 리게이션하는 단계, 상기 단계에서 얻은 DNA 단편을 PCR하는 단계, 얻어진 PCR 산물의 염기 서열을 결정하는 단계를 포함하는 방법으로서, 상기 PCR을 행하기 위하여 사용하는 프라이머로서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 5'말단으로부터 적어도 10염기의 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 3' 말단으로부터 적어도 10염기의 올리고뉴클레오티드 또는 이것들에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 사용하는 트랜스포존 유전자의 삽입영역을 특정하는 방법.

도면

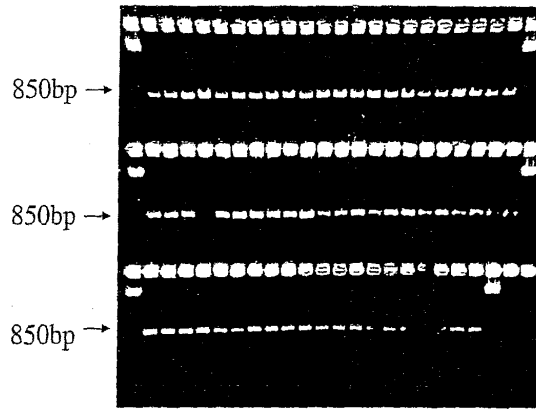
도면1

144010	144020	144030	144040	144050	144060	
TTTCAAGTAC	AATCTCAACT	TAGGAAAAGT	TGTGATTGAG	GGAGGATGTT	AGATAATGTT	
144070	144080	144090	144100	144110	144120	
AGTTAGTTTG	TTATAGAGAT	AGATTAGTTC	TGTTACCGCA	TGTACTTTCT	TGTATCTATC	
144130	144140	144150	144160	144170	144180	
TCTATATCCA	GGATTGTCTC	AGGTGTGTGA	GATTAATCCT	ATCCTTTGTA	CACGCCACGG	3'LTR
144190	144200	144210	144220	144230	144240	
TAGAGGCTCT	TTCTGCCTAT	ATCAACAAAG	GTGCGGCCCC	GTAAGGGGT	TCAACGCTTC	
144250	144260	144270	144280	144290	144300	
TCATTCGGTT	TTACAATCCT	CCTTCTTCT	CCTGGTGTG	GAAATTCGTT	GATCGAGTTG	
144310	144320	144330	144340	144350	144360	
AAACTCTCAT	CCTTCATCAT	GTGCTGCAGA	AACTAACGCG	TGCACAGATG	ATGGATGGGT	
144370	144380	144390	144400	144410	144420	
GTGGTGTGAC	ATGAAAGTGG	ATCAATGACA	CGCGGCACAT	TTAGGGGAGT	GTGTCGTGTC	
144430	144440	144450	144460	144470	144480	
TTGACTTCTT	CATGCAAAAG	TATACCAACC	CTGTATAAGG	CCAGTCACAA	TGGCTAGTGT	
144490	144500	144510	144520	144530	144540	
CATTGCACGG	CTACCCAAA	TATTATACCA	TCTTCTCTCA	AATGAAATCT	TTTATGAAAC	
144550	144560	144570	144580	144590	144600	
AATCCCCACA	GTGAGGGGT	TTCACTTTGA	CGTTTCCAAG	ACTAAGCAA	GCATTTAATT	
144610	144620	144630	144640	144650	144660	
GATACAAGTT	GCTGGGATCA	TTTGTACCCA	AAATCCGGCG	CGGCGCGGGA	GAATGCGGAG	역방향
144670	144680	144690	144700	144710	144720	반복서열
GTGCGACGGC	GGAGGCGGAC	GCAAGAGATC	CGGTGAATGA	AACGAATCGG	CCTCAACGGG	
144730	144740	144750	144760	144770	144780	
GGTTTCACTC	TGTTACCGAG	GACTTGGAAA	CGACGCTGAC	GAGTTTCACC	AGGATGAAAC	
144790	144800	144810	144820	144830	144840	
TCTTTCCTTC	TCTCTCATCC	CCATTTCAATG	CAAATAATCA	TTTTTTATTC	AGTCTTACCC	
144850	144860	144870	144880	144890	144900	
CTATTAAATG	TGCATGACAC	ACCAGTGAAA	CCCCCATTTG	GACTGGCCTA	AGCATCTTTG	

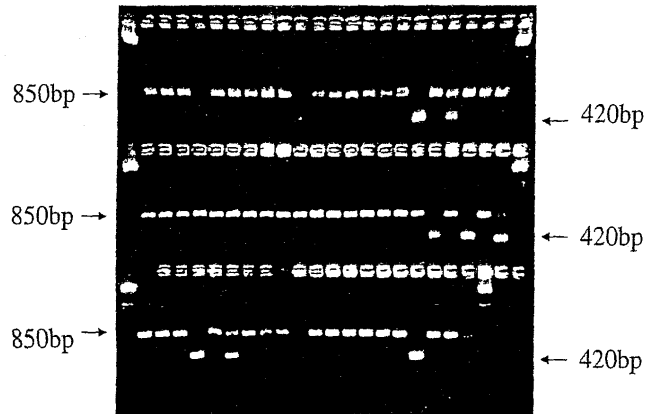
도면2



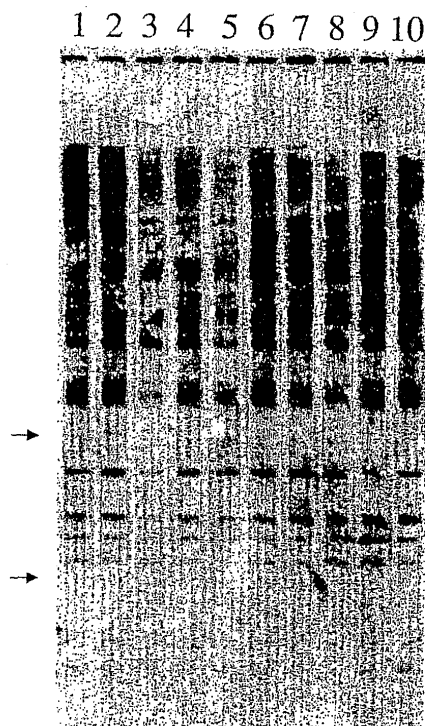
도면3



도면4



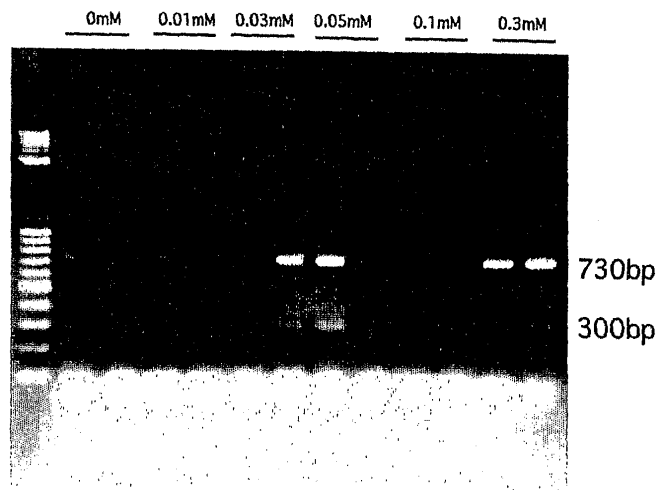
도면5



도면6



도면7

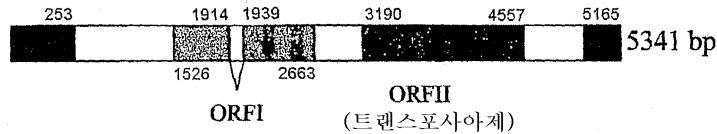


도면8

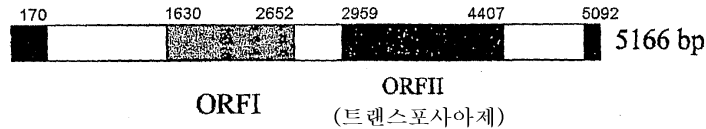
L05	ATGTAGTTTG	TCGSTAAGTT	TGATTATCAC	GGTAACCACA	AGTCAAGGGA
AzaC-callus1	ATGTAGTTTG	TCGSTAAGTT	TGATTATCAC	GGTAACCACA	AGTCAAGGGA
AzaC-callus2	ATGTAGTTTG	TCGSTAAGTT	TGATTATCAC	GGTAACCACA	AGTCAAGGGA
AzaC-callus3	ATGTAGTTTG	TCGSTAAGTT	TGATTATCAC	GGTAACCACA	AGTCAAGGGA
AzaC-callus4	ATGTAGTTTG	TCGSTAAGTT	TGATTATCAC	GGTAAC----	-----
L05	AAGATATGGA	CTCCTTAATA	AGGCCAGTCA	CAATGGGGGT	TTCACTGGTG
AzaC-callus1	AAGATATGGA	CTCCTTAA--	-----	-----	-----
AzaC-callus2	AAGATATGGA	CTCCTTAATA	A-----	-----	-----
AzaC-callus3	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus4	-----	-----	-----	-----	-----
L05	TGTCATGCAC	ATTTAATAGG	GGTAAGACTG	AATAAAAAAT	GATTATTTGC
AzaC-callus1	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus2	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus3	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus4	-----	-----	-----	-----	-----
L05	ATGAAATGGG	GATGAGAGAG	AAGGAARGAG	TTTCATCCTG	GTGAAACTCG
AzaC-callus1	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus2	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus3	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus4	-----	-----	-----	-----	-----
L05	TCAGCGTCGT	TTCCAAGTCC	TCGGTAACAG	AGTGAAACCC	CCGTTGAGGC
AzaC-callus1	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus2	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus3	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus4	-----	-----	-----	-----	-----
L05	CGATTCCGTT	CATTACCGG	ATCTCTTGG	TCCGCCTCCG	CCGTGCGACC
AzaC-callus1	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus2	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus3	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus4	-----	-----	-----	-----	-----
L05	TCCGCATTCT	CCCGCGCCGC	GCCGGATTTT	GGGTACAAAT	GATCCCAGCA
AzaC-callus1	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus2	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus3	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus4	-----	-----	-----	-----	-----
L05	ACTTGATCA	ATTAATGCT	TTGCTTAGTC	TTGGAAACGT	CAAAGTGAAA
AzaC-callus1	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus2	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus3	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus4	-----	-----	-----	-----	-----
L05	CCCTCCACT	GTGGGGATTG	TTTCATAAAA	GATTTCAATT	GAGAGAAGAT
AzaC-callus1	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus2	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus3	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus4	-----	-----	-----	-----	-----
L05	GGTATAATAT	TTGGGTAGC	CGTGCAATGA	CACTAGCCAT	TGTGACTGGC
AzaC-callus1	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus2	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus3	-----	-----	-----	-----	-----
AzaC-callus4	-----	-----	-----	-----	-----
L05	CTAACACTGA	ACTGATCAA	GAGCATTAT	TATGGAAAGA	TGATTGTGTC
AzaC-callus1	---CACTGA	ACTGATCAA	GAGCATTAT	TATGGAAAGA	TGATTGTGTC
AzaC-callus2	---CACTGA	ACTGATCAA	GAGCATTAT	TATGGAAAGA	TGATTGTGTC
AzaC-callus3	-----CTGA	ACTGATCAA	GAGCATTAT	TATGGAAAGA	TGATTGTGTC
AzaC-callus4	---ACTGA	ACTGATCAA	GAGCATTAT	TATGGAAAGA	TGATTGTGTC

도면9

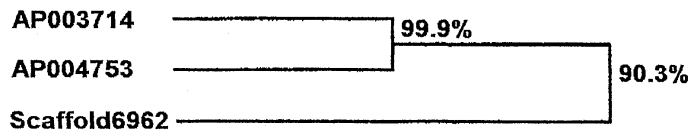
서열번호2



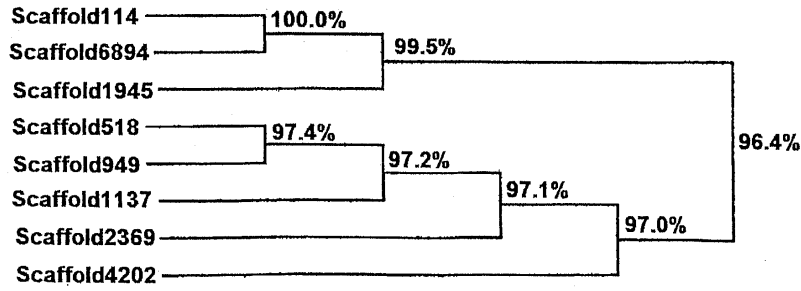
서열번호3



도면10



도면11



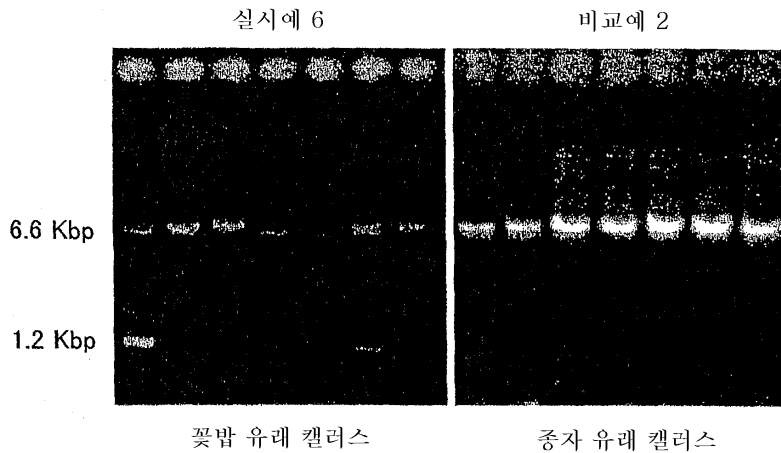
도면12

```

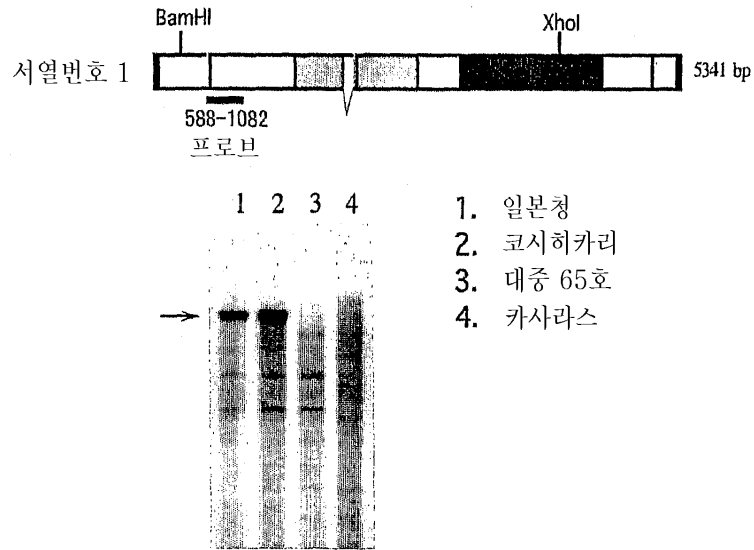
MS GNENQIPVSL
MQSLAISLLL SETHSLFSHT KTSSLLSLLF LSSSKMSEQN TDGSQVPVNL
* * * *
LDEFLAEDEI MDEIMDDVLH EMMVLLQSSI GDLEREAADH RLHPRKHIKR
LDEFLAEDEI ID----DLLT EATVVVQSTI EGLQNEASDH RHHPRKHIKR
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PREEAHQNLV NDYFSENPLY PSNIFRRRFR MYRPLELRIV DALGQWSDYF
PREEAHQQLV NDYFSENPLY PSKIFRRRFR MSRPLFLRIV EALGQWSVYF
***** ** ***** ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *
TORVDAAGRO GLSPLQKCTA AIRQLATGSG ADELDEYLKI GETTAMDAMK
TORVDAVNRK GLSPLQKCTA AIRQLATGSG ADELDEYLKI GETTAMEAMK
***** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** * * * * *
NEVKGIREVF GERYLRRPTV EDTERLLELG ERRGFPGMFG SIDCMHWQWE
NEVKGQLQDVF GERYLRRPTM EDTERLLQLG EKRGFPGMFG SIDCMHWHWE
***** ** ***** ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *
RCPTAWKGQF TRGDQKVPTL ILEAVASHDL WIWHAFFGVA GSNNDINVLN
RCPVAWKGQF TRGDQKVPTL ILEAVASHDL WIWHAFFGAA GSNNDINVLN
***** ***** ***** ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * *
RSTVFINELK GOAPRVQYMV NGNOYNEGYF LADGIMPEWK VFAKSYRLPI
QSTVFIKELK GOAPRVQYMV NGNOYNTGYF LADGIMPEWA VFVKSIRLEW
***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ** * * * *
DXG/AF/F motif
TEKEKLYAQH QEGARKDIER AFGVLQRREF ILKRPARLYD RGVLRDVVLG
TEKEKLYADM QEGARKDIER AFGVLQRREF ILKRPARLYD RGVLRDVVLA
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
YREK motif
CIILHNMIVE DEKEARLIEE NLDLNEPASS STVQAEFESP DQHVPLERIL
CIILHNMIVE DEKETRIIEE DLDLNVPPSS STVQAEFESP EQNTPFDRVL
***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EKDTSMRDRL AHRRLKNDLV EHIWNKFGGG AHSSGNYVFI LHY
EKDISIRDRA AHNRLKNDLV EHIWNKFGGA AHRTGN
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

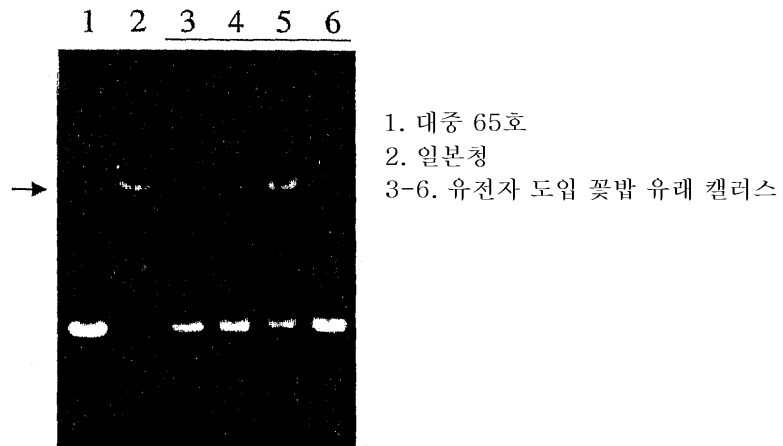
도면13



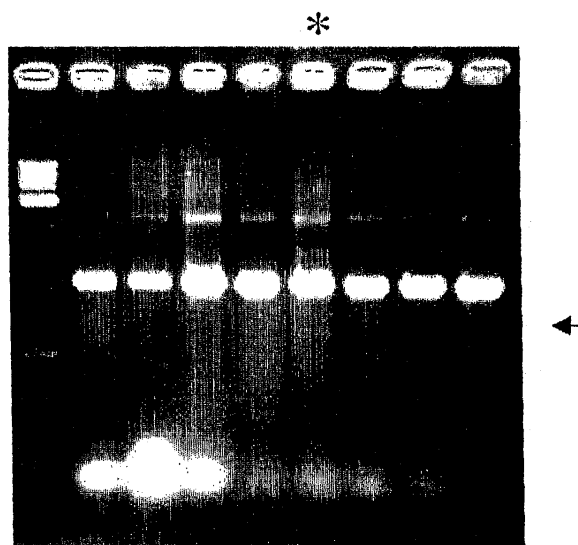
도면14



도면15



도면16





도면17

L02 GCGTGGACAC ACTGATTGGC CTGACAAAAC ATAGTTAGCA ATTTGCATTA  
Seq GCGTGGACAC ACTGATTGGC CTGACAAAAC ATAGTTAGCA ATT-----

L02 GGCCAGTCAC AATGGCTAGT GTCATTGCAC GGCTACCCAA AATATTATAC  
Seq -----

L02 CATCTTCTCT CAAATGAAAT CTTTTATGAA ACAATCCCCA CAGTGGAGGG  
Seq -----

L02 GTTTCACTTT GACGTTTCCA AGACTAAGCA AAGCATTAA TTGATACAAG  
Seq -----

L02 TTGCTGGGAT CATTGTACC CAAAATCCGG CGCGGCGCGG GAGAATGCGG  
Seq -----

L02 AGGTCGCACG GCGGAGGCGG ACGCAAGAGA TCCGGTGAAT GAAACGAATC  
Seq -----

L02 GGCTCAACG GGGGTTTAC TCTGTTACCG AGGACTTGA AACGACGCTG  
Seq -----

L02 ACGAGTTCA CCAGGATGAA ACTCTTCTCT TCTCTCAT CCCCATTTCA  
Seq -----

L02 TGCAAATAAT CTTTTTTAT TCAGTCTTAC CCCTATTAAT TGTGCATGAC  
Seq -----

L02 ACACCAGTGA AACCCCATTT GTGACTGGCC TTACGGCAAC ATTTGGATAT  
Seq -----

L02 CGAATTATGT CCAAAGAGCG AAGGTATCTG TTAGCTAATC ATCCGATCGG  
Seq -----ATGT CCAAAGAGCG AAGGTATCTG TTAGCTAATC ATCCGATCGG

도면18

L06 TGGTCCCTCGA TACTGTTGCC TGTGGGTACG GCACCACACC ACTCTGTTTT  
Seq TGGTCCCTCGA TACTGTTGCC TGTGGGTACG GCACCACACC ACTCTGTTTT

L06 TATTAGGCCA GTCACAATGG CTAGTGTCAT TGCACGGCTA CCCAAAATAT  
Seq TATTAG-----

L06 TATACCATCT TCTCTCAAAT GAAATCTTTT ATGAAACAAT CCCACAGTG  
Seq -----

L06 GAGGGGTTTC ACTTTGACGT TTCCAAGACT AAGCAAAGCA TTTAATTGAT  
Seq -----

L06 ACAAGTTGCT GGGATCATTT GTACCCAAAA TCCGGCGCGG CGCGGGAGAA  
Seq -----

L06 TGCGGAGGTC GCACGGCGGA GCGGACGCA AGAGATCCGG TGAATGAAAC  
Seq -----

L06 GAATCGGCCT CAACGGGGGT TCACTCTGT TACCGAGGAC TTGGAAACGA  
Seq -----

L06 CGCTGACGAG TTTACCAGG ATGAAACTCT TTCCTTCTCT CTCATCCCCA  
Seq -----

L06 TTTCATGCAA ATAATCATTT TTTATTAGT CTTACCCCTA TTAATGTGC  
Seq -----

L06 ATGACACACC AGTGAACCC CCATTGTGAC TGGCCTTAGA GGTAAGTTG  
Seq -----A GGTAAGTTG

L06 ATAGTACAGC CCACTACCAG CTCTAAATCA GTCAATGTAG TAGCTAATTC  
Seq ATAGTACAGC CCACTACCAG CTCTAAATCA GTCAATGTAG TAGCTAATTC

서열목록

서열목록 전자파일 첨부