



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년07월02일  
 (11) 등록번호 10-1412555  
 (24) 등록일자 2014년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 A01H 4/00 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01)  
 C12N 15/82 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2014-0003238  
 (22) 출원일자 2014년01월10일  
 심사청구일자 2014년01월10일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020120111715 A  
 KR1020110121784 A  
 KR1020110121786 A  
 KR1020130022564 A

(73) 특허권자  
 한국생명공학연구원  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
 (72) 발명자  
 조혜선  
 대전광역시 유성구 과학로 125  
 윤대화  
 대전광역시 유성구 과학로 125  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 최규환

전체 청구항 수 : 총 6 항

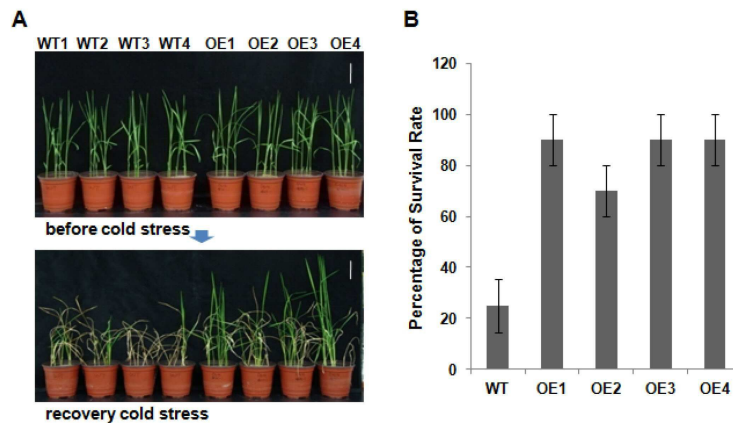
심사관 : 이형근

**(54) 발명의 명칭 벼 유래 OsCYP19-4 유전자를 이용한 환경 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명은 벼 유래의 OsCYP19-4(Oryza sativa cyclosporin A-binding protein) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 OsCYP19-4 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 식물체의 환경 스트레스 내성을 증가시키는 방법, 상기 벼 유래의 OsCYP19-4 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 환경 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 비형질전환체에 비해 환경 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 상기 OsCYP19-4 유전자를 유효성분으로 포함하는 식물체의 환경 스트레스 내성 증가용 조성물에 관한 것으로, OsCYP19-4 유전자가 저온 스트레스 내성 기작에서의 중요한 기능이 증명됨에 따라 상기 유전자가 벼의 저온 스트레스에 대한 저항성을 높이는데 유용할 것으로 기대된다.

**대표도 - 도4**



(72) 발명자

**안준철**

대전광역시 유성구 과학로 125

**이상숙**

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009043022013

부처명 농림축산식품부

연구사업명 차세대 바이오그린21사업

연구과제명 이뮤노필린 유전자군을 이용한 복합재해내성 작물(벼/배추) 개발

기 여 율 7/10

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM3151312

부처명 교육과학기술부

연구사업명 주요사업(연구개발과제)

연구과제명 바이오매스/에너지 세포공장 개발

기 여 율 3/10

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 OsCYP19-4(Oryza sativa cyclosporin A-binding protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 OsCYP19-4 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 식물체의 저온 스트레스 내성을 증가시키는 방법.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 OsCYP19-4(Oryza sativa cyclosporin A-binding protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 저온 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법.

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

제4항의 방법에 의해 제조된 비형질전환체에 비해 저온 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 식물체는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 저온 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체.

**청구항 9**

제7항에 따른 식물체의 종자.

**청구항 10**

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 OsCYP19-4(Oryza sativa cyclosporin A-binding protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 저온 스트레스 내성 증가용 조성물.

**명세서**

**기술분야**

본 발명은 벼 유래 OsCYP19-4 유전자를 이용한 환경 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 벼 유래의 OsCYP19-4(Oryza sativa cyclosporin A-binding protein) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 OsCYP19-4 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 식물체의 환경 스트레스 내성을 증가시키는 방법, 상기 벼 유래의 OsCYP19-4 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 환경

[0001]

스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 비형질전환체에 비해 환경 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 상기 OsCYP19-4 유전자를 유효성분으로 포함하는 식물체의 환경 스트레스 내성 증가용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0002] 식물의 병 저항성 반응 또는 환경적 스트레스에 대한 내성을 가지는 식물의 방어관련 기작 연구는 지금까지 알려져 있지 않은 생체 내 기작을 규명하는 과학 기술적 가치를 지닌다. 또한 식물방어관련 유전자의 정보는 작물의 분자적 유전육종의 직접적 재료로서 제공될 수 있을 뿐 아니라 전통적 유전육종에도 사용될 수 있는 장점을 지니고 있다.
- [0003] 환경친화적 식량생산의 측면에서 병 방어 관련 다양한 유전자, 또는 이들 형질을 이용한 작물 육종은 경제적으로 중요한 병원체, 잡초, 그리고 환경적 스트레스에 의한 손실을 최소화함으로써 식량생산비용을 줄일 수 있으며, 고품질의 식량을 제공하여 농산물의 경쟁력 회복에 기여함과 동시에 신품종의 개발과 연관된 다양한 산업의 활성화에 기여한다.
- [0004] 환경 스트레스는 식물의 성장을 저해하고 많은 중요한 농업 분야에서 수확물의 생산성을 제한하는 요소로서 수분 스트레스, 저온 스트레스, 염해 스트레스, 산화스트레스 등이 있다. 특히 수분 스트레스는 탈수, 고염도 및 저온과 같은 외부환경에 의해 유발되며, 식물의 성장을 저해하는 환경 스트레스에 있어서 가장 가혹한 스트레스 중의 하나이다.
- [0005] 환경 스트레스 중 하나인 냉해는 주로 농작물의 성장 기간 중 작물의 생육에 지장을 초래할 정도의 저온이 오래 지속되어 농작물의 성장과 수확에 나쁜 영향을 미치는 재해이다. 냉해를 받는 정도는 작물의 종류와 성장 정도에 따라서도 다르며, 저온 정도·저온 기간 등에 따라 다르게 나타난다. 벼의 냉해에는 냉해를 받는 시기에 따라 여러 가지 냉해형으로 구분될 수 있는데, 그 대표적인 것은 지연형 냉해, 장해형 냉해 및 혼합형 냉해이며, 이들 냉해형에 따른 저온의 한계온도가 다를 뿐 아니라 품종 간 차이도 크게 인정되고 있다. 지연형 냉해는 벼에서 생육 초기부터 출수기까지 여러 시기에 냉온을 만나 출수와 등숙이 지연되고 등숙불량을 초래하는 형태의 냉해이고, 장해형 냉해는 벼에서 유수형성기부터 개화기까지 특히 감수분열기에 냉온으로 정상적인 생식기관이 형성되지 못하거나 수분과 수정에 장애를 받아 불임현상이 나타나는 형태의 냉해이다. 영양생장기에는 기상이 양호했으나 생식생장기의 중요한 시기인 감수분열기 또는 출수재화기에 일시적으로 저온이 내습하여 화분모세포가 장애를 받거나, 약의 불개열, 화분의 비산장애, 화분관의 불신장 등 수분, 수정작용이 저해되어 불임을 일으키는 냉해형이다. 혼합형 냉해는 벼의 지연형 냉해와 장해형 냉해의 양자가 겹쳐져 발생하는 냉해로서 감수 정도가 극히 심하다.
- [0006] 우리나라에서 근래 냉해가 심하게 발생한 해는 1971년, 1980년, 1988년, 1993년으로 약 10년 주기로 발생되고 있으며, 2004년에도 남부 중산간 고랭지에서 약 4,000ha에서 냉해를 받았다. 1980년의 여름은 오호츠크해 고기압이 강하게 확장되어 중국의 양쯔강 하류 지역까지 영향을 미쳤기 때문에 거의 한반도 전역에 냉해를 기록하였다. 당시 논벼를 비롯하여 각종 농작물이 큰 냉해를 입었고, 특히 300m 이상 되는 고랭지와 동해안 지방에서 피해가 컸었다. 그 외에도 여름 장마가 오래 지속되어 저온소조가 지속되는 경우 종종 냉해를 입게 되며, 특히 산간·고랭지에서는 기온이 평년보다 조금만 낮아져도 그 피해가 크다. 1980년과 1993년에 나타난 저온현상은 지연형과 장해형 냉해를 동반하였고, 1988년 8월 중순에 태백준고랭지대에 나타난 냉해는 전형적인 장해형 냉해였다. 여름철 우리나라에 나타나는 저온 현상은 주로 오호츠크고기압의 확장이 원인이 되는 동해형 냉해인데, 이 냉해는 그 기간이 길고 피해가 크다. 동해형 냉해는 우리나라를 종단하여 그 동쪽에 피해가 큰 것이 특징이다.
- [0007] 인위적 원인에 의한 냉해는 품종·육묘·이앙기·시비·물관리·병충해방제 등이 그 지역 기후 조건에 부적절하여 입는 경우이다. 최근 다수확 신품종의 개발로 수확량이 급격히 늘어났지만 이상냉해가 되는 경우 그 피해가 다른 재래 품종에 비해 훨씬 심한 경우가 종종 있다.
- [0008] 한국등록특허 제0440725호에는 '비생물성 스트레스에 대한 단자엽 식물의 내성을 증가시키는 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제101154323에는 '벼에서 유래한 OsGRP6 단백질을 암호화하는 유전자로 형질전환된 저온 또는 동결 내성을 갖는 식물체의 제조 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 벼 유래 OsCYP19-4 유전자를 이용한 환경 스트레스 내성 식물체의 제조방법 및 이의 용도에 관해서는 밝혀진 바가 없다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 벼 유래 OsCYP19-4(*Oryza sativa* cyclosporin A-binding protein) 유전자 발현이 다양한 환경 스트레스 중 저온 스트레스 조건에서 10배 이상 크게 증가함을 qRT-PCR로 확인하였다. 저온 스트레스에 대한 OsCYP19-4 유전자의 기능을 확인하고자 역유전학(reverse genetics) 방법으로 OsCYP19-4 유전자를 35S 프로모터에 의해 과발현되게 하는 형질전환식물체를 생산하여 저온 스트레스 내성을 분석하였다. 4℃ 저온 스트레스 조건에서 대조구인 야생형 벼 식물체에 비해 OsCYP19-4 과발현 식물체는 강한 내성 및 높은 생존율을 나타내었고 이온 누출(ion leakage) 측정값에 의해 세포막의 손상이 대조구에 비해 2배 이상 낮은 것으로 확인되어 저온 스트레스 시 식물체의 생리적 상태가 더 양호함을 알 수 있었다. 따라서 OsCYP19-4 유전자는 저온 스트레스 내성에 관여하는 중요한 기능을 수행하며 벼와 같이 저온에 민감한 주요 작물의 환경 내성에 활용성이 있음을 증명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

**과제의 해결 수단**

[0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 벼 유래의 OsCYP19-4(*Oryza sativa* cyclosporin A-binding protein) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 OsCYP19-4 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 식물체의 환경 스트레스 내성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 벼 유래의 OsCYP19-4 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 환경 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 비형질전환체에 비해 환경 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 식물체의 종자를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 OsCYP19-4(*Oryza sativa* cyclosporin A-binding protein) 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 환경 스트레스 내성 증가용 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

[0015] 본 발명에 따른 벼 유래 OsCYP19-4(*Oryza sativa* cyclosporin A-binding protein) 유전자는 저온, 가뭄 및 산화를 포함하는 여러 환경 스트레스 조건하에서 유전자 발현이 증가하고 특히 저온 스트레스 시 10배 이상, 가장 강하게 유전자 발현이 증가함을 확인하였다. OsCYP19-4 과발현 형질전환식물체를 이용한 표현형 분석으로 OsCYP19-4 유전자가 저온 스트레스 내성 기작에 중요한 기능을 수행하고 있으며 주요 유용 작물에 도입할 수 있는 유전자의 활용성이 입증됨에 따라 OsCYP19-4 유전자가 벼의 저온 스트레스에 대한 저항성을 높이는데 유용할 것으로 기대된다.

**도면의 간단한 설명**

[0016] 도 1은 벼 유래 OsCYP19-4 유전자의 여러 환경 스트레스에 반응하는 유전자 발현 변화를 qRT-PCR 법으로 분석한 결과이다. A) 환경 스트레스별 OsCYP19-4 유전자 발현 분석. 4℃(저온 스트레스, Cold), 건조(가뭄 스트레스, Drought), 10mM 과산화수소(산화 스트레스, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide)의 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48시간별 유전자 발현. B) 환경 스트레스별 OsCYP19-4 유전자 발현 분석. 200mM NaCl(염해 스트레스), 100 μM 메틸자스몬산(methyl jasmonic acid), 100 μM 카드뮴(cadmium)에 의한 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48시간별 유전자 발현 분석.

도 2는 역유전학(reverse genetics)에 의한 OsCYP19-4 유전자 과발현을 위한 유전자 재조합 구축물과 T<sub>3</sub> 세대 형질전환체로부터 재조합유전자의 염색체내 삽입과 삽입된 유전자의 발현정도를 PCR과 RT-PCR 분석에 의해 확인한 결과이다. A) pCAMBIA1300 벡터의 T-DNA 영역에서의 35S 프로모터에 의한 OsCYP19-4 오픈리딩프레임(open reading frame) (1-208 aa) 유전자를 재조합한 도식도. CaMV 35S, 콜리플라워 모자이크 바이러스 35S 프로모터(cauliflower mosaic virus 35S promoter); NOS, 노팔린 합성효소 종결자(nopaline synthase terminator). B) OsCYP19-4 유전자 삽입 및 삽입 유전자 발현 분석 결과. WT1 및 WT2, 야생형 벼 라인; OE1-OE4, 독립된 OsCYP19-4 과발현 형질전환체 라인; RT-PCR, 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction); 35S-OsCYP19-4, 35S 프로모터 정방향 및 OsCYP19-4 유전자 특이적 역방향 프라이머 세트; OsCYP19-4, OsCYP19-4 유전자 특이적 정방향 및 역방향 프라이머 세트; OsACT1, cDNA 정량을 위한 *OsActin1* 유

전자 특이적 정방향 및 역방향 프라이머 세트.

도 3은 OsCYP19-4 유전자가 과발현된 형질전환체가 저온 스트레스에 내성을 나타내는 표현형 결과이다. A) 왼쪽 및 오른쪽 그림, 저온 스트레스를 주기 전 2주된 벼 식물체의 표현형. WTs, 야생형 동진 벼 라인들; OEs, T<sub>3</sub> 세대 독립적 OsCYP19-4 과발현체 라인들. B) 왼쪽 그림, 2주된 벼 식물체를 4°C 조건에서 4일간 저온 스트레스를 준 후 표현형; 오른쪽 그림, 2주된 벼 식물체를 4°C 조건에서 5일간 저온 스트레스를 준 후 표현형. C) 저온 스트레스 후 정상 온도로 회복시킨 후 벼 식물체의 표현형. 왼쪽 그림, 2주된 벼 식물체를 4°C 조건에서 4일간 저온 스트레스를 준 후 정상 온도 조건 28°C에서 2일간 회복시킨 표현형; 오른쪽 그림, 2주된 벼 식물체를 4°C 조건에서 5일간 저온 스트레스를 준 후 정상 온도 조건 28°C에서 1일간 회복시킨 표현형.

도 4는 OsCYP19-4 유전자가 과발현된 형질전환체의 저온 스트레스에 대한 내성을 생존율로 측정한 결과이다. A) 저온 스트레스에 대한 생존율을 측정하기 위해 2주된 벼 식물체를 4°C에서 5일간 저온 스트레스를 준 후 정상 온도 조건인 28°C에서 10일 동안 회복시킨 후의 표현형 결과. 저온 스트레스 전, 28°C 정상 온도 조건에서 자란 2주된 벼 식물체로 저온 스트레스를 주기 직전 표현형; 저온 스트레스로부터 회복, 2주된 식물체를 4°C에서 5일간 저온 스트레스를 준 후 정상 온도 조건인 28°C에서 10일 동안 회복시킨 후의 표현형 결과. B) 도 4A에서 회복 후 야생형과 OsCYP19-4 과발현체의 생존율을 나타내는 백분율값. 각 라인에 대해 20개체의 식물체를 사용하여 3반복에 대한 표준 오차값으로 계산되었다.

도 5는 저온 스트레스 시 야기되는 세포막 손상 정도를 이온 누출(ion leakage) 측정값으로 분석한 결과이다. A) 2주된 벼 식물체를 4°C 저온 스트레스를 준 후 1일째부터 5일째까지 상단에서 두 번째 잎을 취하여 이온 누출(ion leakage) 값을 측정한 그래프. B) 이온 누출(ion leakage) 분석시 사용된 OsCYP19-4 과발현 형질전환체의 5일째 저온 스트레스 내성 표현형. 저온 스트레스 전, 28°C 정상 온도 조건에서 자란 2주된 벼 식물체로 저온 스트레스를 주기 직전 표현형; 저온 처리 5일 후, 28°C 정상 온도 조건에서 자란 2주된 벼 식물체를 4°C 조건에서 5일 동안 저온 스트레스를 준 후 표현형.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼 유래의 OsCYP19-4(Oryza sativa cyclosporin A-binding protein) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 OsCYP19-4 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 식물체의 환경 스트레스 내성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 OsCYP19-4 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명에 따른 OsCYP19-4 단백질의 범위는 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 생리 활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체의 환경 스트레스 내성을 증가시키는 활성을 의미한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 OsCYP19-4 단백질을 암호화하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 유전자는 OsCYP19-4 단백질을 암호화하는 게놈 DNA 또는 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0021] 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 세포내 재도입된 것이다.

- [0022] 본 발명에서, 상기 OsCYP19-4 유전자 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.
- [0023] OsCYP19-4 유전자 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 생체 내 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 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)와 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.
- [0025] 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 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자, aadA 유전자 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 재조합 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS, 히스톤 프로모터, Clp 프로모터 일 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.
- [0027] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAm1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 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.
- [0028] 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.
- [0029] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 "환경 스트레스"란 식물체의 성장 또는 생산성을 저하시키는 외부적인 요인을 말하며 크게 생물학적 스트레스(biotic stress)와 비생물학적 스트레스(abiotic stress)로 대별된다. 생물학적 스트레스로는 대표적으로 병원균을 들 수 있으며 비생물학적 스트레스로는 고농도의 염, 건조, 저온, 고온 및 산화 스트레스 등이 포함된다. "환경 스트레스 내성"이란 상기와 같은 환경 스트레스에 의한 식물체의 성장 저하 또는 생산성의 저하가 억제되거나 지연되는 형질을 말한다.

- [0031] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 환경 스트레스는 저온 스트레스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 또한, 본 발명은
- [0033] 벼 유래의 OsCYP19-4(Oryza sativa cyclosporin A-binding protein) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환하는 단계; 및
- [0034] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 환경 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [0035] 바람직하게는, 상기 OsCYP19-4 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0036] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)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.
- [0037] 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.).
- [0038] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 환경 스트레스는 저온 스트레스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 비형질전환체에 비해 환경 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [0040] 바람직하게는, 상기 형질전환 식물체 및 이의 종자는 저온, 가뭄 또는 산화 스트레스 내성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자이다.
- [0041] 상기 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양과 등의 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 단자엽 식물이며, 더욱 바람직하게는 벼이다.
- [0042] 또한 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 OsCYP19-4 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 환경 스트레스 내성 증가용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 OsCYP19-4 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 저온 스트레스 내성을 증가시킬 수 있는 것이다.
- [0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] **실시예 1: 다양한 환경 스트레스 처리에 의한 벼 유래 OsCYP19-4 유전자의 발현 특성**

[0045] 벼 유래 OsCYP19-4 단백질 코딩 유전자(Os06g49470)는 208개 아미노산으로 구성된 하나의 펩티딜프롤릴 이성질체화효소 도메인(peptidyl prolyl isomerase domain)을 갖는 이뮤노필린(immunophilin) 그룹의 유전자로 본 연구진에 의해 분류되었으나(Ahn et al., 2010 BMC Plant Biology, 10: 253) 현재까지 유전자의 특성 및 기능에 대한 연구는 수행되고 있지 않다. OsCYP19-4의 기능이 환경 스트레스 방어기작에 관련되어 있는지를 조사하기 위하여 먼저 환경 스트레스 처리에 대한 유전자 발현 반응을 qRT-PCR을 통해 확인하였다. 처리한 스트레스 종류는 저온, 건조, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 산화 스트레스, 고농도 염, 메틸자스몬산(methyl jasmonic acid)와 카드뮴(cadmium) 중금속을 대상으로 하였다. 각 스트레스 처리는 종자 발아 후 2주된 벼 유식물체를 대상으로 4℃ 저온 스트레스, 건조, 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 200mM NaCl, 10 μM 메틸자스몬산(methyl jasmonic acid) 와 100 μM 카드뮴(cadmium)을 처리한 후 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48시간대 별로 총 RNA를 추출하고, 2μg RNA로부터 MMLV 역전사 효



소(Reverse Transcriptase, Invitrogen, 미국)에 의한 cDNA를 합성하여 qRT-PCR에 사용하였다. OsCYP19-4 특이적 프라이머는 정방향 (서열번호 3, 5'-GAA TTC ATG GCG GCG AGG GAG ACG TCG CGC CAC-3')과 역방향 (서열번호 4, 5'-CTC GAG TCA CTT CAG TTC GCC GCT GTC TGA TAT G-3'), 발현량 보정을 위한 OsActin1 프라이머는 정방향 (서열번호 5, 5'-CAT GCT ATC CCT CGT CTC GAC CT-3') 및 역방향 (서열번호 6, 5'-CGC ACT TCA TGA TGG AGT TGT AT-3') 염기서열을 각각 사용하였다. OsCYP19-4 유전자 발현은 여러 환경 스트레스 중 저온 스트레스에 가장 강하게 증가되었으며 처리 3시간 후부터 증가하기 시작하여 48시간 후에는 13배 이상의 매우 큰 증가를 나타내었다. 처리 24시간 후에는 증가 후 다소 감소하는 발현을 보여주었으며 세 번의 생물학적 반복 실험을 통해 24시간 후 특이적으로 감소하는 경향이 반복됨을 확인하였다. 건조에 대한 스트레스 조건에서도 OsCYP19-4 유전자 발현은 처리 3시간 후부터 증가하기 시작하여 24시간에는 3배 이상 증가되었으며, 활성산소(ROS, Reactive oxygen species)를 유발하는 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리시에는 처리 1시간 후 빠르게 증가하여 6시간까지 지속 되다 24시간 이후엔 다시 정상 수준으로 회복됨을 확인하였고 다른 환경 스트레스에 비해 산화적 스트레스에 대해 빠른 시간 내에 OsCYP19-4 유전자 발현이 증가함을 확인하였다(도 1A). 고농도의 염과 메틸자스몬산 식물호르몬(methyl jasmonic acid phytohormone) 처리에 대해서도 처리 3시간 후부터 유전자 발현이 약간 증가됨을 확인하였다. 중금속인 카드뮴(cadmium) 처리에 대해서는 OsCYP19-4 유전자의 발현이 처리 3시간 후부터 2배 이상 감소되었으며 48시간까지 감소 현상이 지속되었다(도 1B). 상기의 결과로부터 OsCYP19-4 유전자 발현은 다양한 환경 스트레스에 반응하며 특히 저온 스트레스시 매우 중요한 기능을 수행할 수 있을 것으로 사료된다.

[0046] **실시예 2: OsCYP19-4 과발현 형질전환체 생산**

[0047] 35S 프로모터를 이용한 OsCYP19-4의 과발현체 생산을 위해 OsCYP19-4 특이적 프라이머 정방향 (서열번호 3, 5'-GAA TTC ATG GCG GCG AGG GAG ACG TCG CGC CAC-3')와 역방향 (서열번호 4, 5'-CTC GAG TCA CTT CAG TTC GCC GCT GTC TGA TAT G-3') 염기서열을 사용하여 pCAMBIA 벡터에 클로닝하였다(도 2A). T<sub>3</sub> 세대로부터 하이그로마이신 항생제를 이용해 과발현 형질전환체를 선발하고 게놈 DNA(genomic DNA)를 주형으로 한 PCR 분석으로 OsCYP19-4 유전자가 안전하게 벡터 염색체 내로 삽입되었는지를 35S 프로모터 정방향 프라이머 (서열번호 7, 5'-ATG ACG CAC AAT CCC ACT AT-3')와 OsCYP19-4 유전자 특이적 역방향 프라이머 (서열번호 4, 5'-CTC GAG TCA CTT CAG TTC GCC GCT GTC TGA TAT G-3')를 이용하여 확인한 결과, 4개의 독립적 OsCYP19-4 과발현 형질전환체는 모두 T-DNA 부위가 안전하게 벡터 염색체로 삽입되었음이 증명되었다(도 2B). 또한 삽입된 외래 유전자의 발현 수준을 확인하기 위해 4개의 독립적 과발현체로부터 총 RNA를 분리하고 cDNA를 합성한 후 RT-PCR 분석한 결과, 4개의 형질전환체가 모두 대조구에 비해 35S 프로모터에 의한 강한 유전자 발현이 되고 있음을 확인하였다(도 2B). 따라서 이들 4개의 독립라인 형질전환체를 기능분석을 위한 역유전학(reverse genetics) 재료로 사용하고 자 한다.

[0048] **실시예 3: OsCYP19-4 과발현체를 이용한 저온 스트레스 내성 확인**

[0049] OsCYP19-4 유전자의 과발현체를 대상으로 여러 환경 스트레스 내성 분석 결과, 고농도의 염, 건조, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 메틸자스몬산(methyl jasmonic acid) 스트레스에 대해서는 내성 표현형이 관찰되지 않았으며 카드뮴(cadmium) 스트레스 처리 시에는 오히려 민감성을 나타내었다. OsCYP19-4 유전자는 여러 스트레스 중 저온 스트레스 시 유전자 발현이 가장 강하게 증가 되었으며 저온 스트레스에 대한 내성 또한 분석하였다. 토양 조건에서 2주 자란 유식물체를 대상으로 4℃ 저온 스트레스를 4일 또는 5일 동안 처리한 후 내성 표현형을 관찰하였다. 저온 스트레스 처리 전 2주된 식물체는 대조구인 동진 야생형과 OsCYP19-4 형질전환체가 거의 비슷한 표현형을 나타내었으나(도 3A), 4℃ 저온 스트레스를 4일 또는 5일간 처리하였을 때는 대조구인 야생형 벡 식물체는 잎이 심하게 마르고 꼬이는 전형적인 저온 스트레스 표현형이 강하게 나타나는 반면 OsCYP19-4 과발현체에서는 약간의 시들음 현상이 관찰되었으나 대조구에 비해 매우 강한 내성을 보여주었다(도 3B). 저온 스트레스 처리 후 정상 온도 조건으로 회복시키면 큰 온도차에 의해 야생형 식물체는 거의 괴사하는 반면 과발현체에서는 대조구에 비해 정상 온도 조건에서의 회복 과정에서도 큰 온도차를 잘 극복하는 것으로 관찰되었다(도 3C).

[0050] **실시예 4: OsCYP19-4 과발현에 의한 저온 스트레스 생존율 증가**

[0051] 저온 스트레스에 대한 내성을 보다 정확하게 분석하고자 저온 스트레스 후 정상온도 조건에서의 회복 정도를 생

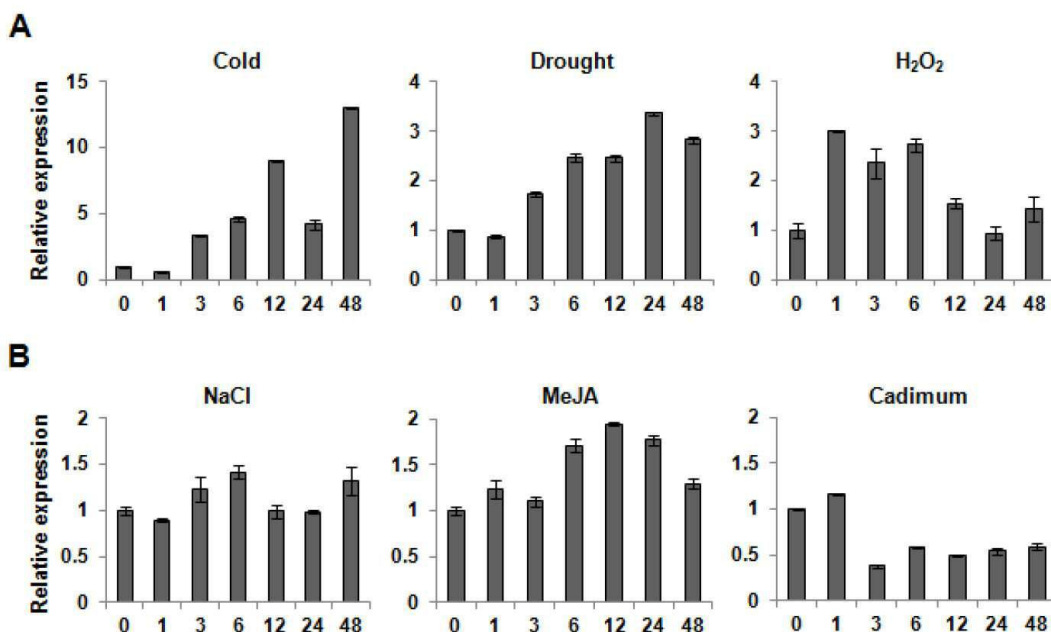
존율로 조사하였다. 앞의 도 3C에서와 같이 대조구인 야생형 식물체는 4℃ 저온 처리 후 정상 온도로 회복시키면 식물체의 스트레스가 극대화되어 회복기 이후 약 10일이 경과 되면 대부분의 식물체가 괴사 되는 표현형을 나타내지만, OsCYP19-4가 과발현된 식물체는 대조구에 비해 녹색을 함유한 생존 식물체가 훨씬 많음을 알 수 있다(도 4A). 야생형과 OsCYP19-4 과발현체의 4개 독립라인에 대해 각 라인 당 5개 식물체를 대상으로 생물학적 실험을 4번 반복하여 총 20개 식물체에 대한 생존율을 계산하였다. 2주된 유식물체를 암상태에서 5일간 4℃ 저온 스트레스 처리한 후 28℃ 온도 조건의 식물생장기에서 12시간 빛/12시간 암조건에서 10일 동안 배양한 후 식물체의 상태가 완전히 마르고 엽록소가 전혀 없는 경우를 치사율로 계산하였다. 야생형의 경우 4개 라인에 대해 평균적으로 약 20% 정도의 식물체가 저온 스트레스 후 회복 과정에서 생존하였으나 OsCYP19-4 과발현체에서는 각 라인간의 차이는 있지만 약 70-90%의 높은 생존율을 나타내었다(도 4B). 이 결과로부터 OsCYP19-4 유전자가 과발현된 형질전환체는 저온 스트레스에 대해 강한 내성을 재입증할 수 있었다.

[0052] **실시예 5: OsCYP19-4 과발현체의 저온 스트레스 시 낮은 이온 누출(ion leakage) 값**

[0053] OsCYP19-4 과발현체의 저온 스트레스 내성에 대한 생리적 수준의 변화를 세포막 손상 정도를 측정할 수 있는 이온 누출(ion leakage) 값으로 분석하고자 하였다. 저온 스트레스 후 0, 1, 2, 3, 4, 5일째의 이온 누출(ion leakage) 값을 각 식물체의 상단에서부터 두 번째 잎을 동일하게 샘플링한 후 일정 크기의 잎 조직으로부터 이온 누출(ion leakage) 값을 분석하였다. 저온 처리 1일 및 2일 후에는 대조구인 야생형 식물체와 과발현 식물체 모두에서 이온 누출(ion leakage) 값의 차이를 나타내지 않았으나 저온 처리 3일 후부터는 대조구인 야생형 식물체에서 세포막으로부터 용출되는 이온 값에 차이를 나타내어 20% 이상이 되고, 4일과 5일 후에는 급격하게 이온 누출(ion leakage) 값이 증가하여 약 40%에서 70%까지 측정되었고, 5일째의 표현형 또한 육안으로 구별이 되는 저온 스트레스 표현형을 나타내었다. 반면, OsCYP19-4 과발현체에서는 3일부터 대조구와 이온 누출(ion leakage) 값에 차이를 나타내기 시작했으며 4일과 5일 후에는 대조구에 비해 현저하게 낮은 이온 누출(ion leakage) 값을 보였다(도 5A). 표현형에 있어서도 앞의 결과와 같이 5일 후에는 OsCYP19-4 과발현체가 대조구보다 강한 내성을 나타내었다(도 5B). 이상의 결과로부터 저온 스트레스 시 OsCYP19-4 과발현에 의한 세포막 손상이 저하됨을 이온 누출(ion leakage) 값 분석을 통해 확인하여 생리학적 방법으로 내성 표현형을 입증하였다.

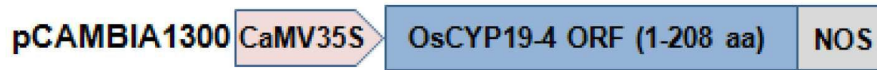
**도면**

**도면1**

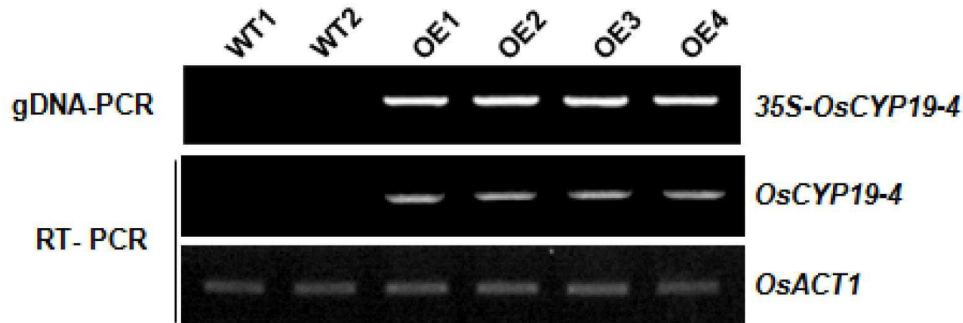


도면2

**A**

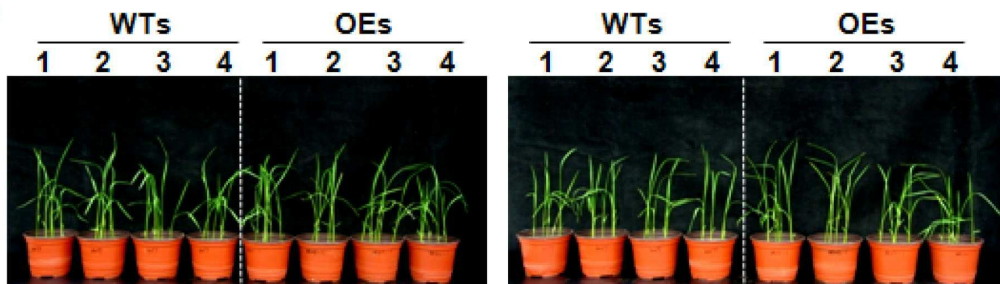


**B**



도면3

**A**



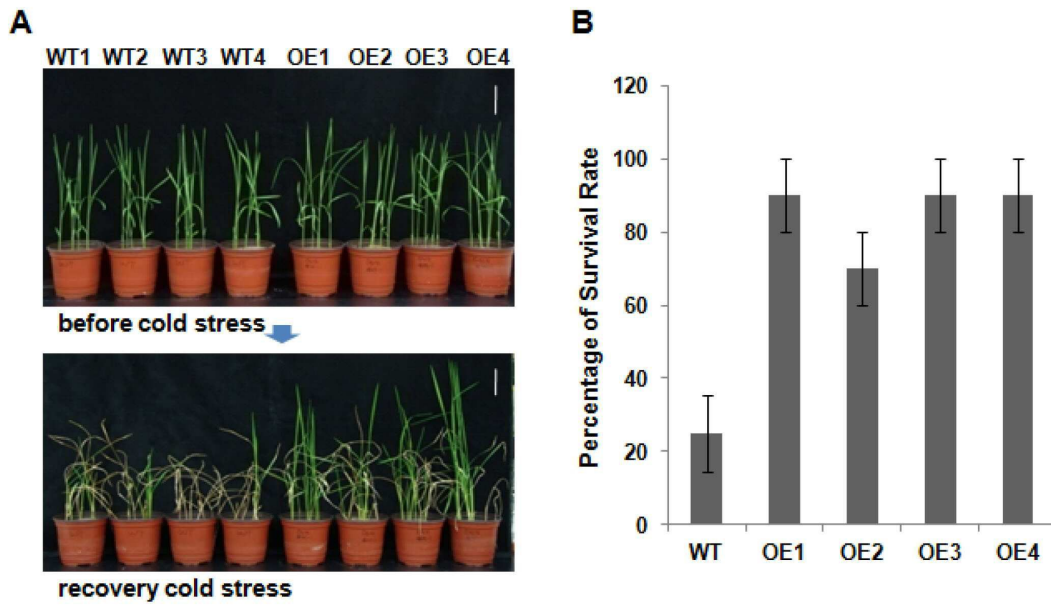
**B**



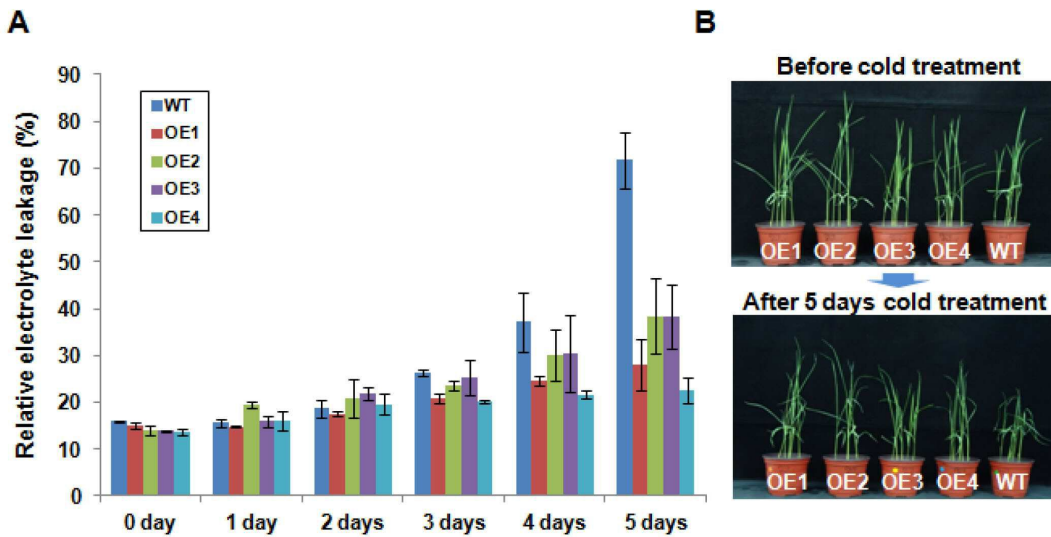
**C**



도면4



도면5



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Method for producing transgenic plant with increased resistance to environmental stresses using OsCYP19-4 gene
- <130> PN13426
- <160> 7
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 627

<212> DNA  
 <213> Oryza sativa  
 <400> 1

atggcggcga gggagacgtc gcgccacgcg tcgctctgcc tgtggctcgc gctcgtcgcc 60  
 gccaccctct ctctcgcca ggcggtagaa tcagaagccg aattgaccaa ggtcaccacc 120  
 aaggtcttct tcgacatcac aatcaatggc aagccggcag gtcggattgt catggggctt 180

tttgaaaca ctgttctaa aacagcagag aacttccgag caattgcac aggtgagaaa 240  
 ggacttggca agagtggcaa acctctctcc tacaaggaa cgccattcca caggatcacc 300  
 ccaggcttca tgatccaagg aggcgacacc gtgagcggca atggaaccgg ctgtgattcg 360  
 atctatgggt gaatgttccc tgatgagaac ttcaagatca accactctgc accagggttg 420  
 ctgtccatgg ccaactatgc gaaagataca aacggatccc agttcttcat caccaccgta 480  
 aagctaacc ggttggatgg gaagcatgtt gtgtttggca aggtgctttc tggaatggac 540  
 gtctgtctaca agattgaagc tgaaggcagt cagagtggta ctccacggtc caaagtcctc 600

atatcagaca gcgcgcaact gaagtga 627

<210> 2  
 <211> 208  
 <212> PRT  
 <213> Oryza sativa  
 <400> 2

Met Ala Ala Arg Glu Thr Ser Arg His Ala Ser Leu Cys Leu Trp Leu  
 1 5 10 15

Ala Leu Val Ala Ala Thr Leu Ser Leu Ala Gln Ala Val Glu Ser Glu  
 20 25 30

Ala Glu Leu Thr Lys Val Thr Thr Lys Val Phe Phe Asp Ile Thr Ile  
 35 40 45

Asn Gly Lys Pro Ala Gly Arg Ile Val Met Gly Leu Phe Gly Asn Thr  
 50 55 60

Val Pro Lys Thr Ala Glu Asn Phe Arg Ala Ile Cys Thr Gly Glu Lys  
 65 70 75 80

Gly Leu Gly Lys Ser Gly Lys Pro Leu Ser Tyr Lys Gly Thr Pro Phe  
 85 90 95

His Arg Ile Ile Pro Gly Phe Met Ile Gln Gly Gly Asp Thr Val Ser

100 105 110  
 Gly Asn Gly Thr Gly Cys Asp Ser Ile Tyr Gly Gly Met Phe Pro Asp  
 115 120 125  
 Glu Asn Phe Lys Ile Asn His Ser Ala Pro Gly Leu Leu Ser Met Ala  
 130 135 140  
 Asn Tyr Ala Lys Asp Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Val  
 145 150 155 160  
 Lys Leu Thr Arg Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly Lys Val Leu  
 165 170 175  
 Ser Gly Met Asp Val Val Tyr Lys Ile Glu Ala Glu Gly Ser Gln Ser  
 180 185 190

Gly Thr Pro Arg Ser Lys Val Leu Ile Ser Asp Ser Gly Glu Leu Lys

195 200 205

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

gaattcatgg cggcgaggga gacgtcgcgc cac

33

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

ctcgagtcac ttcagttcgc cgctgtctga tatg

34

<210> 5

<211

> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400>	5	
	catgctatcc ctgctcga cct	23
<210>	6	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	6	
	cgcacttcat gatggagtg tat	23
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	7	
	atgacgaca atcccactat	20