

최 중
연구보고서

유전자 조작을 이용한 인산 흡수력이 강화된
새로운 벼 형질전환체의 개발

Development of new rice transgenic plants enhanced
phosphate acquisition with recombinant DNA technique

동 아 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유전자 조작을 이용한 인산 흡수력이 강화된 새로운 벼 형질전환체의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 15일

주관연구기관명 : 동아대학교 생명자원과학대학

총괄연구책임자 : 김 도 훈

세부연구책임자 : 정 순 재

세부연구책임자 : 남 재 성

연 구 원 : 김 은 정

연 구 원 : 이 화 영

연 구 원 : 서 현 미

연 구 원 : 최 유 진

요 약 문

I. 제 목

유전자 조작을 이용한 인산 흡수력이 강화된 새로운 벼 형질전환체의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구개발의 최종 목표는 농작물의 인산 흡수 능력을 향상시킬 수 있는 유전자를 분자생물학, 생화학 및 유전학적인 방법을 이용하여 확보하고, 작용기작을 규명하여 최종적으로는 이들 유전자를 벼에 형질전환시켜 인산 흡수 능력이 증대된 새로운 벼 형질전환체를 개발하는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

제1 단계; 인산 결핍에 의해 특이적으로 발현이 유도되는 벼의 유전자 선별

- 본 연구팀은 뿌리에서 인산 결핍에 의해 특이적으로 발현이 유도되는 벼의 유전자들을 subtraction cloning 방법을 이용하여 확보했으며, 이러한 방법으로 확보된 새로운 벼 유전자들의 full length cDNA의 확보와 아직 국내에서는 연구가 전무한 벼 뿌리 특이적인 분자생리·생물학적 연구를 위해 벼 뿌리를 이용한 cDNA library를 제작하였다.

- 특히 본 연구팀이 이미 분리한 벼의 고친화성 인산 운반체의 모든 gene family와 근권의 인산효율성을 증가시키는 acidic phosphatase, citrate synthase 유전자들을 우선순위로 cross hybridization 방법을 이용하여 벼 뿌리 cDNA library에서 분리·확보하였다.

제2 단계; 벼의 근권 토양의 유효인산 농도를 증가시키는데 필요한 기초연구 및 응용방법의 개발

- 분리한 벼의 고친화성 인산 운반체의 모든 gene family들의 인산 결핍 특이적 유도성, 조직특이성 등을 northern blot와 GUS report system을 이용하여 확인하고 고

친화성 인산 운반체가 결핍된 효모균의 complementation test를 이용하여 이들 유전자들의 기능을 검정하여 응용성이 높은 고친화성 인산 운반체 유전자들을 최종 선별하였다.

- 선별된 유전자의 식물세포 내에서의 기능을 이해하기 위해 고친화성 인산 운반체의 유전자를 애기장대에 형질전환하여 유전자의 발현양상과 생육의 정도를 측정하였다. 그리고 인산 결핍 조건에서 발현하는 유전자를 분리하기 위해 SSH 방법과 DNA microarray 방법을 이용하여 고친화성 인산 운반체와 식물세포 내에서 결합하여 인산 운반체의 작용을 조절할 것으로 추측되는 새로운 유전자를 분리하였다.

제3 단계; 인산 흡수 능력이 증대된 벼 형질전환체의 개발

- 인산 흡수 능력이 향상된 식물체의 개발은 두 가지 방법으로 접근이 가능하며, 첫째는 뿌리에 고친화성 인산 운반체의 수를 증가시킴으로서 인산의 흡수량을 증가시키는 것이고, 둘째는 acid phosphatase의 분비 능력을 증가시키거나 유기산의 분비를 촉진하여 근권 토양에서 인산의 유효성을 증가시키는 것이다.

- 따라서 고친화성 인산 운반체 유전자, acidic phosphatase 유전자, citrate synthase 유전자들이 각각 강화된 벼 형질전환체를 먼저 개발하여 기내와 포장실험을 통한 인산흡수력, 유전적 안정성, 생산성 등을 적어도 T2 세대까지 조사를 수행하고 있다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 인산 흡수 기작에 대한 기초적 연구를 통하여 식물의 양분 흡수에 대한 반응을 연구함으로써 양분흡수 능력이 향상된 작물개발을 위한 기초 기술이 확보되었다.

- 유전자의 탐색 기술은 분자유종 기술을 이용한 작물의 개량에 필수적인 기술로서 본 연구를 통하여 이러한 기술이 축적되어 인산의 고정어 큰 문제가 되고 있는 밭작물에서도 응용 가능성을 알 수 있었다.

- 새로운 벼 형질전환체의 개발을 위해 첨단 기술인 분자유종법과 기존의 육종법이 결합하면 매우 우수한 벼 형질전환체의 개발이 가능할 것으로 생각되며, 현재 본 연구단에서 얻어진 형질전환체를 이용하여 중간 모본 육성을 위한 연구를 진행하고 있다.

- 인산 운반체 유전자의 형질전환에 의한 양분 흡수 능력이 증대된 벼 형질전환체의 개발이 가능하며, 특히 시트르산 생성효소 유전자를 이용한 토양 중의 인산 유효도 증대는 작물의 인산 흡수 효율의 증대에 크게 기여할 것으로 생각된다.

- 본 연구 결과 확보되는 인산 흡수 관련 유전자는 분자유종을 이용한 벼의 신품종

육종을 위해 이용될 수 있고, 특히 식물의 인산 흡수 능력을 제고할 수 있는 방법을 제시하므로써 다른 작물을 대상으로 많은 연구가 활성화 될 것으로 기대한다.

- 벼에서 인산 흡수 관련 유전자의 탐색과 형질전환 체계가 확립으로 이것을 이용하여 다른 작물을 대상으로 인산 흡수와 관련된 분자유종 분야의 연구를 수행할 수 있을 것이며, 양분 흡수에 대한 분자수준의 연구에 많은 발전이 있을 것으로 생각된다.

- 인산 뿐 만 아니라 여러 가지 양분의 결핍 조건에서도 잘 견딜 수 있는 작물의 개량을 위한 유전자 정보를 얻게 됨으로서 식물의 필수영양에 대한 분자 수준의 연구와 양분이 제한된 환경에서도 잘 자랄 수 있는 환경 내성 식물의 개발에도 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

- 확보된 유전자는 유용성에 따라 특허를 획득하고 상품화하여 외국으로 수출할 수 있는 길을 모색할 수 있고, 기능적으로 우수한 작물을 육종하여 고부가가치를 가지는 식물의 개발을 통한 농업의 국제경쟁력 제고에 기여할 것으로 기대된다.

SUMMARY

Phosphorus is one of the major essential nutrients for growth and development of plant. Plants respond to the deficiency of phosphate (Pi) by coordinating the expression of genes involved in alleviation of the Pi starvation. The high-affinity Pi transporters are activated during Pi starvation. Our ultimate goal is to develop new transgenic plants able to adapt to phosphate deficient condition by understanding the mechanisms that underlie phosphorous homeostasis in plant cell. First of all, we characterized high-affinity phosphate transporter genes of rice in the genome-wide level. Here, we isolated the 10 different high-affinity phosphate transporter genes (OsPT1-10) from rice (*Oryza sativa*). The amino acid sequences of OsPTs are 70% identical to each other and show high degree of amino acid sequence similarity with high-affinity phosphate transporters from other plants, such as *Arabidopsis thaliana*, potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Lycopersicon esculentum*). Like other well characterized plant high-affinity phosphate transporters, OsPTs contains 12 putative membrane-spanning domains, hydrophilic amino and carboxy termini, and a hydrophilic loop between transmembrane segments six and seven. An unrooted phylogenetic tree diagram demonstrates that monocotyledonous OsPTs evolutionally are different from those of dicotyledonous plants and OsPTs also have evolved in three distinct groups. The RNA blot analysis showed that expressions of OsPT genes are various in responses to phosphate deficiency. In particular, expression of OsPT1, OsPT2, OsPT7 and OsPT8 were up-regulated in callus suspension cell in response to Pi deficiency. However, OsPT4 was constitutively expressed in the both phosphate deficient and phosphate sufficient conditions. In addition, we analyzed that tissue-specific regulation of OsPTs in rice plant in response to Pi deficiency. OsPT1, OsPT2, OsPT3, OsPT7, OsPT8 and OsPT10 were highly expressed in the root. In contrast, OsPT4 was ubiquitously expressed in leaves, stem, and root regardless Pi conditions. We also generated transgenic Rice and *Arabidopsis* plants overexpressing each OsPT1, OsPT4, OsPT7, and OsPT8 genes. *Arabidopsis* transgenic plants overexpressing OsPT gene suppressed the expression of AtPT1 gene during Pi-deficient condition. Our data indicated that *Arabidopsis* transgenic lines

overexpressing rice high-affinity phosphate transporters enhanced phosphate acquisition in Pi deficient condition.

To study the rice genes differentially expressed in response to phosphate starvation, suppression subtractive hybridization (SSH) was performed with total RNA samples from rice (*Oryza sativa*) calli grown in phosphate supplemented or deficient Hogland solution for 4 days. Total 770 clones were identified and their functions were grouped by comparing sequence homology via GenBank database. Percentage of functional classification showed that metabolism, protein fate (folding modification, destination) ; 7%, energy, cell cycle and DNA processing, transcription, protein synthesis, cellular transport, cellular communication, cellular organization ; 3%, cell rescue ; 4%, cell fate, development, transport facilitation ; 1%, subcellular localization ; 10%, classification not yet ; 6%, unclassified proteins ; 42%.

CONTENTS

Chapter 1. Summary of research	5
Charpter 2. Current status of research area	9
Charpter 3. Results	12
Charpter 4. Achievements and contributions of results	91
Chapter 5. Application of results	93
Chapter 6. Scientific information from foreign research	95
Chapter 7. References	97

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	4
제 2 장	국내외 기술개발 현황	9
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	12
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	91
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	93
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	95
제 7 장	참고문헌	97

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 인산흡수 능력을 향상시킬 수 있는 유전자들의 대량 확보

- 미래의 생명과학 발전과 산업화는 유용한 유전자원의 확보, 유용유전자들의 분리 및 기능해석, 그리고 이들 유전자들의 응용기술개발에 의존할 수밖에 없다. 이미 인간을 포함한 30 여종의 생물들에 대한 전체 유전체의 염기서열이 밝혀짐으로서 수없이 많은 유용한 유전자들이 분리되고 기능분석 후에 특허화 되고 있다.

- 특히 세계적으로 가장 중요한 작물 중의 하나인 벼의 경우, 미국,일본 및 중국 등을 중심으로 rice genome project를 통해 EST(expressed sequence tag) 및 전체 유전체의 염기서열을 밝혀 새로운 유용유전자를 대량으로 확보하고 이를 선점하고자 많은 노력을 기울이고 있다.

- 국내에서도 농진청을 중심으로 한 rice cDNA project 및 genome project를 수행하고 있으며, 국내의 제한된 연구인력과 연구비로 보다 가시적인 연구성과를 이루어 내기 위해서는 대학에서의 유용 연구인력 양성과 국제적 경쟁력을 가질 수 있는 연구분야의 개발을 통한 새로운 유용유전자의 대량 확보와 기능분석을 위한 체계적인 노력이 필요하다.

- 인산은 식물이 필요로 하는 필수영양원소 중의 하나로서 에너지 전달, 신호전달, 대사산물의 생합성, 광합성, 호흡 등의 식물세포 내에서 물질 대사과정에 중요한 기능을 할 뿐 아니라 DNA와 RNA의 중요한 구성성분으로 질소와 함께 식물체가 가장 많이 필요로 하는 영양원소이다. 따라서 인산의 결핍은 직접적으로 식물체의 성장과 분화에 영향을 미친다.

- 식물체의 성장에 필요한 많은 양의 인산은 주로 비료의 형태로 식물체에게 공급되고 있으나 대부분의 인산은 토양에서 식물이 이용할 수 없는 유기물 또는 금속이온

들과 결합한 형태로 고정화된다. 따라서 실제 식물이 이용할 수 있는 유효인산의 양은 토양 속에 극히 적은 양으로 존재하고 있다. 특히 산성 토양의 경우, 과다하게 축적된 알루미늄 이온에 의한 인산의 고정화로 토양의 인산 유효성을 더욱 낮추고 있다.

- 인산이 결핍된 조건에서 식물의 반응은 뿌리의 성장과 뿌리털의 형성을 촉진하여 표면적을 넓히고 (proteoid root 형성) 고친화성 인산 운반체(high affinity phosphate transporter), acidic phosphatase, 유기산 생합성과 분비에 관련된 유전자들의 발현을 유도한다. 그 결과로 다량의 유기산 (특히 citric acid)과 acidic phosphatase가 근권 토양에 분비되어 유효인산의 양이 증가되고 세포막에 위치하는 고친화성 인산 운반체에 의한 인산의 흡수가 증가되어 인산결핍이 극복된다.

- 전 세계적으로 인산흡수 관련 유전자들에 대한 연구는 현재 시작 단계이고, 효모에서 잘 연구된 인산 흡수 관련 돌연변이들과 그 기능이 밝혀진 유전자들을 이용하여 Arabidopsis, Medicago, 토마토, 감자, 보리 등의 식물체에서 인산흡수 관련 유전자들의 탐색이 이루어지고 있다. 특히 고친화성 인산운반체 유전자들이 이들 식물체로부터 분리되어 응용 가능성에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 그러나 아직 벼에서 인산흡수 관련 유전자에 대한 연구는 전 세계적으로 전혀 이루어져 있지 않다.

- 따라서 가까운 미래에 완성될 rice genome project의 과급효과를 고려할 때, 본 연구단에서 최초로 분리한 3 종류의 벼의 고친화성 인산운반체 유전자들과 acidic phosphatase 유전자등과 같이 기존에 잘 연구된 인산흡수와 관련된 유전자들을 벼에서 분리하여 응용가능성을 연구하는 것은 인산결핍 시 특이적으로 유도되는 새로운 유전자들의 분리와 기능분석 연구와 함께 국가적 지원이 필요한 연구들이다. 또한 국내에서 세계 최초로 시도되어 가시적인 성과를 보이고 있는 rice T-DNA inserted mutant library가 완성되어 이용가능 하면 rice genome project와 함께 전 세계적으로 벼의 새로운 유전자들의 분리와 기능분석 그리고 특허화 경쟁을 더욱 촉진시킬 것으로 예상되므로 국가적인 준비가 필요하다.

나. 유전공학적 기법에 의한 인산흡수 능력이 향상된 식물체 개발의 필요성

- 토양에서 인산의 유효성은 작물의 생육과 수량의 증대에 크게 영향을 미치는 식물체가 필요로 하는 가장 중요한 필수영양원소 중의 하나이다. 매년 전체 영농비용의 상당부분이 토양의 유효인산 함량을 증가시키기 위한 비료 구입비용으로 사용되고 있다. 과다한 비료의 사용은 토양은 물론 수자원의 심각한 오염을 초래하고 있다. 따라

서 비료의 형태로 공급하는 인산의 양을 줄일 수 있어 생산비의 절감과 환경오염을 줄임으로서 새로운 품종의 개발이 필요하다. 그러나 인산흡수 능력의 차이는 표현형으로 잘 나타나지 않아 교잡육종법에 의한 신품종 육종에는 어려움이 있어 인산흡수 능력이 향상된 벼 신품종의 육종을 위해 유전공학적 기술의 도입이 필요하다.

- 전통적인 교잡육종법에 의한 벼 신품종의 육종에는 후대분리의 고정애 많은 시간과 노력이 소요되고 사용할 수 있는 천연 유전자원이 한정되어있기 때문에 전통적인 교잡육종법만으로는 유전공학적인방법을 이용하여 신품종을 개발하여 특허화 하는 세계적인 흐름을 따라가기 어렵다. 따라서 유전공학적 기법을 이용하여 국제적 경쟁력이 있는 벼 신품종 개발을 위한 기초연구의 저변확대가 필요하다.

- 식물의 양분흡수와 관련된 연구는 재배적 측면의 연구와 식물생리학적 측면의 연구가 오래 전부터 이루어져 왔으나, 최근에는 양분 흡수에 대한 분자수준의 기초연구를 토대로 양분 흡수 관련 유전자 들을 이용하여 작물의 생육과 수량을 증가시키고 극도로 양분이 제한된 조건에서도 생장이 가능한 작물을 육종하기 위한 연구들이 세계적으로 활발히 진행되고 있다.

- 아직 양분흡수 관련 유전자들의 유도기작이나 양분수송 단백질의 성질에 대한 분자생물학적 이해가 부족하여 유전자 조작에 의한 식물체의 양분흡수체계를 변화시켜서 기대하는 만큼의 양분흡수 능력이 향상된 새로운 식물체는 개발이 되지 않고 있다. 그러나 최근에 Arabidopsis의 고친화성 인산 운반체 유전자를 담배 현탁배양 세포에 도입하여 CaMV의 35S promoter를 이용하여 대량발현 시킴으로서 인산 결핍 조건에서 세포의 생장이 증가되었다는 연구결과는 고친화성 인산 운반체 유전자의 유전공학적 응용을 통해 인산 흡수 능력이 향상된 식물체의 개발 가능성을 시사하고 있다.

- 인산이 제한된 자연 조건에서 인산 흡수를 증가시킬 수 있는 주된 단백질로 추측되고 있는 고친화성 인산 운반체 유전자를 이용하여 특히 인산의 함량이 낮은 토양에서도 인산을 효과적으로 흡수하여 정상적인 생육을 할 수 있는 새로운 작물의 개발은 환경친화적 농업의 발달에 크게 기여할 것이다.

- 국내에서는 본 연구팀이 벼를 중심으로 한 인산 흡수 관련 유전자를 탐색하고 있고, 그림과 같이 3 종류의 고친화성 인산 운반체 유전자를 이미 최초로 분리하여 인산흡수 능력이 향상된 식물체 개발을 시도하고 있다. 그러나 국내에서 양분 흡수 관련 유전자의 분리와 응용에 대한 연구는 대단히 미흡한 실정이며, 보다 다양한 양분

흡수 능력이 향상된 식물체의 개발을 위해서는 많은 연구 그룹이 이 분야에 대한 관심을 가져야 하며 보다 체계적인 연구와 지원이 필요하다.

2. 경제 산업적 측면

- 산업화에 따른 도시근교 농지의 감소와 농업 노동력의 부족으로 인한 유휴 농지의 증대는 벼를 중심으로 한 주곡 작물의 생산량 감소로 이어져 식량의 안정적인 공급에 큰 영향을 미치고 있다. 또한 농업 환경오염원 중 비료의 과다 사용으로 인한 토양의 산성화와 염의 집적 등의 토양오염은 작물의 생육에 나쁜 영향을 미칠 뿐 아니라 지표수에 침투하여 수자원의 주 오염원인 부영양화를 초래한다.

- 농업 환경오염은 농업 생산의 질적 저하를 가져올 뿐 만 아니라 환경파괴에 의한 국민건강을 위협하므로 오염원의 제거는 매우 중요한 문제이다. 이러한 문제는 투입되는 화학비료의 양을 줄임으로서 해결할 수 있고, 화학비료를 대체하기 위한 여러 가지 유기질 비료가 개발되어 사용되고 있으나 화학비료를 대체하기에는 아직도 많은 문제점이 있다.

- 따라서 보다 근원적인 문제의 해결을 위해 식물자체의 양분 흡수 능력을 향상시킴으로서 비료의 사용량을 줄일 수 있다면, 농업 환경오염과 토양의 산성화를 방지할 수 있는 획기적인 전환점이 마련 될 것이다.

- 과다한 화학비료의 사용으로 인한 전국토의 대부분의 경작지가 산성화되고 있는 상황에서 환경친화적 영농방법의 일환으로서 인산 흡수 능력이 향상된 새로운 작물의 개발은 인산이 제한된 조건에서도 작물이 정상적인 생육을 할 수 있어 인산 결핍에 의한 작물의 생육 장애를 해결할 수 있고 작물의 수량 증대와 작물 재배 시 다량 투입되는 인산질 비료의 사용량을 줄일 수 있어 생산비를 감소시켜 농가의 소득 증대에 기여할 것이다.

- 인산 흡수 능력이 향상된 작물의 개발은 미국, 독일, 일본, 호주 등의 나라에서 많은 연구가 진행되고 있어 양분 흡수 관련 유전자의 확보와 이를 응용한 작물의 개발이 급속히 이루어지고 있으며, 우리나라에서도 이러한 유전자들을 이용한 새로운 작물의 개발로 국제적인 종자 시장에서 경쟁력을 가져야 한다.

3. 사회 문화적 측면

- 현재 지구상에는 작년에 이미 60억의 인구가 돌파되어 앞으로 식량난이 심각해질 것으로 생각되며, 특히 8억이 넘는 인구가 심각한 기아와 영양 부족으로 고통받고 있으며, 이러한 상황에서도 세계 곡물 재고는 13% 수준으로 떨어져 해마다 곡물 가격이 상승하고 있어 식량의 자원화가 어느 때보다도 필요한 실정이다.

- 미국, 호주 등의 곡물 수출국들은 수출 확대를 위해 수입국들의 수입량을 더욱더 큰 폭으로 늘리기 위한 시장 개방 압력을 가속화하고 있어 이에 국내 농업의 기반이 흔들리고 있는 실정이며, 국내 농업의 경쟁력 강화를 위해 국제적인 경쟁력이 있는 신품종의 개발이 시급하다.

- 우리나라에서 벼농사는 식량의 자급자족의 측면에서 뿐 만 아니라 전 국민의 마음의 고향이며 휴식처인 농촌을 상징하는 가장 환경친화적인 영농법으로 국가적으로 중요한 산업이다. 그러나 급속한 산업화와 농산물 수입시장의 개방에 의한 농촌경제의 파탄은 환경친화적 식량증산의 감소는 물론 고향을 그리는 국민의 정신적 공허함을 야기 시키고 있다.

- 우리나라 곡물 생산은 비교적 소규모로 국가의 경제상태만 고려한 추곡 수매가에 의하여 농민들의 소득이 크게 좌우되는 실정이다. 따라서 새로운 유전자의 확보와 이용을 통한 분자육종법으로 새로운 고품질, 다수확 품종의 개발로 농촌소득을 증가시켜 피폐화 되고 있는 농촌경제의 안정을 도모해야한다.

- 현재 북한의 식량난은 심각한 수준에 이르고 있어 평화적 통일을 지향하기 위해서는 우리의 식량 원조가 절실한 실정이다. 이를 위해서 많은 양의 곡물 생산이 필요하지만 아직은 미흡한 실정이고, 특히 통일 후를 대비한 북한 농업의 발전을 위해서도 새로운 유용 유전자의 확보와 분자육종에 의한 새로운 품종의 개발은 반드시 이루어져야 한다.

- 또한 산업화와 화학비료의 다량 사용으로 인한 토양과 수자원의 오염을 감소시켜서 생태계의 복원과 쾌적한 환경친화적 농업 환경의 조성을 위하여 범국가적인 지원이 필요하다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국내·외 타 연구기관의 연구성과

- 무기이온들의 흡수에 대한 생리·생화학적 기작은 광범위하게 오랫동안 연구되어 왔고, 몇몇 흡수 모델이 제안되었다. Epstein 등에 의해 제안된 인산을 포함한 이온들의 흡수 모델에 의하면 이온의 저농도 상태에서는 고친화성 이온운반체가 작용하고 고농도 상태에서는 저친화성 이온운반체가 작용하여 식물체는 필수이온을 흡수하는 것으로 추측하였다.

- Ozanne는 토양 용액 중의 인산의 저 농도는 자연 생태계에서 식물생장의 제한 인자로서 토양내의 인산의 유효성이 낮은 경우에 있어서 고친화성 인산 운반체는 뿌리에서 인산의 흡수를 담당하는 주된 조절 단백질로 생각되며, 인산의 흡수는 H^+ 의 유입을 동반하고, 인산이 에너지에 의해 조절되는 공동운반 과정에서 수송되어지는 것으로 생각하였으며, 원형질막 내의 H^+ -ATPase에 의해 생성된 양성자에 의해 운반되는 것으로 보고하였다.

- Barber 등은 135개 토양의 포화 추출물에서 인산을 측정된 결과 인산의 농도가 대다수의 토양 시료에서 $0.25\mu M$ - $0.65\mu M$ 사이인 것을 발견하였고, 자연상태 하에서 용해성 인산의 수준은 고친화성 인산 운반체의 $Km(5\mu M)$ 보다 더 낮은 것으로 토양에서 인산의 유효성은 pH와 같은 요인에 크게 영향을 받는다고 보고하였다.

- 인산 수송에 대한 분자생물학적 연구는 Bun-Ya등에 의해 효모에서 처음으로 고친화성 인산운반체 유전자(PH084)가 분리되었고 생물학적 기능이 규명되었다. 그후 이 유전자가 결손된 효모 돌연변이의 complementation을 이용하여 식물체에서 상보성에 의해 tomato, Arabidopsis, potato 등 다양한 모델 식물체에서 고친화성 인산운반체 유전자들이 분리되어 분자생물학 및 생화학적인 기초연구가 시도되고 있다. 그러나 아직 벼에서의 인산 흡수 관련 유전자들의 분리 및 농업적 응용이 시도된 적은 없다.

- Phosphatase의 분비 능력을 증가시키거나 citrate, malate 등 유기산의 분비를 촉진하여 근권 토양에서 인산의 유효성을 증가시킨다는 보고 이후 담배, Arabidopsis 등의 모델식물체와 박테리아에서 acidic phosphatase, citrate synthase 유전자들이 분리되었고 농업적 응용이 시도되고 있다.

- Arabidopsis의 acidic phosphatase가 담배와 carrot suspension cell line에 대량발현 될 경우 phosphate 이온이 결핍된 배지에서 성장이 촉진됨이 보고되었다. 또한 Pseudomonas aeruginosa의 citrate synthase의 유전자가 대량발현 되는 담배 형질전환체는 산성토양의 대표적인 오염원인 Al 이온에 저항성을 가지며 Al 이온에 고정화된 phosphate를 분리하여 토양의 유효 인산 농도를 증기시키는 것으로 보고되었다.

2. 본 연구사업팀의 연구성과

- 본인은 최초로 식물체의 고친화성 인산 운반체 유전자(AtPT1, AtPT2)를 분리한 Raghothama 교수 (Purdue University)의 연구실에서 2년간의 연수기간 동안 이들 유전자들은 인산이 결핍된 후 3-6 시간만에 급속히 발현이 유도됨과 이러한 유전자 발현 유도에 대한 생물학적, 환경적 영향을 조사하였다.

- 이미 언급한 바와 같이 본 연구팀은 3 종류의 고친화성 인산 운반체 유전자를 벼에서 분리하였다. 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자들은 다른 모델식물체에서 분리된 고친화성 인산 운반체 유전자들과 전체적으로 매우 유사하나 진화학적 유연관계를 비교해보면 외떡잎식물인 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자들은 쌍떡잎식물의 고친화성 인산 운반체 유전자들과는 다른 군으로 분류된다.

- 현재 인산 결핍시 이들 유전자들의 유도성과 조직특이성을 조사중이다. OsPT의 경우 이미 full-length cDNA를 분리하여 벼에서 대량발현을 위한 construct를 제조중이다. 또한 genomic library를 screen하여 적어도 10 종류 이상의 고친화성 인산 운반체의 genomic clone을 분리하여 연구 중이다

3. 현 기술상태의 취약성

- 종래의 연구경향은 주로 재배, 생리학을 중심으로 하는 인산결핍 스트레스에 관한 연구였다. 1990년대 들면서 식물 영양원소 결핍에 대한 식물체의 반응을 분자수준

에서 이해하고자 하는 새로운 경향이 나타났으며 몇 개의 관련 유전자들이 분리되어 지기 시작했다.

- 그러나 분리된 대부분의 유전자들의 생물학적 기능에 대해서는 아직 많이 알려지지 않고 있다. 특히 영양결핍을 극복하기 위한 식물세포의 반응을 조절하는 신호전달 체계에 대한 연구는 전무하다.

- 다만 영양원소 수송에 대한 연구가 잘 되어있는 효모를 이용하여 인산을 비롯한 몇 개의 영양원소 수송체들의 유전자들이 식물체로부터 분리되어 Arabidopsis, 담배 등의 모델식물체를 이용하여 그 응용 가능성에 대해 연구하고 있다. 그러나 아직까지 경제성 있는 작물과 목분류에 광범위하게 적용하지 못하고 있다.

- 따라서 영양결핍 스트레스에 저항성 있는 식물체를 개발하기 위하여 먼저 사용 가능한 유전자 확보를 위한 다양한 연구방법이 필요하다.

제 2 절 앞으로의 전망

- 본 연구에서 얻게 되는 고친화성 인산 운반체 유전자를 비롯한 인산 결핍 시 특이적으로 발현되는 유전자들의 기능이 잘 밝혀진다면 벼를 비롯한 외떡잎 식물의 새로운 품종육종을 위한 중요한 유전자원을 확보할 수 있을 것으로 생각된다.

- 인산 운반체와 더불어 토양 중의 인산의 유효도를 높일 수 있는 phosphatase, citrate synthase 유전자들의 연구를 병행함으로써 작물의 인산 흡수 능력을 극대화시킬 수 있는 연구가 지속적으로 이루어질 것이다.

- 생리학적 연구결과에 기초를 둔 분자생물학적 접근과 식물 형질전환법의 접합으로 인산 흡수 능력이 향상된 식물체의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

- 작물에 있어서 인산 흡수 운반체에 대한 분자생물학적 이해를 증대시켜 작물의 인산 흡수 기작에 대한 이해의 폭을 넓일 수 있어 작물의 다른 영양원소 흡수 관련 유전자의 탐색과 확보를 보다 효율적으로 할 수 있다.

- 인산 흡수 관련 유전자들을 이용한 신품종을 개발하여 종자 수입의 대체 효과 및 수출 시장의 확대에 큰 도움이 될 것이다. 특히 아프리카와 라틴아메리카 등의 인산 결핍이 심화되고 있는 나라에서 그 이용성은 높을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구개발의 목표 및 내용

본 연구개발의 최종 목표는 농작물의 인산 흡수 능력을 향상시킬 수 있는 유전자를 분자생물학, 생화학 및 유전학적인 방법을 이용하여 확보하고, 작용기작을 규명하여 최종적으로는 이들 유전자를 벼에 형질전환시켜 인산 흡수 능력이 증대된 새로운 벼 형질전환체를 개발하는데 있다. 본 연구의 성공적인 수행을 위해 다음의 4가지 세부 연구목표를 제시한다.

<세부목표>

1. 인산 결핍에 의해 특이적으로 발현이 유도되는 벼의 유전자 선별
2. 벼의 고친화성 인산 운반체의 모든 gene family 분리와 기능분석
3. 인산 흡수 능력이 증대된 벼 형질전환체의 개발

1 연구개발 방법

가. 인산 결핍에 의해 특이적으로 발현이 유도되는 벼의 유전자 선별

- 본 연구팀은 뿌리에서 인산 결핍에 의해 특이적으로 발현이 유도되는 벼의 유전자들을 subtraction cloning 또는 SSH 방법을 이용하여 확보할 것이며, 이러한 방법으로 확보된 새로운 벼 유전자들의 full length cDNA의 확보와 아직 국내에서는 연구가 전무한 벼 뿌리 특이적인 분자생리·생물학적 연구를 위해 벼 뿌리를 이용한 cDNA library를 만들 었다.

- 특히 본 연구팀이 이미 분리한 벼의 고친화성 인산 운반체의 모든 gene family와 근권의 인산효율성을 증가시키는 acidic phosphatase, citrate synthase 유전자들을 우선순위로 cross hybridization 방법을 이용하여 벼 뿌리 cDNA library에서 분리·확보 하였다.

나. 벼의 근권 토양의 유효인산 농도를 증가시키기 위한 기초연구

- 분리한 벼의 고친화성 인산 운반체의 모든 gene family들의 인산 결핍 특이적 유도성, 조직특이성 등을 northern blot와 GUS report system을 이용하여 확인하고 이들 유전자들의 기능을 검증하여 응용성이 높은 고친화성 인산 운반체 유전자들을 최종 선별했다.

- 일반 재배벼 품종에 최종 선별된 인산 흡수 관련 유전자들 (고친화성 인산 운반체, acidic phosphatase, citrate synthase)의 full length cDNA와 genomic 유전자들을 도입하기 위한 construct를 election marker가 다른 다양한 binary vector를 이용하여 작성하였다.

다. 인산 흡수 능력이 증대된 벼 형질전환체의 개발

- 인산 흡수 능력이 향상된 식물체의 개발은 두 가지 방법으로 접근이 가능하며, 첫째는 뿌리에 고친화성 인산 운반체의 수를 증가시킴으로서 인산의 흡수량을 증가시키는 것이고, 둘째는 phosphatase의 분비 능력을 증가시키거나 유기산의 분비를 촉진하여 근권 토양에서 인산의 유효성을 증가시키는 것이다.

- 따라서 고친화성 인산 운반체 유전자, acidic phosphatase 유전자, citrate synthase 유전자들이 각각 강화된 벼 형질전환체를 먼저 개발하여 기내와 포장실험을 통한 인산흡수력, 유전적 안정성, 생산성 등을 적어도 T2 세대까지 조사를 진행 중에 있다.

- 또한 인산흡수 관련 유전자들의 synergy 효과를 조사하기 위해 전통적인 육종법을 이용하여 고친화성 인산 운반체 유전자, acidic phosphatase 유전자, citrate synthase 유전자들이 한 식물체에서 모두 도입된 벼 형질전환체를 개발하여 인산흡수력 및 생산성을 단일 유전자만이 도입된 품종과 비교 연구를 수행 중에 있다.

- 최종적으로 토양 속에 고정되어 존재하는 무효인산을 식물이 사용 가능한 유효인산으로 변화시켜 인산의 이용효율을 높일 수 있고 세포내로 효율적으로 전이시킬 수 있는 새로운 벼 형질전환체의 개발을 목적으로 한다.

2. 연구내용

가. 인산 결핍에 의해 특이적으로 발현이 유도되는 벼의 유전자들 선별

인산 결핍에 의해 특이적으로 발현이 유도되는 벼의 유전자들을 subtraction cloning 또는 SSH 방법을 이용하여 확보하였다. 간략히 실험방법을 살펴보면 다음과 같다. 인산이 결핍된 또는 충분한 배양액에서 1 주일 동안 배양한 rice calli로부터 total RNA를 각각 분리하고 cDNA를 제조하였다. cDNA들은 high stringent 조건에서 hybridization하여서 인산이 결핍된 또는 충분한 조건에서 모두 발현되는 유전자들을 제거하고 인산이 결핍된 조건에서만 특이적으로 발현되는 유전자들만을 다시 선택적으로 PCR 법으로 증폭시켜서 E. coli cloning vector에 cloning 하여 염기서열을 분석하였다. 또한 이러한 방법으로 확보된 새로운 벼 유전자들의 full length cDNA의 확보와 아직 국내에서는 연구가 전무한 벼 뿌리 특이적인 분자생리·생물학적 연구를 위해서 벼 뿌리를 이용한 cDNA library를 만들었다.

나. 토양의 인산 유효도 증대와 관련한 유전자들의 클로닝

근권의 유용인산 농도를 증가시키는 것으로 알려진 acidic phosphatase, citrate synthase 유전자들을 Arabidopsis purple acid phosphatase 유전자를 probe로 이용한 cross hybridization 방법으로 벼 뿌리 cDNA library에서 분리·확보하였다

다. 벼의 고친화성 인산 운반체의 모든 유전자군의 분리

이미 분리한 벼의 고친화성 인산운반체(OsPT1) 유전자를 probe로 이용하여 벼의 전체 유전체에 존재하는 모든 고친화성 인산 운반체 유전자들의 genomic clone을 분리하고 이들 10 종의 OsPT 유전자들을 비교 분석하였다.

라. 토양의 유효인산 농도에 따른 벼의 생육변화 조사

인산 결핍조건에 대한 벼의 생리적 연구, 특히 벼의 생육과 수량에 미치는 인산의 영향을 보다 체계적으로 분석하기 위하여 쉽게 유효인산 농도를 조절하고 지상부와 지하부의 발육상태를 쉽게 관찰할 수 있는 Hyponic 방법을 확립하였다.

마. 벼 형질전환 시스템의 확립

형질전환 효율이 좋은 동진벼의 종피를 제거한 종자를 70% ethanol에 10분간, 6% sodium hypochloride에 30분간 소독한 후 distilled water로 3-4회 wash 한 다음 소독된 종자를 N₆D callus induction medium에서 30°C, light 조건에서 3주간 배양하여 callus를 유도했다.

*Agrobacterium tumefaciens*는 각 균주의 저항성 항생제가 첨가된 YEP liquid medium에서 28°C, 암조건으로 하룻밤동안 배양한 후 AAM medium에서 OD_{600nm}=1.0으로 *Agrobacterium tumefaciens* suspension solution을 만들어 3주차 calli를 3분정도 infection시킨 후 멸균지로 물기를 약간 제거 한후 2N6-AS co-cultivation medium에 옮겨 3일간 배양했다.

co-cultivation후 cefotaxime 200mg/L와 carbenicillin 500mg/L가 포함된 distilled water로 3-4에 씻어낸 후 멸균지로 물기를 약간 제거한 뒤 selection media에 옮겨 30°C · 광조건으로 2주간 배양했다. 2 주 후에 selection media에서 생존하는 calli만을 선별해 regeneration I media에 옮겨 shooting이 일어나면 regeneration II media에 옮겨 transgenic plant를 선발했다.

바. 인산 운반체 유전자들의 벼 형질전환을 위한 constructs 제조

분리한 10 종의 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자들의 대량발현을 위한 construct 를 제조하는 한편, 이미 분리하고 염기서열을 밝힌 OsPT5 와 OsPT6의 genomic DNA(5-6 kbp)를 binary vector pCambia 1300에 cloning 하였다.

제 2절 연구결과

1. 인산 운반체 유전자들의 클로닝 및 기능분석

가. 벼 고친화성 인산운반체 cDNA의 클로닝 및 특성분석

인산 운반체 유전자를 확보하기 위해 벼의 cDNA library를 구축하고 이미 분리한 OsPT1 cDNA를 probe로 사용한 plaque hybridization 방법을 이용하여 다수의 고친화성 인산 운반체 유전자와 강하게 hybridization 하는 cDNA 클론을 얻었고, DNA를 분리한 후 염기서열을 분석하였다. 이들 클론과 표 1의 primer를 사용하여 PCR을 수행하였고 산물들은 pBluescript에 subcloning하고 sequencing을 하여 염기서열을 확인하였다. PCR cloning을 통해 최종적으로 10 개의 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자

들을 분리하였다(표 2). 이들 유전자들을 OsPT1에서 OsPT10으로 각각 명명하였다. 현재까지 이용가능한 rice genome database을 분석한 결과에 의하면, 벼는 다른 식물체(Arabidopsis 9 개 AtPTs)와 마찬가지로 약 10 개 정도의 고친화성 인산 운반체를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구단은 벼에 존재하는 전체 고친화성 인산 운반체 유전자들을 분리, 확보한 것으로 생각된다. 특히 OsPT1 유전자는 gene bank에 등록을 완료하여 지적 소유권을 확보한 상태이고, OsPT4는 partial sequencing를 EST로 등록하여 본 연구팀이 주도권을 확보하였다(그림 1).

Table 1. Sequence of forward and reverse primers of rice phosphate transporter genes coding region.

	Forward Primer	Reverse Primer
OsPT1	ATTCTAGACATGGCCGGCGAAGCTCAAAGG	TTTCTAGATTGCCCGGGGATCAAGCT
OsPT2	CGTCTAGACATGGCCGGCAAGGAGCAAGC	AGTCTAGAAGTACGCCGTCTGCGGCCGC
OsPT3	AATCTAGACATGGCGGGATCCAGCTC	TTTCTAGAATCACGCTTGGCCGATCC
OsPT4	TGTCTAGACATGGCGGGAGGGCAGCTC	GCTCTAGAATTACTTCGGGTAGGCCGCC
OsPT5	TCTCTAGAATCATCGGAGATGGCGGACG	ATTCTAGAATCATGCGTGCATGGATGTC
OsPT6	GCTCTAGACAATGGCGGACGGGCAGCTC	TCTCTAGAGCTACGCCGTGCTCCTCG
OsPT7	CATCTAGAAACAAACAATTAAGCTGGC	OCTCTAGACGACAGCGCTACAGTACAG
OsPT8	GTTCTAGACATGGCGGGCGATCAGATGC	ACTCTAGAATCACGGCTGGCCGACCTCG
OsPT9	GGTCTAGACATGGTTCAGGATCCAAAGG	TATCTAGATTACTCGGACTGTCCGCTG
OsPT10	CGTCTAGACATGGGAAGGCAGGACCAGC	CCTCTAGAATTACACCATTCTAACTCCG

Table 2. Amino acid identity (%) among OsPTs and chromosome location.

	OsPT1	OsPT2	OsPT3	OsPT4	OsPT5	OsPT6	OsPT7	OsPT8	OsPT9	OsPT10	OsPT11	OsPT12	OsPT13	CH.NO
OsPT1	100	77.6	70.6	73.0	55.9	73.1	71.2	71.0	87.1	72.3	46.6	47.2	58.9	4
OsPT2		100	73.8	74.7	56.6	76.2	74.5	74.2	74.1	81.2	47.6	48.0	54.7	10
OsPT3			100	84.1	57.1	81.9	70.9	70.8	66.8	71.2	47.0	47.8	53.9	3
OsPT4				100	56.9	87.1	70.5	70.0	68.7	70.1	48.1	47.7	55.1	3
OsPT5					100	36.9	39.9	45.9	35.0	40.1	43.6	43.0	47.7	1
OsPT6						100	70.9	71.1	70.1	72.0	48.8	48.8	54.9	10
OsPT7							100	76.0	69.7	72.8	46.4	46.8	54.4	8
OsPT8								100	69.8	70.1	47.5	48.2	52.7	3
OsPT9									100	70.7	47.5	47.9	57.1	4
OsPT10										100	46.4	46.6	54.7	3
OsPT11											100	84.8	42.0	6
OsPT12												100	44.0	6
OsPT13													100	4

이들 유전자들의 유연 관계 분석을 한 결과, 3개의 벼 인산 운반체 유전자들은 같은 그룹으로 분류되었고, Arabidopsis와 Medicago, 담배, 감자와 토마토 등의 식물 인산 운반체 유전자가 같은 그룹으로 분류되었다. 이러한 결과는 외떡잎식물인 벼와 쌍떡잎식물인 다른 식물간의 형태적 차이에서 기인된 것으로서, 벼 인산 운반체 유전자의 연구는 외떡잎식물의 인산 운반체 유전자의 연구를 위한 많은 정보를 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 벼 인산 운반체 유전자의 구조를 분석한 결과, 12개의 spanning domain을 가지고 있는 전형적인 원형질막 단백질임을 알 수 있었고, membrane-spanning region은 다른 식물들의 인산 운반체 유전자와 매우 유사한 형태를 보였다. N-과 C-terminal은 원형질막의 안쪽인 세포질에 위치할 것으로 생각되며, protein kinase C, casein kinase II-mediated phosphorylation 및 N-linked glycosylation site 등의 몇몇 아미노산 도메인들은 인산 운반체 유전자들 간에 매우 높게 conserve되어 있었다(그림 4).

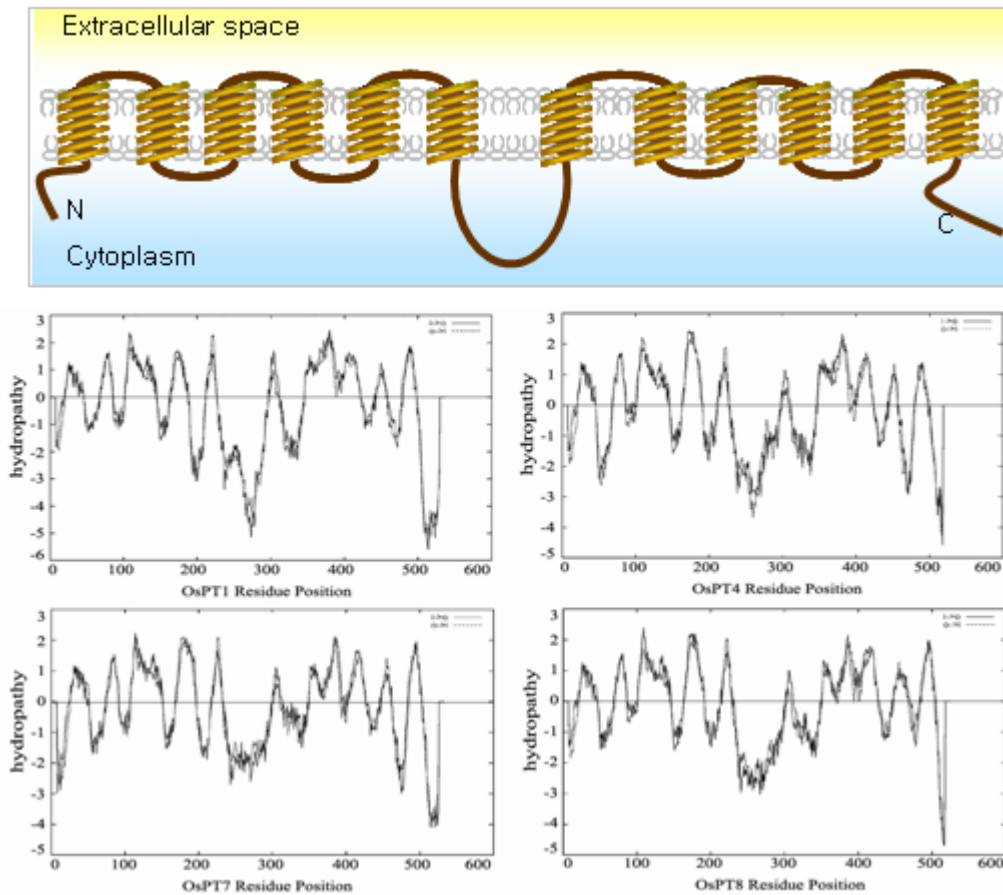


Fig. 2. Structural conservation of OsPT proteins in rice. The topology of OsPTs. Phosphate transporters typically have 12 membrane spanning domains arranged in a 6+6 configuration. The long central loop is predicted to be intracellular A model of Plant Pi transporter containing 12 membrane-spanning domain (up), Hydropobicity profiles of OsPT1, OSPT4, OsPT7 and OsPT8 using a Kyte-Doolittle plot (down).

이미 언급한 바와 같이 본 연구팀은 10 종류의 고친화성 인산 운반체 유전자 (OsPT1 - OsPT10)를 벼에서 분리하였다. 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자들은 다른 모델식물체에서 분리된 고친화성 인산 운반체 유전자들과 전체적으로 매우 유사하나 진화학적 유연관계를 비교해보면 외떡잎식물인 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자들은 쌍떡잎식물의 고친화성 인산 운반체 유전자들과는 다른 군으로 분류 된다 (그림 4).

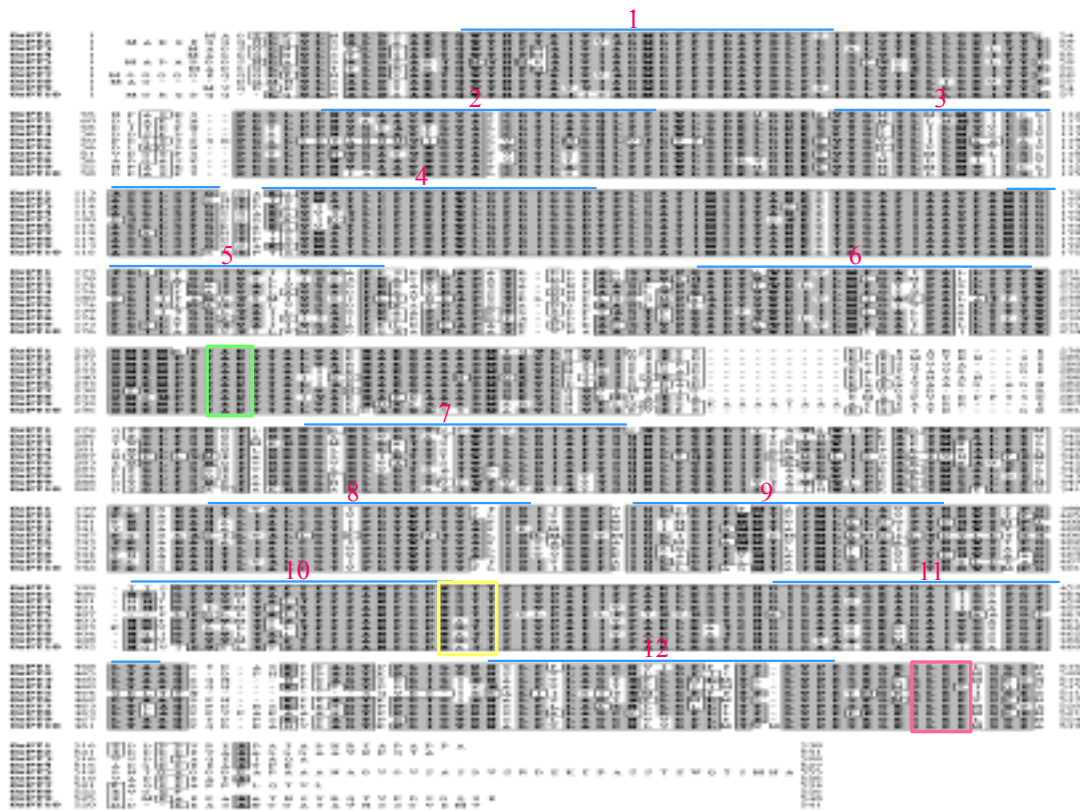


Fig. 3. The amino acid sequence alignment of *OsPT* genes using the CRUSTALW program. Black shading and grey shading indicate identical amino acid residue and similar amino acid residue, respectively. Bars above the alignments indicate the positions of the 12 membrane-spanning helices in *OsPT* genes predicted. The red boxed sequence are consensus sites for phosphorylation by casein kinase II and blue boxed sequences are sites for N-linked glycosylation green boxed sequences are sites for phosphorylation by protein kinase C.

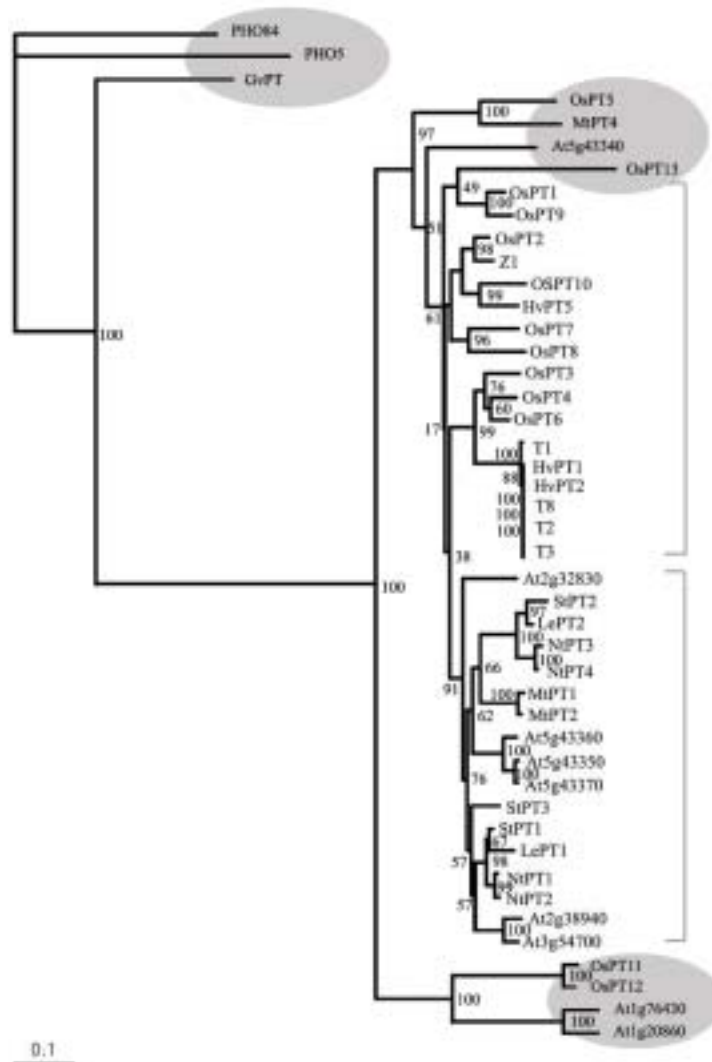


Fig. 4. Phylogenetic relationship OsPTs with other phosphate transporter. Five main groups of Pi transporters are inferred, as they are supported unrooted phylogenetic tree diagram. The first group contains Saccharomyces, Neurospora and Glomus transporters. The second group contains the phosphate transporter induced by mycorrhizal symbiosis. The third group contains the majority of proteins from the monocotyledonous plant species. The fourth group includes dicotyledonous transporters. The last group contains distantly related to other plant phosphate

transporter protein. The protein names are followed by SwissPort (SP) or GeneBank (GB) accession on numbers: AT3g54700, At2g38940, At1g76430, At1g20860, AT5g43340, AT5g43350 (=AtPT1), AT5g43360, AT5g43370, At2g32830 from *Arabidopsis thaliana* LePT1 (024029, SP), LePT2 (022549, SP) from *Lycopersicon esculentum* MtPT (022301, SP), MtPT2 (022302, SP) from *Medicago truncatula* StPT1 (Q43650, SP), StPT2 (Q41479, SP), StPt3 (AJ318822, GB) from *Solanum tuberosum*: NtPT1 (AB020061, GB), NtPT2 (AB042950, GB), NtTP3 (AB042951, GB), NtPT4 (AB042956, GB) from *Nicotiana tabacum* Z1 from *Zea mays*, T1, T2, T3 and T4 from *Triticum aestivum*, PHO84(P25297, SP) from *Saccharomyces cerevisiae*, PHO-5 (L36127,GB) from *Neurospora crassa*, GvPT (U38650,GB) from *Glomus versiforme*. HvPT1 (AY188394), HvPT2 (AY187020) and HvPT5 (AY187021) from *Hordeum vulgare*.

나. 벼 고친화성 인산운반체 유전자의 발현 분석

벼 배양세포를 사용하여 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자들의 발현양상을 조사하였다. RNA는 배양세포로부터 TRIzol reagent를 이용하여 추출하였고, 1.2% gel에 전기영동한 후 ³²P로 표지된 probe를 이용하여 Northern blot을 수행하였다. 인산 운반체 유전자는 유전자들 간에 유사성이 매우 높기 때문에 다양성을 보이는 특정 영역을 PCR하여 prob로 사용하였고, 각 유전자들의 PCR을 위해 사용된 primer는 표 3과 같다. 먼저 인산 결핍에 의한 영향을 조사하기 위해서 각각 인산 농도가 다른 배양액에서 다양한 시간동안 배양한 배양세포로부터 전체 RNA를 분리하고 Northern blot analysis를 수행하였다.

10종의 고친화성 인산 운반체 유전자들 중에서 저농도의 인산 토양으로부터 인산 흡수에 중요한 기능을 수행하며 농업적으로 유용한 유전자를 선별하기 위해서 벼 배양세포를 사용하여 이들 유전자들의 발현양상을 조사하였다. 먼저 인산이 완전히 결핍된 배지(P-, 0 mM)와 충분한 인산이 있는 배지(P+, 2 mM)에서 배양세포를 3일간 배양한 후, 전체 RNA를 분리하고 Northern blot analysis를 수행하였다. OsPT1, OsPT7, OsPT8 은 인산 결핍조건에서 급격하게 발현량이 증가하였으며, OsPT4는 인산 농도와는 관계없이 항상 높은 발현량을 보였다. 그러나 OsPT3, OsPT6, OsPT9, OsPT10은 인산 농도와는 관계없이 거의 발현이 되지 않았다(그림 5). OsPT5는 인산 농도에 대해서는 발현량의 차이가 거의 없으나, 토양에서 식물체의 뿌리에 공생하며 식물체에 인산을 공급하는 mycorrhiza의 감염에 의해 그 발현량이 증가한다고 보고되고 있다. 이러한 특이적 기능성은 농업적으로 매우 유용할 것으로 생각된다.

Table 3. Sequence of forward and reverse primers to designed for the 3'UTR of all phosphate transporters genes.

	Forward Primer	Reverse Primer
OsPT1	TTCACGTTCTGGTGGCGGA	TAATCTAAGTGGCATTTATA
OsPT2	GCAGACGGCGTAGTGTATGA	AAATTAGTAGTGFACTACTC
OsPT3	COGGAGTCCAAGGGCTTGTC	TATCAGTTGCAGGGAAAGTT
OsPT4	GTCGCTCGAGGTTATCTCGC	CGGTTCTTTCAAATCCAGGG
OsPT5	CGAGGAGATCTCCGGCGA GG	CAAGCTAGCATCTGGCAATT
OsPT6	TCGCGACGA CGA GGA GCGG	AATACAATCAAATCCTCACA
OsPT7	COGGCATCGCGTCCGCAA	GTGGATAGCCAGGCCAGTTA
OsPT8	GCAAAGTCCCTCGAGGAGATG	CAGAATCAGCATGAACTCTA
OsPT9	CCTGACAGCGGACAGTCCGA	GGAGCGTTTAAAGTTTATCT
OsPT10	ATCGAAAGGGAAGTCGCTGG	AAGTTCTACGAAAATTAAGG

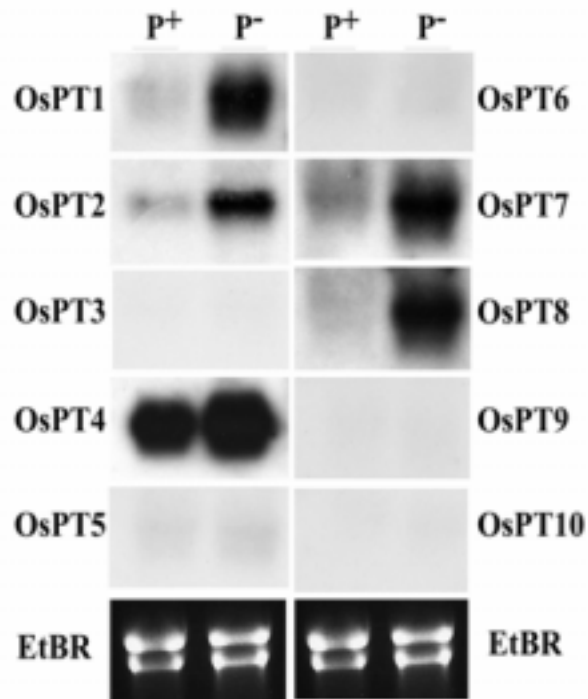


Fig. 5. Northern analysis of *OsPT* genes responsiveness to phosphate starvation.

Total RNA from callus suspension cell of rice seeds grown in a solution containing 1mM (P+) or no (P-) phosphate was hybridized with labeled specific probes of each *OsPT* genes.

인산 농도에 대한 영향을 조사하기 위해서 각각 인산 농도가 다른 배양액에서 3일 동안 배양한 배양세포로부터 전체 RNA를 분리하고 Northern blot analysis를 수행하였다. *OsPT1*, *OsPT7*, *OsPT8*은 25 μ M 이하에서 발현양이 급격하게 증가되었고 1mM 이상으로 인산이 첨가되면 발현이 억제되는 양상을 보였다.

저농도의 인산 조건에서 발현속도를 조사하기 위해서 인산 농도가 25 μ M인 배양액에서 다양한 시간동안 배양한 배양세포로부터 전체 RNA를 분리하고 Northern blot analysis를 수행하였다. 처리 2시간부터 발현량이 급격히 증가되는 것으로 보아, *OsPT1*, *OsPT7*, *OsPT8*은 토양의 유효인산 농도가 낮아지면 초기에 그 발현량이 증가하여 식물체의 인산 흡수율을 향상시킬 것으로 생각되며 앞으로 응용가능성이 높을 것으로 생각된다(그림 6).

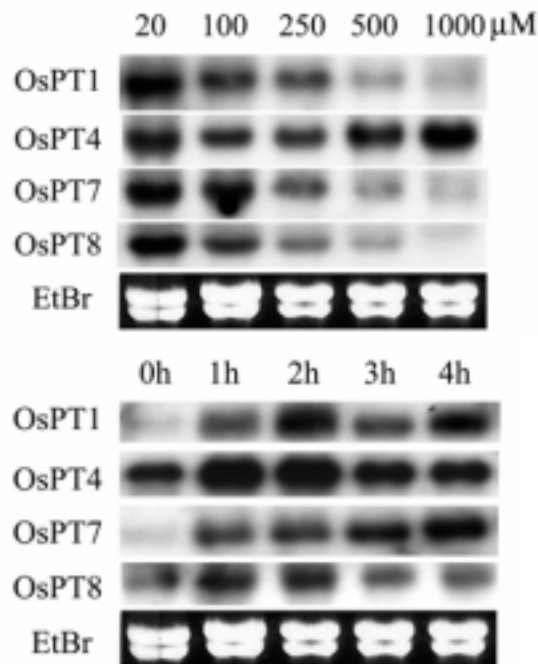


Fig. 6. Expressions of *OsPT* genes are various in responses to phosphate starvation. A. Effect of different concentration of Pi on the expression of *OsPT* genes. Total RNA

from callus suspension cell of rice seeds grown in a solution containing the indicated micromolar concentration of Pi 5d. **B.** Expression of *OsPT* genes transcripts during Pi starvation. Total RNA from callus suspension cell of rice seeds grown in a solution containing 25 μ M Pi for indicated periods.

또한 인산 결핍이라는 스트레스를 준 후, 인산이 첨가된 배양액에 옮겨 계속 배양하면 증가되었던 발현양은 다시 감소하였다. 이러한 결과는 *OsPT1*, *OsPT7*, *OsPT8*는 벼가 인산 결핍환경에 직면하면 발현하여 세포의 인산흡수력을 증가시킬 것으로 생각되며 앞으로 응용가능성이 높을 것으로 생각된다. *OsPT4*는 인산 농도와는 무관하게 항상 일정한 양이 발현되는 것으로 보아 basal level의 인산흡수에 관여 할 것으로 생각된다.

다. 벼 고친화성 인산운반체 유전자가 도입된 형질전환 애기장대를 이용한 기능분석

외떡잎식물인 벼 고친화성 인산 운반체 유전자가 쌍떡잎식물에 도입되어 정상적인 발현을 하는지를 조사하고, 인산 고정화가 농토양에 비해 심하게 일어나는 발작물의 인산 흡수 능력을 제고시키기 위해서 이들 유전자를 발작물에도 응용이 가능한 가를 조사하기 위해서 먼저 애기장대에 infiltration법으로 형질전환하고, hygromycin을 함유한 B5 배지에서 T1 식물체를 선발하여 형질전환체의 생육정도를 조사하였다. *OsPT4* 유전자가 형질전환된 식물체의 경우 대조구에 비해 15% 정도 생육이 증가되었고, 특히 뿌리의 발달이 좋았다. 유전자의 발현 정도도 대조구에 비해 생육이 왕성한 T3 line이 발현량이 가장 높았다. *OsPT8* 유전자가 도입된 형질전환체의 경우 대조구에 비해 40% 정도 생육이 좋았고, 대조구에 비해 생육이 가장 좋았던 T4 line이 유전자의 발현 정도가 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 형질전환체가 인산이 결핍된 조건에서 모본 식물체 보다 효율적으로 인산을 흡수하여 생육이 좋았던 것으로 생각된다. 그리고 *OsPT4*와 *OsPT8* 유전자가 도입된 형질전환체와 대조구를 35 μ M농도의 인산 결핍조건에 처리하여 시간의 경과에 따른 유전자의 발현양상을 조사한 결과 *OsPT4*와 *OsPT8* 유전자가 도입된 애기장대의 형질전환체는 인산 결핍에 의해 발현되는 *AtPT1* 유전자의 발현 정도가 대조구에 비해 훨씬 낮게 나타났다. 이러한 결과는 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자가 애기장대에서 기능을 한 결과 애기장대가 인산의 결핍을 덜 느끼는 것으로 생각되며, 외떡잎식물인 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자를 쌍떡잎식물에 도입하여 응용이 가능할 것으로 생각된다. 이러한 결과는 식물체 내에서 인산 결핍정도에 따라 발현이 증가하는 분자지표 (*AtPT1*)를 이용하여 검증되었다 (그림 7, 8, 9).

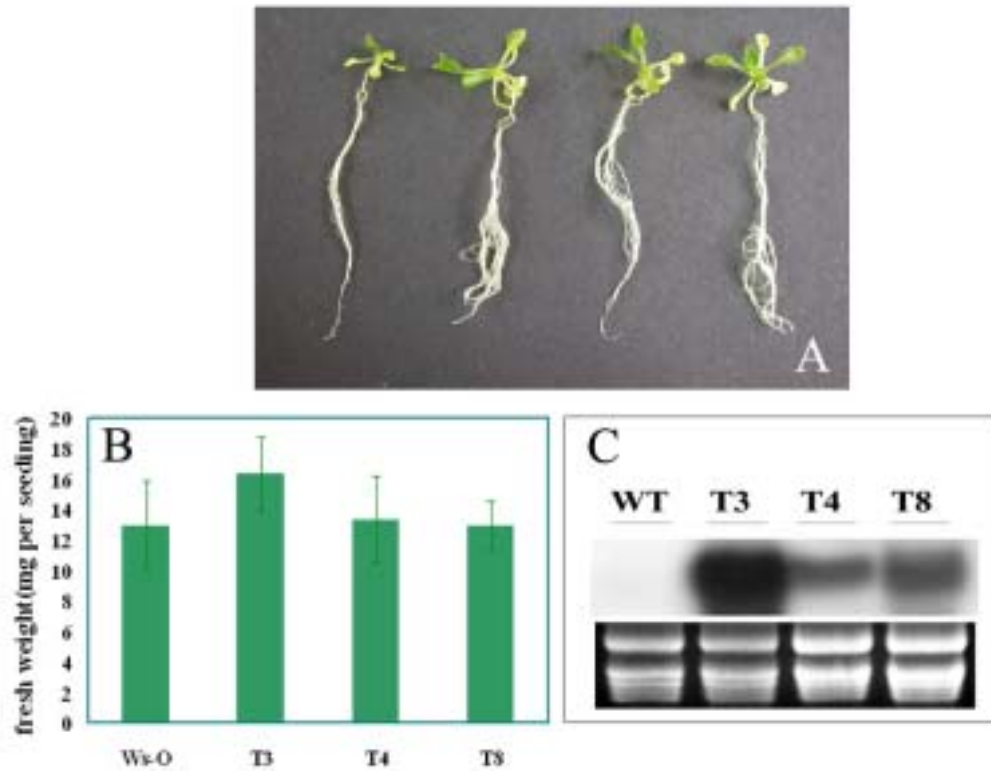


Fig. 7. Effect of *OsPT4* on the phenotypes of wild-type (Ws-0) and transgenic lines. **A.** Phenotype of the *OsPT4* overexpression lines and wild-type plants grown in the Pi limiting condition for 4 weeks. **B.** Effect of overexpression of *OsPT4* was indicated by measuring the total wet-weight (mg). Error bar indicated as SD. **C.** Levels of expression of the *OsPT4* genes in the transgenic. 10 μ g of total RNA was loaded per line. The blot was probed with the *OsPT4* insert.

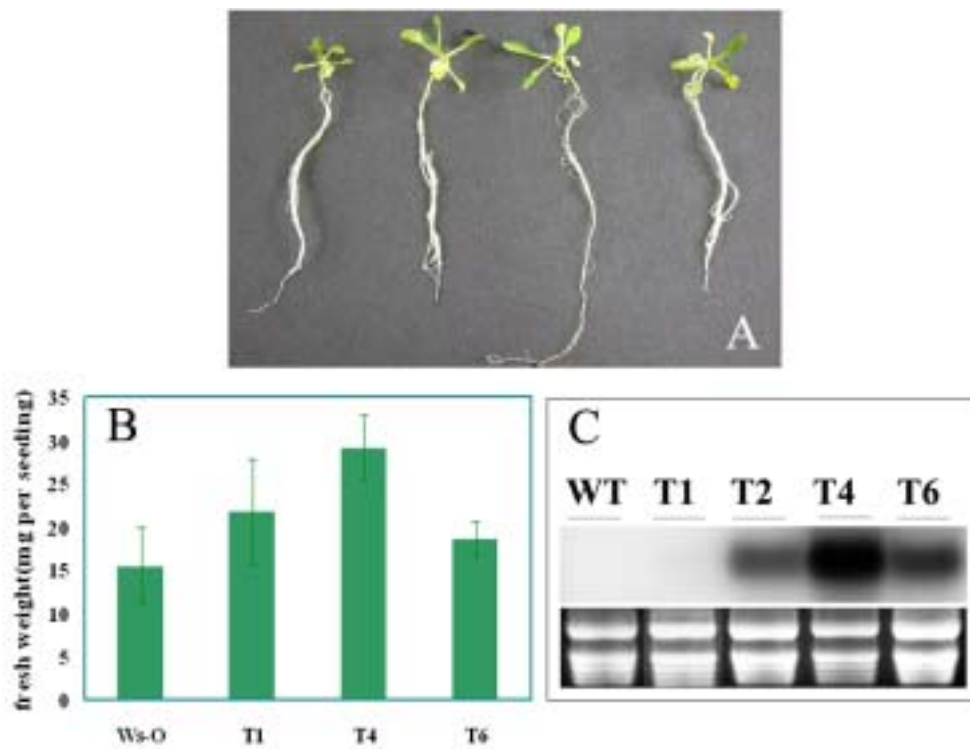


Fig. 8. Effect of *OsPT8* on the phenotypes of wild-type (Ws-0) and transgenic lines. **A.** Phenotype of the *OsPT8* overexpression lines and wild-type plants grown in the Pi limiting condition for 4 weeks. **B.** Effect of overexpression of *OsPT8* was indicated by measuring the total wet-weight (mg). Error bar indicated as SD. **C.** Levels of expression of the *OsPT8* genes in the transgenic. 10 μ g of total RNA was loaded per line. The blot was probed with the *OsPT8* insert.

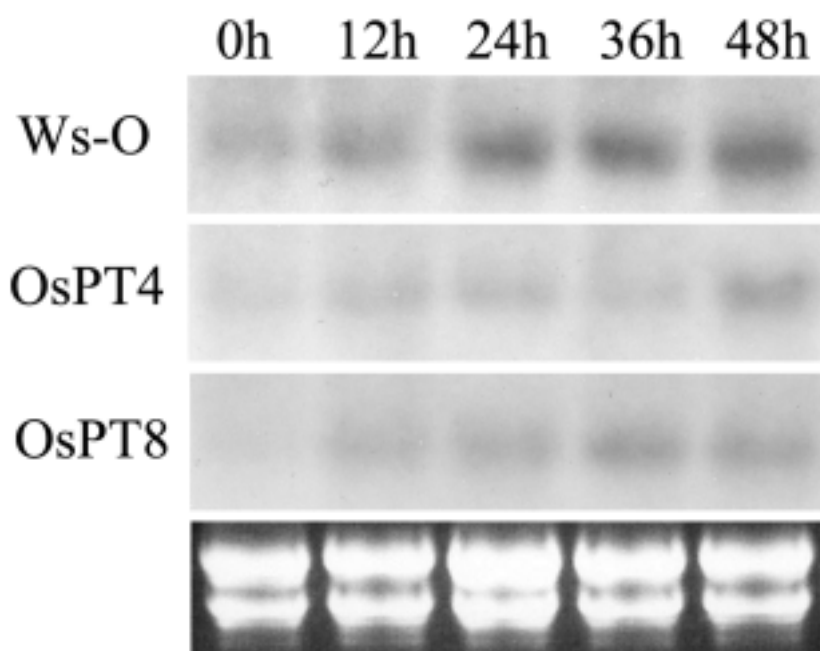


Fig. 9. Decrease Pi starvation-induced gene (*AtPT1*) expression with overexpressed *OsPT* genes. Total RNA from *Arabidopsis* grown in a solution containing 35 μ M Pi for indicated periods.

2. 벼의 형질전환 시스템 확립 및 형질전환체의 분석

가. 토양의 유효인산 농도에 따른 벼의 생육변화

인산 결핍 조건이 벼의 생육 및 수량에 미치는 영향을 조사하기 위한 수경재배 시스템을 만들었고(그림 10A), 벼의 배양액은 1/2 Hoagland's 용액을 사용하였다. 인산의 처리 농도는 0, 5, 50, 250 μ M의 4가지 농도에서 벼를 재배하였다. 벼의 수경재배를 위해 법씨를 질석에 과종하여 3.5엽기까지 키운 후 수경 베드로 이양하였고, 식물체를 펄라이트에 심고 담액순환식 수경재배를 하였다. 인산결핍 조건에 따른 뿌리의 변화를 조사한 결과(그림 10B), 처리 후 20일에 인산결핍 조건에서 자란 뿌리의 경우 정상 처리구에 비해 뿌리털의 생장이 좋고 뿌리털의 밀도도 조금 높은 것으로 나타났다. 그리고 인산결핍 조건에서 뿌리의 표면이 갈색으로 변하여 정상구와 큰 차이를 보였는데, 이것은 뿌리 조직이 인산 결핍조건에 반응하여 다량의 안토시아닌 색소의 집적으로 인한 것으로 생각된다. 인산결핍 조건에 대응하는 식물의 여러 가지 반응에 대한 생리, 생화학적 지표는 색소의 침착, 뿌리털의 발달, acid phosphatase 효소활성의 증가 및 중기 생육의 저하 현상 등을 관찰할 수 있었다. 이양 2주 후에 각 처리별 벼의 생육정도를 비교하기 위해 초장과 분얼수를 조사한 결과(표 4), 초장과 분얼수에는 별차이가 없었고, 엽록소함량은 인산결핍과 50 μ M 처리구에서 다소 높게 나타났으나 재배 초기이기 때문에 인산의 결핍에 의한 것으로 보기는 어려우며, 계속해서 각 생육단계별로 조사를 진행하고 있다. 그리고 벼 잎의 단백질함량도 처리간 차이를 나타내지 않았다. 생육 후기로 갈수록 인산 농도별 생육의 차이가 나타나기 시작했으며, 50 μ M 이하의 농도에서는 생육의 생애현상이 현저히 나타났다.

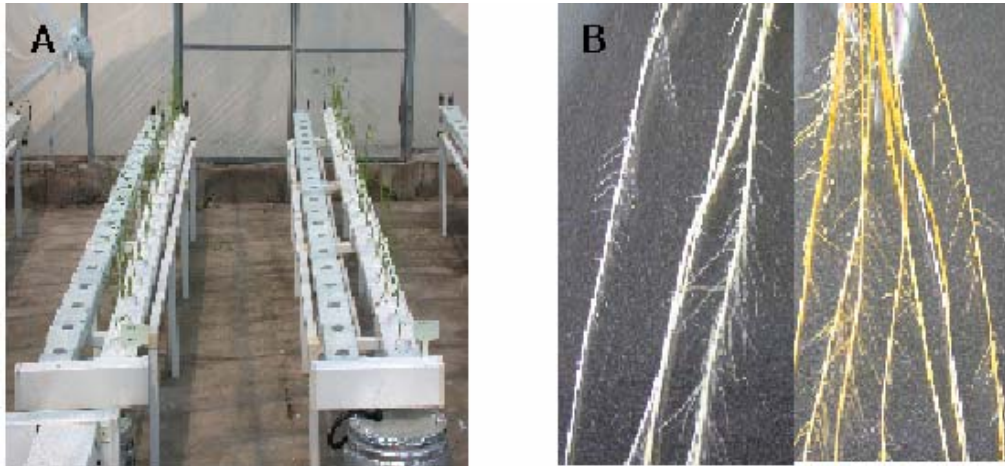


Fig. 10. Hydroponics system for investigating the effects of phosphate starvation on rice growth(A) and rice root growth(B)

Table 4. Growth character and chemical compound of rice plant in various phosphate concentration.

Phosphorus Concentration (μm)	Plant length (cm)	No. of tiller	Chlorophyll II content ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			Protein content ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
			Total	a	b	
0	34.7	2.0	80.7	21.4	45.3	2.56
5	34.7	1.9	65.0	8.3	12.9	3.24
50	35.2	1.8	87.9	17.0	28.0	3.23
250	34.7	1.8	63.4	10.9	17.2	3.54

1차년도에 확립한 수경재배 시스템을 이용하여서 유효인산 농도를 조절하며 인산 결핍조건에 대한 벼의 생리적 연구를 수행하였다. 인산의 처리 농도는 0, 5, 50, 500 μM 의 4가지 농도에서 벼를 재배하였다. 벼의 수경재배를 위해 볍씨를 질석에 과중하여 3.5엽기까지 키운 후 수경 베드로 이양하였고, 식물체를 펠라이트에 심고 담액순환식 수경 재배하였다. 인산결핍 조건에 따른 뿌리의 변화를 조사한 결과(그림 11), 처리 후 20일에 인산결핍 조건에서 자란 뿌리의 경우 정상 처리구에 비해 뿌리털의 생장이 좋고 뿌리털의 밀도도 매우 높은 것으로 나타났다. 이러한 뿌리의 변화는 일반

적으로 인산 결핍 시 양분 흡수율을 증대시키기 위해서 나타나는 현상으로 보고 되고 있다. 또한 인산결핍에 의한 생화학적 지표의 확립을 위해 인산 결핍 시 분비되는 acid phosphatase 효소의 활성의 변화를 그림 12에서 보면, 인산결핍에 의해 효소활성이 2배정도 증가하는 것으로 나타났다.

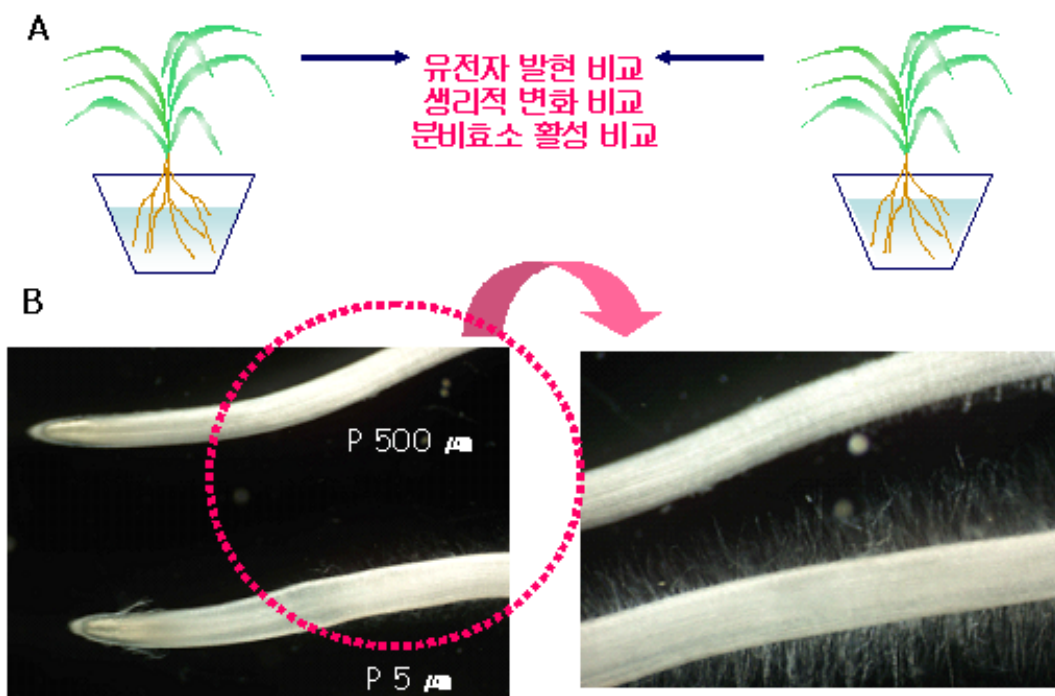


Fig. 11. Scheme for determining the molecular and physiological markers indicating phosphate deficiency

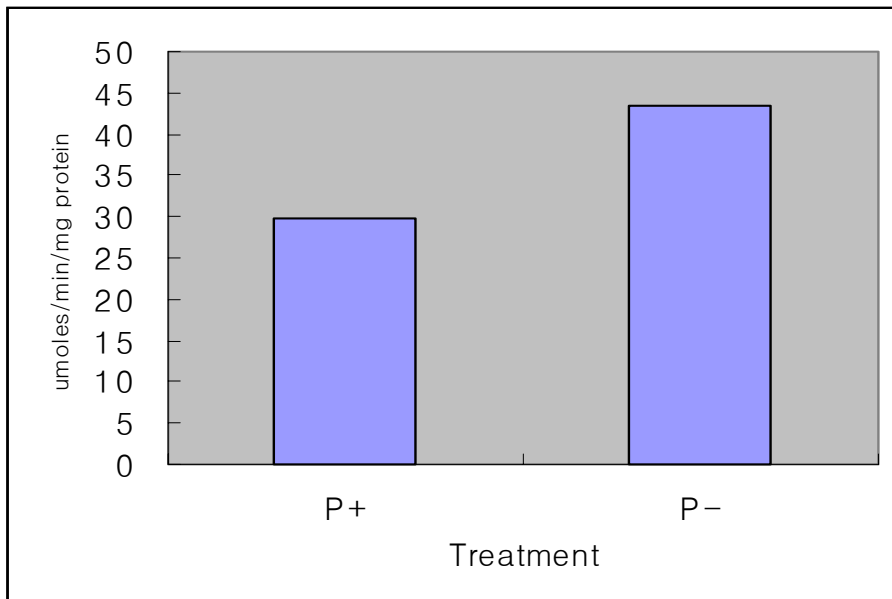


Fig. 12. Response of intracellular acid phosphatase in suspension cell to phosphorus starvation.

나. 벼 형질전환 시스템의 확립

동진벼의 종자로부터 calli를 유도하고 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 calli에 원하는 유전자를 전이시키고 calli를 형질전환된 완전한 식물체로 재생시키는 벼 형질전환 시스템을 다음과 실험을 통해서 본 연구단에 완전히 확립하였다. 벼 형질전환용 배지의 조성은 표 5와과 같다. 다양한 *Agrobacterium tumefaciens* strain에 따른 형질전환 효율을 GUS 발현양을 이용해서 조사한 결과, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 와 EHA105가 벼 형질전환에 효과적이었다. Callus 연령에 따른 형질전환 효율은 3주에서 5주된 calli가 가장 효율적이었다. Calli에 *Agrobacterium*을 감염한 후에 co-cultivation 하는 온도의 조건에 따른 형질전환 효율을 조사한 결과, *Agrobacterium*의 배양온도나 벼의 calli의 배양온도 보다는 *Agrobacterium*가 식물세포에 부착한 후 유전자를 전이시키는 통로인 pilli를 만들기에 효과적인 낮은 온도인 24°C가 효과적이었다(그림 13, 14, 15)

Table 5. The composition of rice transformation media.

Media	Composition
N6D (Callus induction)	Chu basal salt&vitamins 4 g/L myo-inositol 100 mg/L, sucrose 30 g/L casamino acid 300 mg/L, proline 2878 mg/L 2-4-D 2 mg/L, Gelrite 4 g/L, pH = 5.8
AAM (Agrobacterium infection)	AA salt & amino acid(Toriyama and Hinata, 1985) MS vitamins (Murashige and Skoog, 1962) casamino acid 0.5 g/L, sucrose 68.5 g/L, glucose 36 g/L acetosyringone 100 μ μ M, pH = 5.2
2N6-AS (Co-cultivation)	N6D + acetosyringone 100 μ μ M + glucose 10 g/L, pH = 5.2
Selection	N6D + hygromycin 50 mg/L + carbenicillin 250 mg/L + cefotaxime 200 mg/L
Regeneration	MS salt & vitamins 4.4 g/L sucrose 30 g/L, solbitor 30 g/L, casaminoacids 2 g/L kinetine 2 mg/L, NAA 0.02 mg/L, Gelrite 4 g/L, pH = 5.8 (1st : hygromycin 40 mg/L + carbenicillin 100 mg/L) (2st : hygromycin 40 mg/L + carbenicillin 100 mg/L)

age A.t strain	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks
GV3101 (pBISN1)				
LBA4404 (pBISN1)				
LBA4404 (pTOK233)				
EHA105 (pBISN1)				

Fig. 13. Effects of Agrobacterium strains and age of calli on the efficiency of Agrobacterium-mediated rice transformation

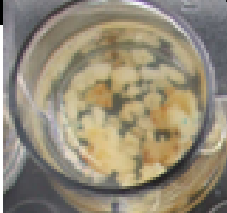


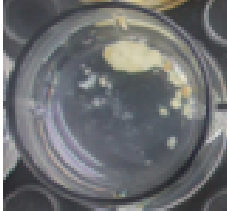





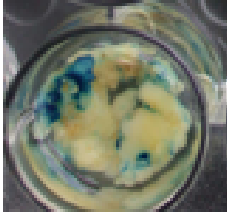


Temp & light A.t strain	24 ℃ light	28 ℃ dark	30 ℃ light
GV3101 (pBISN1)			
LBA4404 (pBISN1)			
LBA4404 (pTOK233)			
EHA105 (pBISN1)			

Fig. 14. Effects of Agrobacterium strains and co-cultivation conditions on the efficiency of Agrobacterium-mediated rice transformation

co-cultivation 기간은 3일보다는 4일이 형질전환 효율이 좋았다. 그리고 최종적으로 항생제를 포함한 selection 배지에서 형질전환된 calli를 선별하고 완전한 식물체를 재생하였다. 그리고 이들 식물체들에서 GUS 유전자의 발현을 확인함으로써 벼 형질전환 시스템의 확립을 검정했다(그림 16).

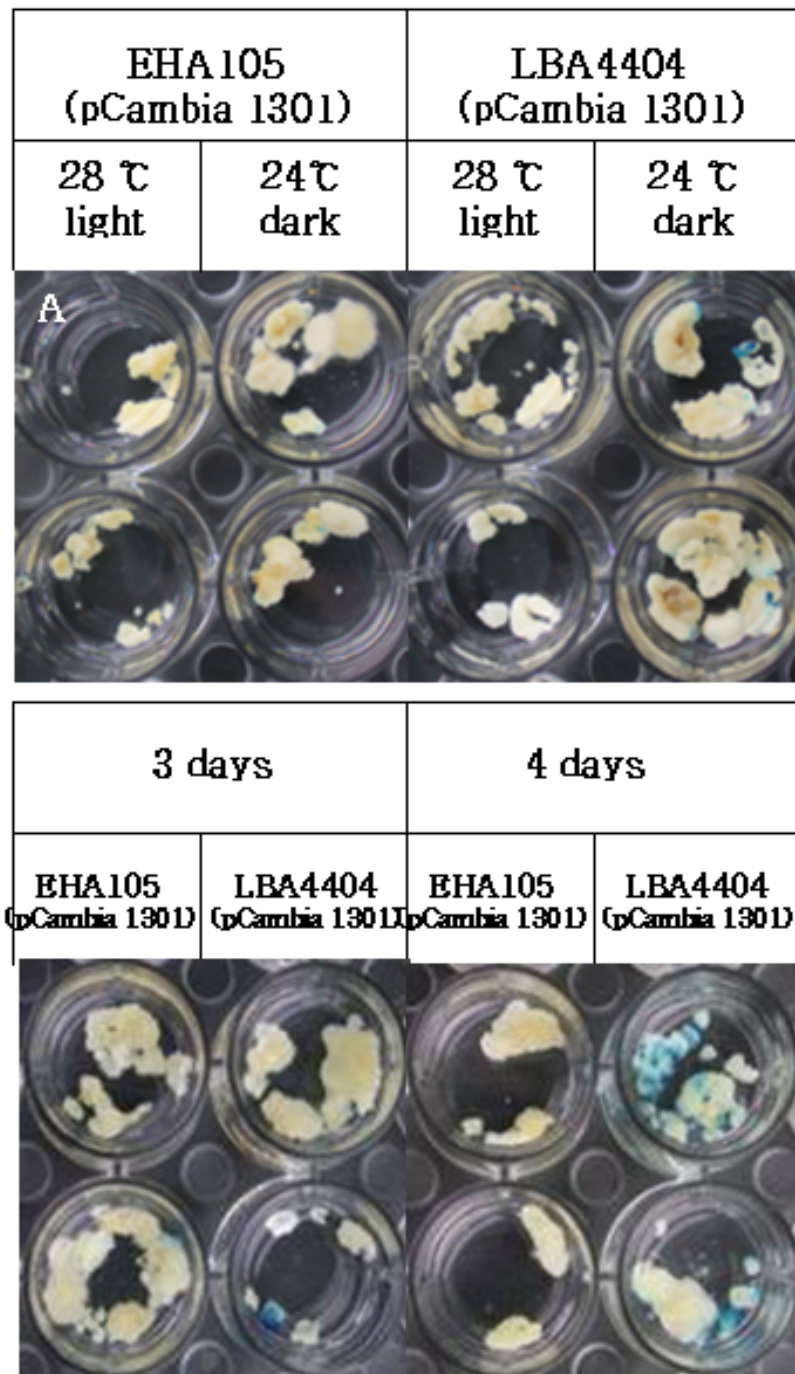


Fig. 15. Effects of co-cultivation temp. (A) and time(B) on the efficiency of Agrobacterium-mediated rice transformation.

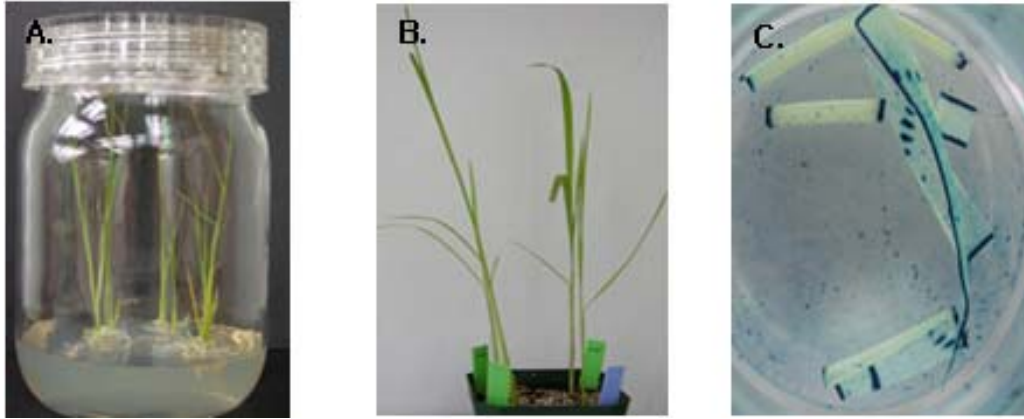


Fig. 16. Generation of transgenic rice plant containing GUS gene. A) Regeneration of Hyg^r-resistance rice plants after co-cultivation of calli with *Agrobacterium*. B) Transgenic rice plants on the soil. C) GUS expression in the leaves of transgenic rice plants.

다. 벼 형질전환용 벡터의 제조 및 형질전환체 제조

확립한 벼 형질전환 시스템을 이용하여 제1과제에서 분리한 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자들을 대량 발현하는 형질전환체를 만들기 위해서 먼저 OsPT1, OsPT5와 OsPT6의 cDNA와 genomic DNA 단편을 binary vector에 cloning 하였다(그림 17).

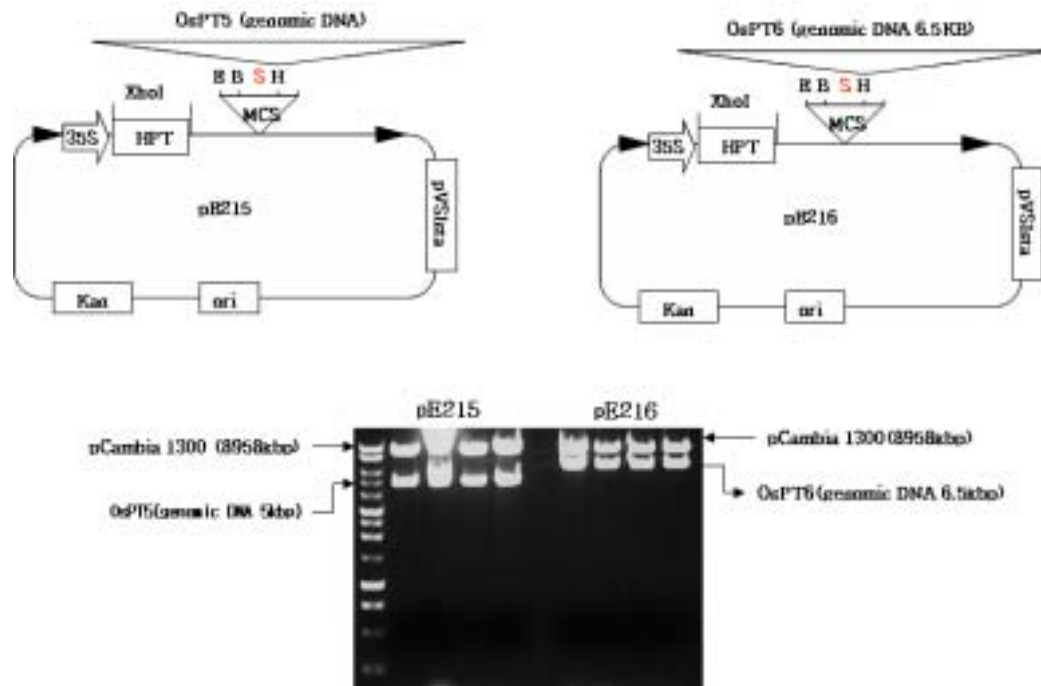


Fig. 17. Constructs for rice transformation. pE215(genomic DNA of OsPT5), pE216(genomic DNA of OsPT6)

그리고 가장 먼저 분리된 OsPT 유전자의 cDNA를 강력한 35S promoter에 의해 조절되도록 제조된 binary vector를 가진 Agrobacterium를 이용하여 벼 형질전환체를 성공적으로 제조하였다. 또한 vector 특이적 primer를 이용한 PCR 방법으로 이들 형질전환체들이 35S promoter에 의해 조절되는 OsPT 유전자들을 가지고 있음을 확인하였다(그림 18).

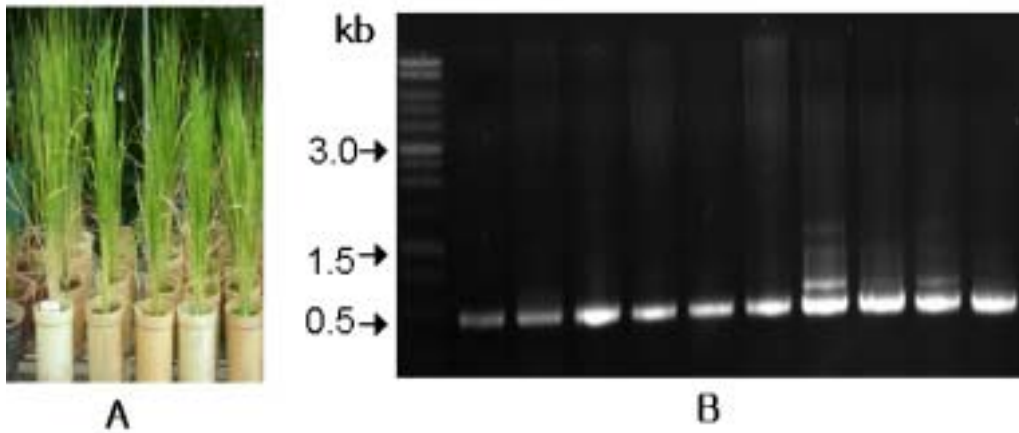


Fig. 18. Transgenic plants containing OsPTs (A) and detection of transgene (OsPTs) from putative transgenic rice plants with PCR(B).

라. 고친화성 인산 운반체 유전자가 도입된 벼 형질전환체의 분석

10 종의 고친화성 인산운반체 유전자들 중에서 인산결핍 조건에서 발현이 유도되는 3종(OsPT1, OsPT7, OsPT8), 인산농도에 관계없이 항상 발현되는 OsPT4 그리고 뿌리공생균인 arbuscular mycorrhiza의 감염에 유도되는 OsPT5 유전자들을 각각 35S promoter에 의해서 대량발현하게 하는 construct를 각각 제조하였다. 1 차년도에 확립한 Agrobacterium을 이용한 벼 형질전환 방법을 이용하여 각 construct 당 50개체의 T1 형질전환체들을 만들었다. 또한 northern blot 방법을 이용하여 이들 형질전환체들에서 각각의 transgene의 발현정도를 조사하였다.

OsPT4 유전자의 조직 특이적 발현양상을 조사하기 위해서 인산 결핍 또는 충분조건에서 수경 재배한 벼의 지상부와 뿌리에서 각각 그 발현량을 조사하였다. OsPT4는 배양세포 실험결과와 같이 인산농도에 관계없이 항상 높게 발현되며 지상부에서 특이적으로 발현되는 양상을 보였다. 이러한 결과는 OsPT4는 직접 토양으로부터 인산흡수에는 관여하지 않으며 뿌리에서 흡수된 인산을 지상부로 이동시킬 때 관여할 가능성을 시사한다.

식물체 내에서 이들 고친화성 인산운반체들의 조직 특이적 발현 양상을 Northern blot를 이용하여 조사하였다. OsPT1, OsPT2, OsPT3, OsPT7, OsPT8, OsPT10 은 인산이 결핍되면 뿌리에서 특이적으로 발현이 증가하였다. 반면, OsPT4는 인산 농도와는 관계없이 지상부 조직에서 발현하였고, 뿌리에서는 그 발현정도가 인산이 결핍된 조건에서 다소 증가하였다. 이러한 결과는 OsPT1, OsPT2, OsPT3, OsPT7, OsPT8,

OsPT10 은 벼가 인산 결핍 환경에 직면하면 뿌리세포에서 인산 흡수에 중요한 역할을 할 것으로 추측되며, OsPT4는 인산이 결핍된 조건이나 충분한 조건에 관계없이 뿌리에서 흡수된 인산을 지상부의 줄기와 잎으로 이동시킬 때 관여 할 것임을 시사한다. OsPT6와 OsPT9은 부위별과 인산 처리별 유전자의 발현 양상에 차이가 없이 거의 발현이 되지 않았다. 그러나 발현 수준은 낮지만 인산 흡수를 위해 어떤 기능을 수행하고 있는지는 계속 연구를 해야 할 것으로 생각된다. 또한 이러한 결과들은 OsPT1 promoter-GUS, OsPT4 promoter-GUS를 이용한 벼 형질전환체에서 검증하였다 (그림 19).

분리한 10 종의 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자들 중에서 인산결핍 조건에서 발현이 유도되는 3종(OsPT1, OsPT7, OsPT8), 인산농도에 관계없이 항상 발현되는 OsPT4 그리고 뿌리공생균인 arbuscular mycorrhiza의 감염에 유도되는 OsPT5 유전자의 genomic clone에서 promoter 영역만을 PCR로 분리하고 reporter 유전자인 GUS 유전자에 연결한 construct를 각각 제조하고 동진벼에 형질전환 시켰다.

OsPT1 유전자의 경우 줄기와 잎에서는 전혀 발현이 되지 않고 뿌리털에서만 특이적으로 발현되어 토양으로부터 인산을 식물세포 내로 흡수하는데 크게 관련할 것으로 생각된다. 그리고 OsPT4 유전자는 뿌리털에서는 발현이 되지 않고 뿌리, 줄기, 잎의 도관부를 중심으로 발현이 되는 것으로 보아 뿌리로 흡수된 인산의 지상부 이동에 관여할 것으로 추측된다(그림 20, 21).

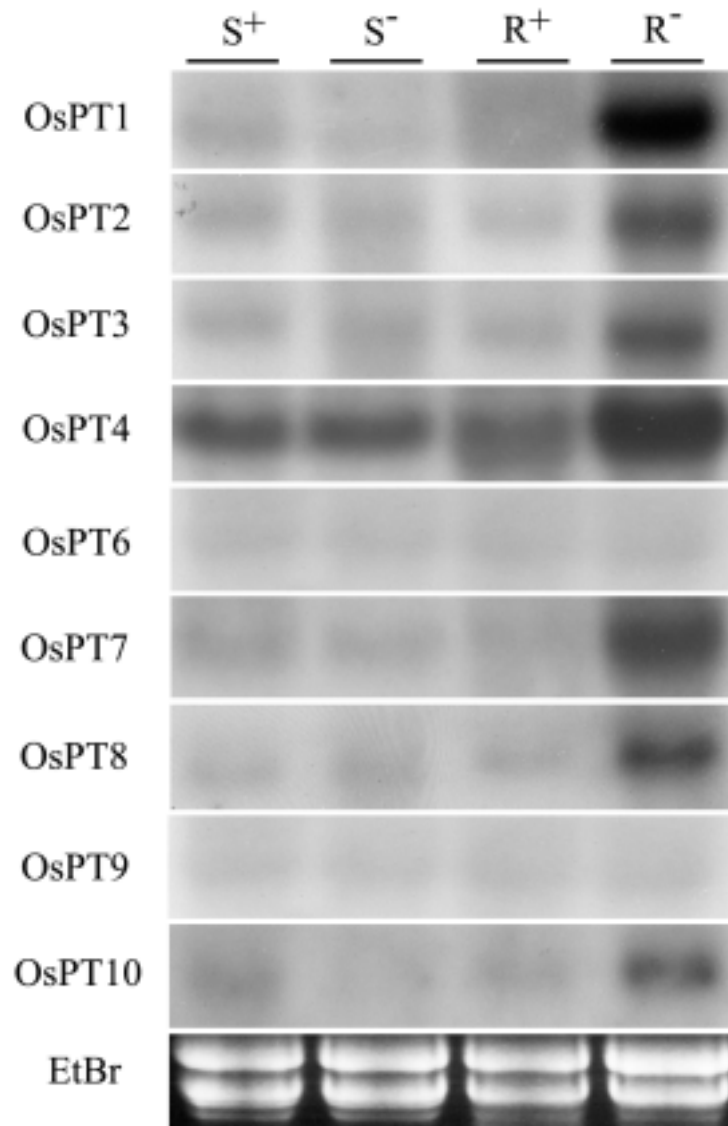


Fig. 19. Northern-blot analysis of the expression of phosphate transporter genes in Rice plant. Rice plant grown in a solution containing 1mM(P⁺) or 35µM(P⁻) phosphate was hybridized with labeled specific probes of each *OsPT* genes.

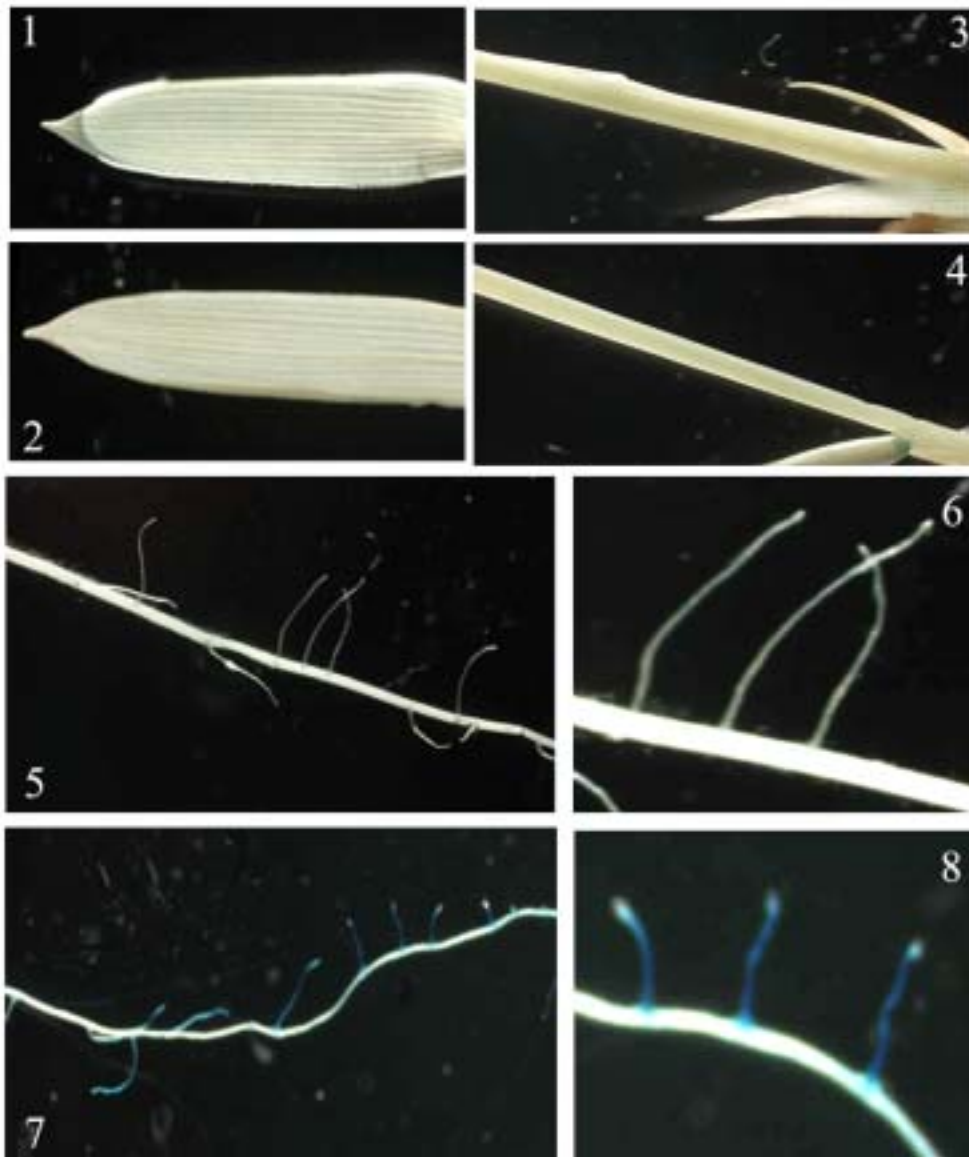


Fig. 20. *OsPT1* is expressed in root hairs under phosphate deficient condition. Transgenic plants grown in a solution containing 1 mM (P+) or 35 μM (P-) phosphate for 2 days. GUS gene under control of *OsPT1* promoter is highly expressed in root hairs under phosphate deficient condition.

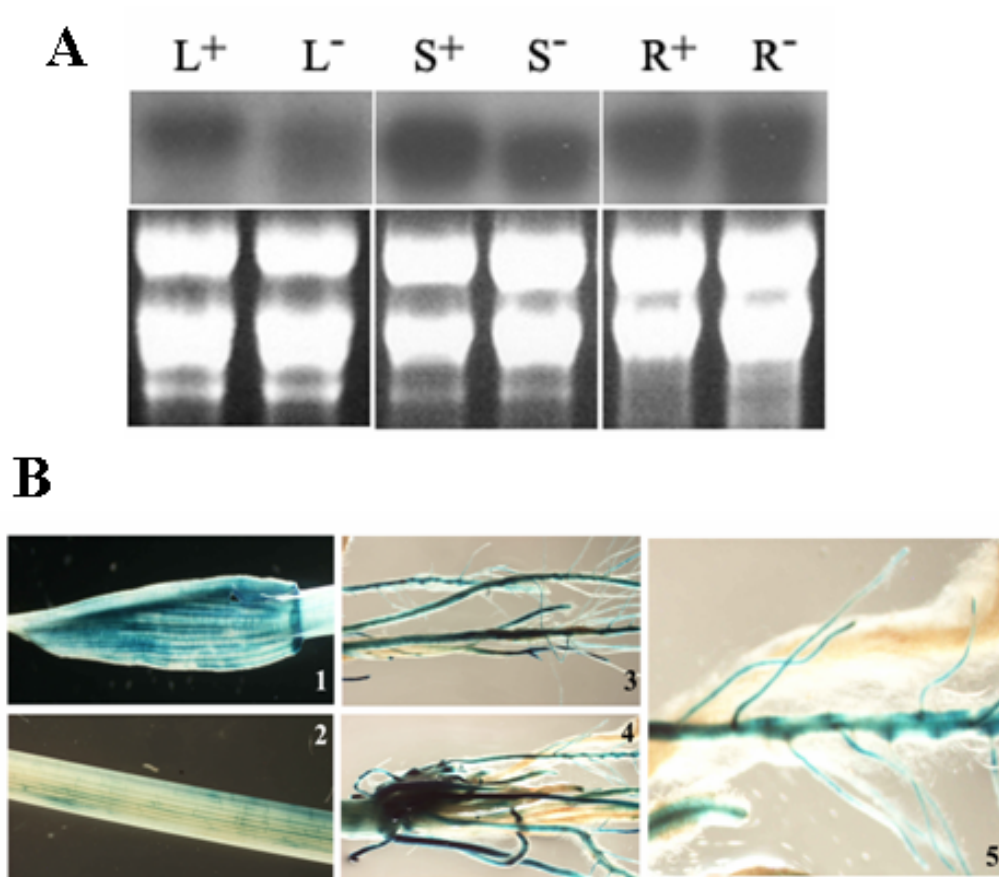
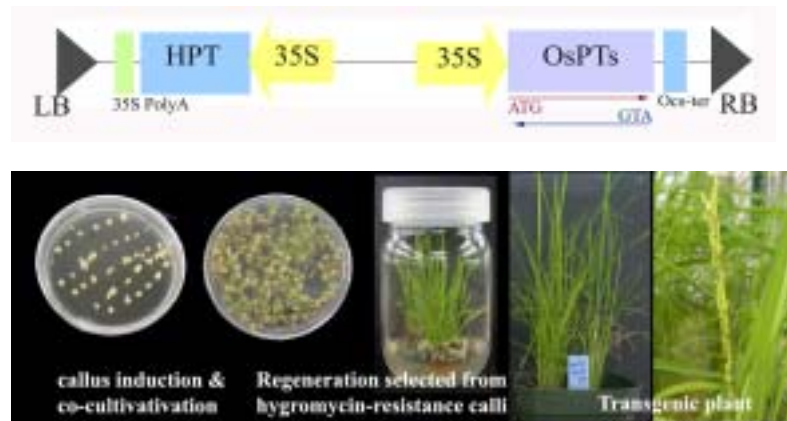


Fig. 21. *OsPT4* is constitutively expressed regardless phosphate preferentially expressed in leaf, root and stem of rice plant. **A.** RNA blots analysis of the *OsPT4* to Pi starvation. Total RNA from leaves(L), stem(S) and roots(R) of Rice plants grown in a solution containing 500 μ M(P⁺) or 5 μ M(P⁻) Pi was hybridized with a labeled specific probe of *OsPT4* gene. **B.** GUS gene under control of *OsPT4* gene promoter is highly expressed in leaf, root and stem of rice.

1차년도에 확립한 벼 형질전환 시스템을 이용하여 제1과제에서 분리한 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자들을 대량 발현하는 형질전환체를 만들기 위해서 먼저 OsPT1, OsPT4, OsPT5, OsPT7, OsPT8의 cDNA를 강력한 35S promoter에 의해 조절되는 binary vector를 각각 제조하였다. 최종적으로 Agrobacterium를 이용하여 고친화성 인산 운반체 유전자가 강화된 벼 형질전환체를 성공적으로 제조하였다. 현재 이들 형질전환체들은 온실에 설치된 간이 논에서 재배되고 있다. T1 씨앗을 확보하여 hygromycin과 PCR 방법으로 호모라인을 선발하여 현재 포장에서 재배되고 있으며, 생육 및 수량형질을 조사하고 있다.

제2세부 과제에서 제조된 고친화성 인산 운반체 유전자가 강화된 벼 형질전환체에서 transgene인 OsPT1, OsPT4, OsPT7, OsPT8의 발현정도를 wild-type과 비교하였다. 조사한 모든 형질전환체에서 도입된 OsPT 유전자가 항상 높게 발현되었다. 이러한 결과는 본 연구팀이 성공적으로 고친화성 인산 운반체의 기능이 강화된 형질전환된 벼를 개발하였음을 의미한다. 이들 형질전환체에 대한 생리적, 유전학적 검증을 통해 농업적 이용가능성을 조사하고 교배를 통해 농업적으로 유용한 중간 모본을 육성할 계획이다.

이들 10종류의 고친화 인산운반체 유전자들 중에서 OsPT1, OsPT4, OsPT7, OsPT8을 각각 대량발현하는 벼 형질전환체들을 제작하였다. 형질전환체들에서 이들 유전자들의 대량발현을 확인하였고 인산 흡수력은 현재 조사 중이다 (그림 22, 23).



C

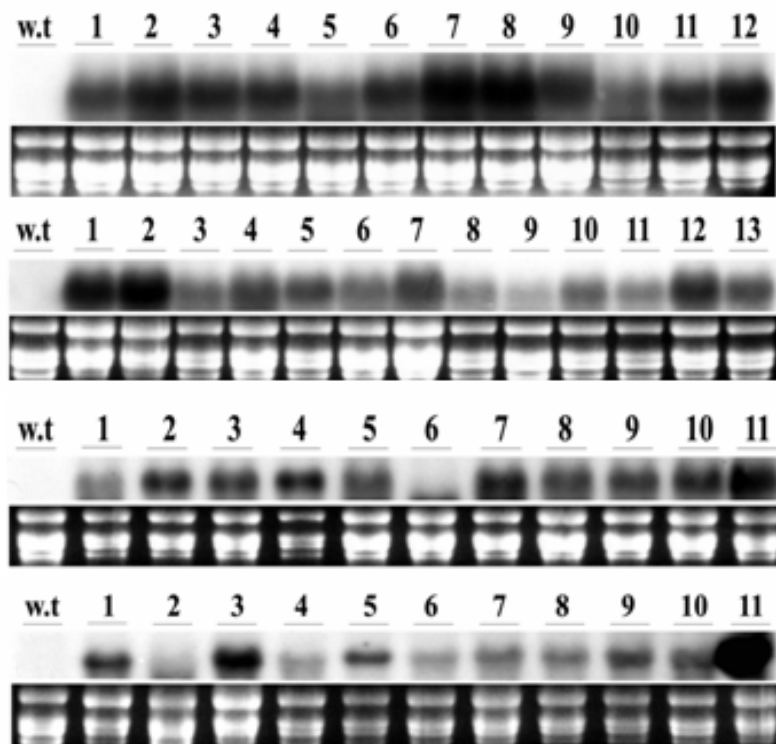


Fig. 22. Generation of transgenic rice plants overexpressing OsPT genes in the

direction of sense or antisense. **A.** Structure of the construct is show. BL: left border, BR: right border, GUS: β -glucuronidase, HPT: hygromycin phosphotransferase, HT: histidine tag. **B.** Representation of *Agrobacterium*-mediated transformation of rice. **C.** Levels of expression of the *OsPT* genes in the transgenic. 10 μ g of total RNA was loaded per line. The blot was probed with the *OsPTs* insert and exposed for 2hr (no signal is detected in wild-type plant (*OsPT4*) with this short time of exposure).



Fig. 23. T2 generation transgenic rice plants overexpressing *OsPT* genes in the direction of sense.

3. 인산 결핍 조건에서 발현되는 유전들의 클로닝

가. Acid phosphatase 및 citrate synthase 유전자의 분리 및 특성분석

벼의 고친화성 인산 운반체의 모든 gene family와 함께 근권의 인산효율성을 증가시키는 보고되고 있는 acidic phosphatase, citrate synthase 유전자들을 cross

hybridization 방법을 이용하여 벼 뿌리 cDNA library에서 분리·확보하였다.

이미 분리한 벼의 고친화성 인산운반체(OsPT1) 유전자를 probe로 이용하여 벼의 전체 유전체에 존재하는 10 종의 고친화성 인산 운반체 유전자들의 genomic clone을 분리하고 이들 10 종의 OsPT 유전자들의 인산결핍 조건에서의 발현정도를 northern blot 방법으로 조사하였다.

근권의 유용인산 농도를 증가시키는 것으로 알려진 acidic phosphatase, citrate synthase 유전자들을 Arabidopsis purple acid phosphatase 유전자를 probe로 이용한 cross hybridization 방법으로 벼 뿌리 cDNA library에서 분리·확보하였다

분리된 벼의 purple acid phosphatase는 다른 식물체의 acid phosphatase 와 매우 유사한 아미노산 sequence, 진화학적 근접한 유연관계 그리고 유사한 단백질 구조(아미노 말단에 세포 밖으로 분비를 위한 signal peptide 존재) 등의 특징들로 보아 인산결핍 시 발현되는 acid phosphatase로 생각된다. 토양 중의 인산의 유효도를 증대시키기 위해 벼 acid phosphatase 유전자를 클로닝하였고, 그것의 크기는 1.2kb 정도였다. 그리고 다른 식물과 아미노산 염기서열 비교를 해 본 결과, 약 60% 정도의 유사성이 있었고, 특히 3'쪽은 매우 높은 유사성을 보인 반면, 5'쪽은 다양성이 매우 크게 나타났다.

벼의 purple acid phosphatase는 애기장대와 가까운 유연관계를 보였고, 고구마, 콩 등과는 유연관계가 상대적으로 먼 것으로 나타났다. 그리고 N-terminal 쪽에 signal peptide를 가지고 있어 외부로 잘 유출될 것을 생각되며, 이미 인산의 결핍조건에서 토양 중으로 잘 유출되는 다른 식물의 purple acid phosphatase와 높은 유사성을 보이는 것으로 보아 권근 토양의 인산 유효화를 위해 이용가능성이 높을 것으로 생각된다. 특히 인산 농도에 따른 유전자의 발현양상을 보면 인산 농도가 낮아짐에 따라 발현이 강하게 되는 것으로 보아 인산 결핍에 예민하게 반응하여 purple acid phosphatase를 근권 토양으로 다량 분비할 수 있을 것으로 추측된다. 그리고 인산 농도의 변화에 따른 purple acid phosphatase의 효소활성을 측정한 결과 0 μ M 농도에서 가장 높게 나타났고, 500 μ M부터는 효소활성이 급격히 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다(그림 24, 25, 26).

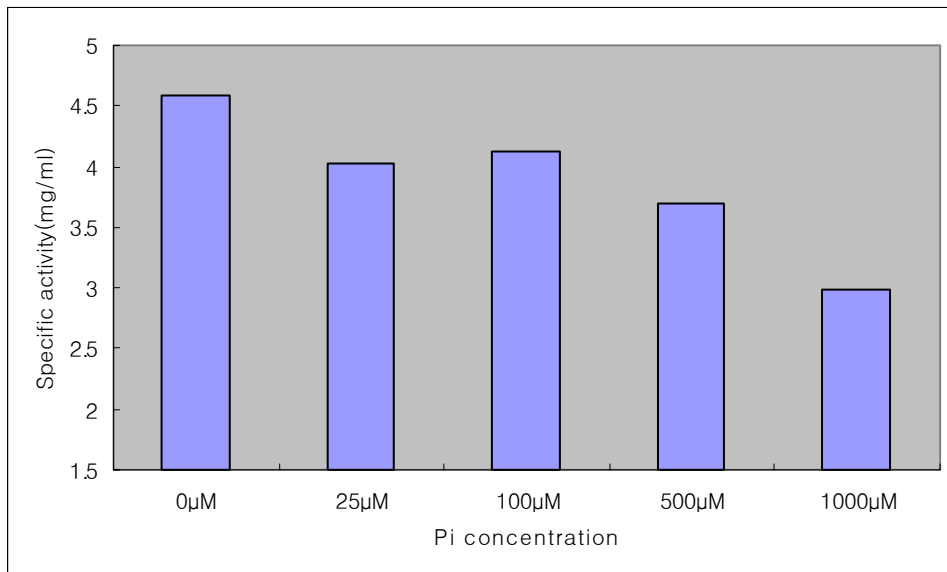


Fig. 26. Effect of Pi concentration on the OsPAP activity in rice calli.

Citrate synthase 유전자는 미토콘드리아에서 citrate를 대량으로 생산하는 것을 coding하며, 인산의 결핍시 세포 밖으로 유출되어 다른 유기산과 같이 토양에 고정화된 인산을 유효태로 전환시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 여러 가지 citrate가 있거나 미토콘드리아에서 생산되는 것이 인산 결핍에 반응하여 효과적으로 유출되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 클로닝된 citrate synthase 유전자는 다른 식물의 citrate synthase와 매우 높은 유사성을 보였다. 특히 당근의 citrate synthase와 가장 높은 유사성을 보였는데, 당근의 citrate synthase의 경우 인산의 결핍에 의해 유전자의 발현이 증대되고 미토콘드리아 citrate가 다량 생성되어 토양 중 유기물과 알루미늄 이온 등과 결합되어 있는 인산을 유효한 형태로 전환을 시키는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서 클로닝된 citrate synthase도 이러한 역할을 할 것으로 생각되며, 이 유전자가 형질전환된 벼를 대상으로 계속해서 연구를 수행할 예정이다(그림 27).

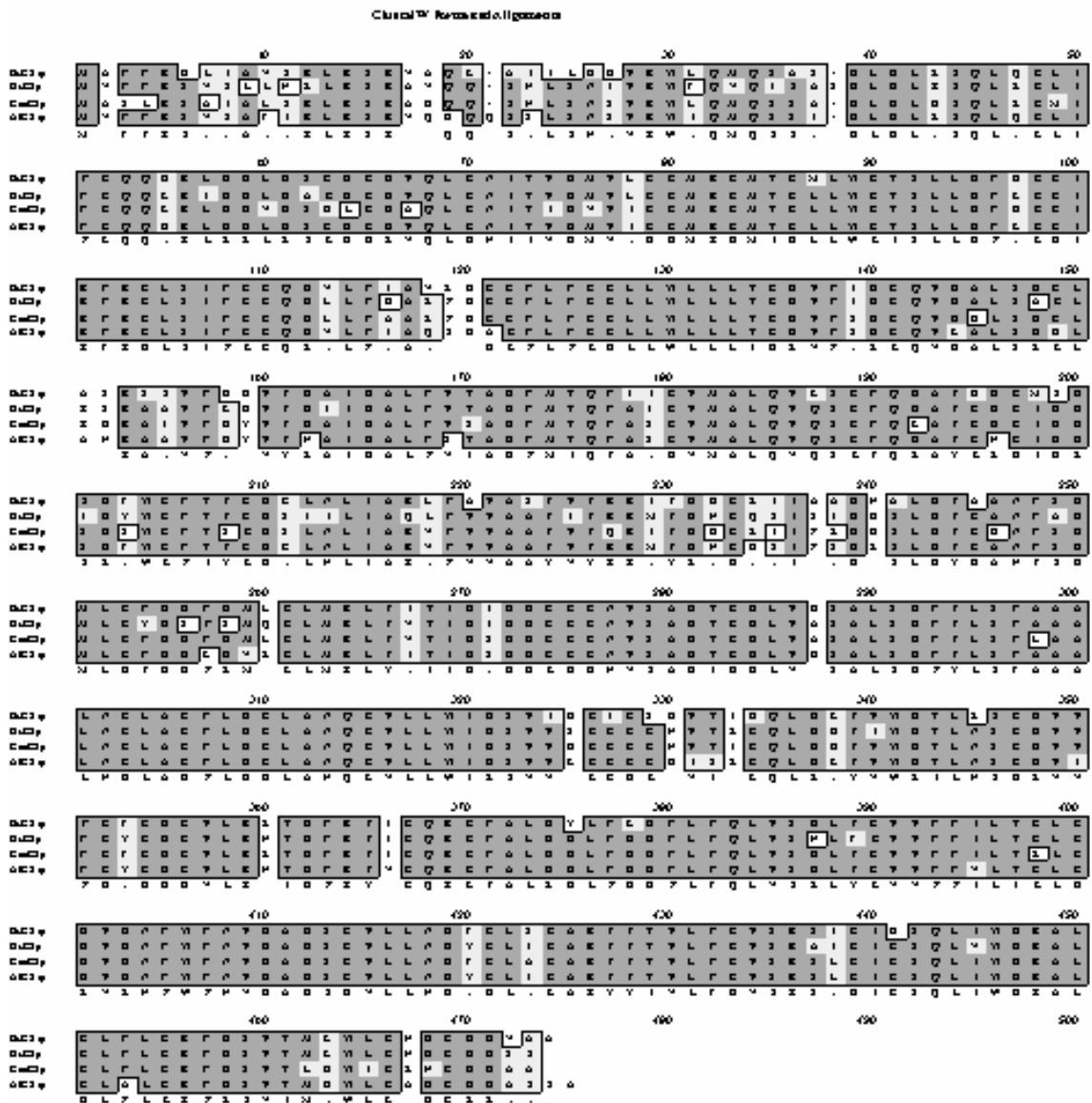


Fig. 27. Multiple alignment of rice citrate synthase (OsCs1) with other plant citrate synthases.

나. 인산 결핍에 특이적으로 벼의 뿌리에서 발현하는 유전자들의 확보

1) SSH 방법을 이용한 인산 결핍시 특이적으로 발현하는 유전자 분리 및 분류

인산 결핍에 의해 특이적으로 발현이 유도되는 벼의 유전자들을 SSH 방법을 이용하여 확보하였다(그림 28). 간략히 실험방법을 살펴보면 다음과 같다. 인산이 결핍된 또는 충분한 배양액에서 1 주일 동안 배양한 rice calli로부터 total RNA를 각각 분리하고 cDNA를 제조하였다. cDNA들은 high stringent 조건에서 hybridization하여서 인산이 결핍된 또는 충분한 조건에서 모두 발현되는 유전자들을 제거하고 인산이 결핍된 조건에서만 특이적으로 발현되는 유전자들만을 다시 선택적으로 PCR 법으로 증폭시켜서 E. coli cloning vector에 cloning 하여 염기서열을 분석하였다. 분리된 유전자들의 가능한 생물학적 기능은 Arabidopsis의 MIPS data base를 이용하여 분류하였다.

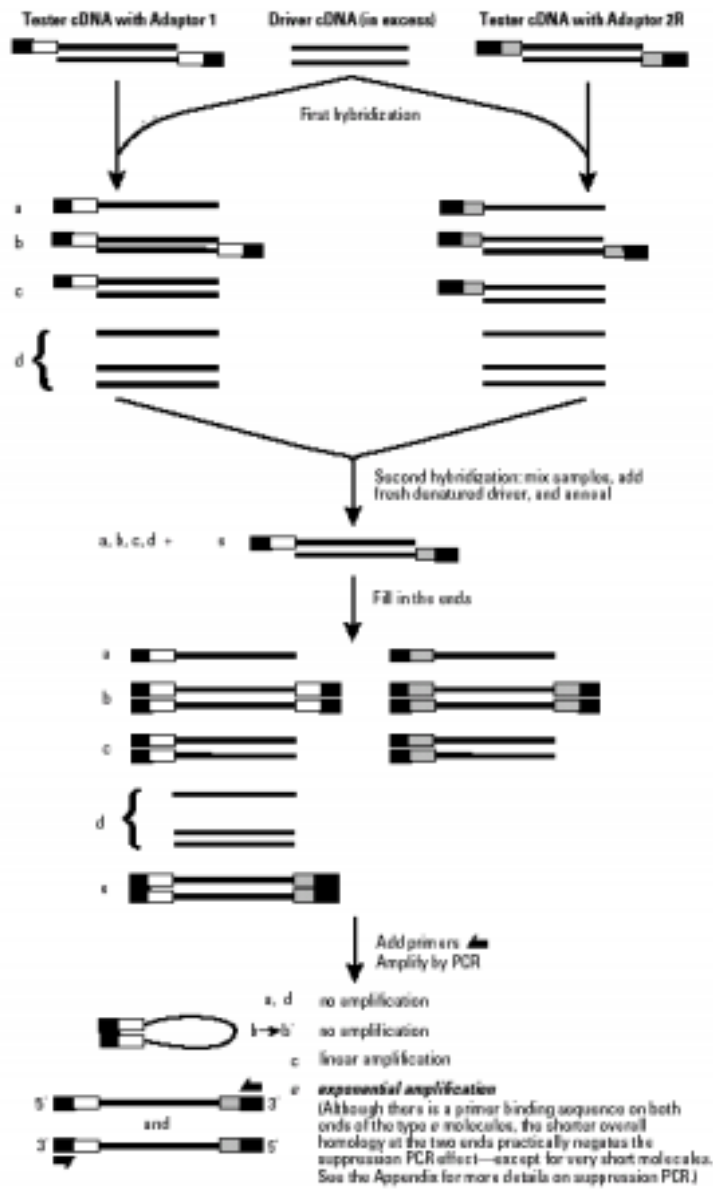


Fig. 28. Schematic diagram of SSH method. Solide lines represent the Rsa I digested tester or driver cDNA. Solide boxes represent the outer region of the adaptor 1 longer strand and corresponding PCR primer 1 sequence.

인산 결핍 조건에서 유도되는 유전자를 대량으로 확보하기 위해 SSH를 수행하고, positive colony를 선별하여 insert size를 조사한 결과 500-1000bp 정도의 크기를 나타냈다(그림 29).

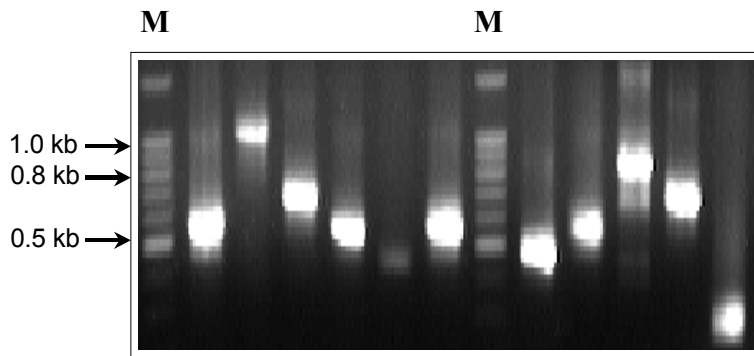


Fig. 29. The result of colony of positive clones.

그리고 이들 클론 중 770개를 대상으로 DNA 염기서열 분석하고, 이들 결과를 바탕으로 EMBL/GeneBank DB를 이용하여 유전자의 유사성 분석을 수행하였다. 이들 유전자를 기능별로 분류해보면(그림 30), subcellular localisation 10%, metabolism 7%, cell defense 4%, transcription, energy, protein synthesis 3%의 순으로 나타났고, 미분류가 42%로 많은 비중을 차지했다.

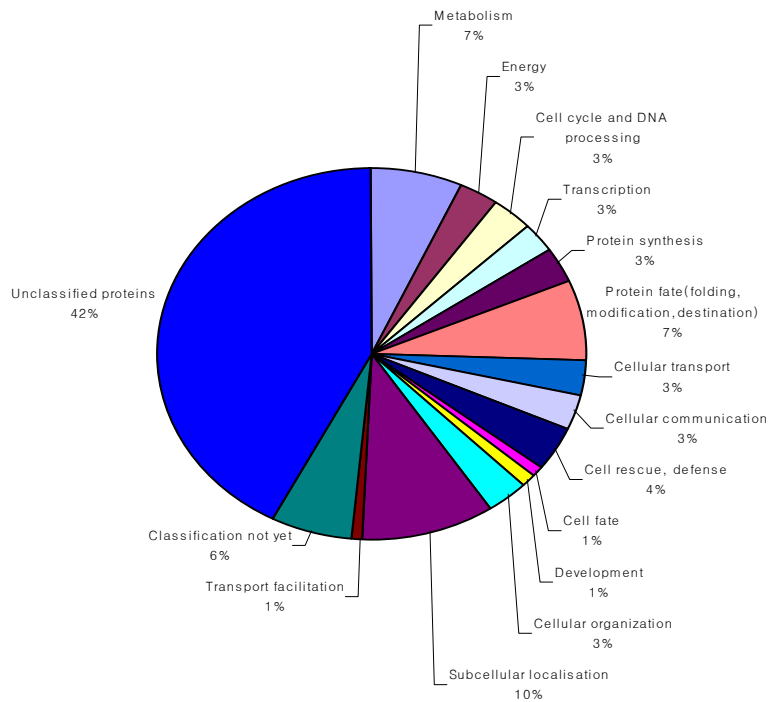


Fig. 30. Functional classification of phosphate starvation genes.

이들 유전자 중 중요한 기능을 가지는 유전자 200개에 대한 결과, 특히 유전자의 전자조절에 중요한 역할을 하는 transcription factor와 세포내의 신호전달체계에 직접적으로 관여하는 kinase 등의 유전자들을 다량 확보하였고, 이들 유전자를 클로닝하여 특성을 조사하고 기능분석 연구를 수행 중에 있다.

또한 본 연구단은 뿌리에서 인산 결핍에 의해 특이적으로 발현이 유도되는 벼의 유전자들을 SSH 방법을 이용하여 인산 결핍조건에서 발현하는 유전자를 대량으로 분리하였고(약 800개 분리), 현재 이들 유전자들을 sequencing 한 후 기능별로 분류하고 앞으로 연구가치가 있을 것으로 생각되는 유전자들을 선별하는 작업을 진행 중이다. 특히 kinase(P149) 또는 transcription factor(P131) 등은 인산결핍 시 나타나는 세포수준의 변화를 조절하는 중요한 조절 유전자일 가능성이 크다. 또한 SSH 방법으로 분리된 유전자 중에서 P125는 sequencing 결과 이미 제1과제에서 분리된 OsPT4인 것으로 확인함으로써 이방법의 효율성을 검증하였다(표 6, 7).

Table 6. Phosphate starvation induced rice cDNA clones.

Clone#	Homology to (% identity)					
P139	putative protein kinase [A.thaliana] (35%)					
P141	ribosomal protein L II [A.thaliana] (94%)					
P142	GTP cyclohydrolase I [A.thaliana] (57%)					
P147	single-strand nucleic acid binding protein [Saccharomyces cerevisiae] (48%)					
P148	putative cytoplasmic ribosomal protein S15a [A.thaliana] (89%)					
P149	protein kinase [A.thaliana] (85%)					
P170	fructose-bisphosphate aldolase isoenzyme C-I [O. Sativa] (94%)					
P179	beta-1, 3-glucanase [A.thaliana] (46%)					
P180	cinnamyl-alcohol dehydrogenase CAD1 [A.thaliana] (57%)					
P189	gamma-glutamylcysteine synthetase [A.thaliana] (65%)					
P190	protease II [Agrobacterium tumefaciens] (35%)					
P194	putative dynein light chain [O. Sativa] (100%)					
P195	unknown					
P201	oryzacystatin =cystein protease inhibitor [O. Sativa] (100%)					
P205	GTP cyclohydrolase I [A.thaliana] (50%)					
P210	putative phosphomannomutase [A.thaliana] (82%)					
P218	putative phenylalanyl-tRNA synthetase beta-subunit;Phe HB [A.thaliana] (56%)					
P222	asparaginase [Agrobacterium tumefaciens] (45%)					
P226	hypothetical protein [A.thaliana](68%)					
P227	hypothetical protein [A.thaliana] (45%)					
P233	unknown					
P234	pyrophosphate-dependent phosphofuctokinase beta subunit [A.thaliana] (78%)					
P239	putative Wall-associated protein kinase [O. Sativa] (48%)					
P240	putative synaptobrevin [A.thaliana] (73%)					
P245	ribosomal protein L32 [A.thaliana] (55%)					
P246	hypothetical protein [Streptomyces Coelicolor] (46%)					
P247	Cysteine protease inhibitor [O. Sativa] (100%)					
P248	putative pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit [A.thaliana] (83%)					

Table. 7. Phosphate starvation induced rice (*Oryza sativa*) cDNA clones.

Clone	Putative identification	Species	Homology (%)
32	putative histone H2A - like protein	<i>Oryza Sativa</i>	74
41	Transcription factor p65	<i>Mus musculus</i>	40
54	fructose-bisphosphate aldolase isoenzyme C-1	<i>Oryza Sativa</i>	95
63	monodehydroascorbate reductase	<i>Oryza Sativa</i>	98
65	freeze tolerance-associated protein DDX8	<i>Rana Sylvatica</i>	31
69	cycloartenol-C24-methyltransferase	<i>Oryza Sativa</i>	100
71	ATP-binding protein of sugar ABC transporter	<i>Mesorhizobium loti</i>	45
73	putative protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	75
75	glycine-rich protein	<i>Oryza Sativa</i>	100
96	sucrose synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	75
101	putative microtubule associated protein	<i>Oryza Sativa</i>	90
106	putative ATP-dependent CLPB protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	60
109	pyrophosphate-dependent phosphofructokinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	78
111	receptor protein kinase-like protein	<i>Oryza Sativa</i>	98
117	alcohol dehydrogenase 1	<i>Oryza Sativa</i>	71
118	cell cycle switch protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	88
120	phenylalanine ammonia-lyase	<i>Oryza Sativa</i>	87
122	70kDa heat shock protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	93
125	phosphate transporter	<i>Oryza Sativa</i>	35
131	zinc finger transcription factor WRKY1	<i>Oryza Sativa</i>	82
139	putative protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	35
142	GTP cyclohydrolase I	<i>Arabidopsis thaliana</i>	57
149	protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	85
170	fructose-bisphosphate aldolase isoenzyme C-1	<i>Oryza Sativa</i>	94
179	beta-1, 3-glucanase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	46
180	cinnamyl-alcohol dehydrogenase CADI	<i>Arabidopsis thaliana</i>	57
189	gamma-glutamylcysteine synthetase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	65
194	putative dynein light chain	<i>Oryza Sativa</i>	100
195	metallothionein-like protein mRNA	<i>Oryza Sativa</i>	98
210	putative phosphomannomutase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	82
218	phenylalanyl-tRNA synthetase beta-subunit:Phe HB	<i>Arabidopsis thaliana</i>	56
234	pyrophosphate-dependent phosphofructokinase beta subunit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	78
239	putative Wall-associated protein kinase	<i>Oryza Sativa</i>	48
247	Cysteine protease inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	100
248	pyrophosphate-dependent phosphofructokinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	83
249	pathogenesis-related thaumatin-like protein	<i>Oryza Sativa</i>	100
252	putative cysteine proteinase inhibitor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	67
253	G-box binding protein	<i>Oryza Sativa</i>	71
254	oryzacystatin mRNA	<i>Oryza Sativa</i>	99
256	O. sativa mRNA for alcohol dehydrogenase 1	<i>Oryza Sativa</i>	92
257	O. sativa putative G-box binding protein mRNA	<i>Oryza Sativa</i>	89
258	Z. mays mRNA for eukaryotic initiation factor-5(eIF-5)	<i>Zea mays</i>	86
260	mays cytochrome P450 monooxygenase CYP92A1 mRNA	<i>Zea mays</i>	88
265	MEK kinase (MAP3Ka) mRNA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100
267	Rice mRNA for cycO7	<i>Oryza Sativa</i>	93
268	transcription factor E2Fe	<i>Arabidopsis thaliana</i>	85
269	calcium-dependent protein kinase	<i>Oryza Sativa</i>	52
270	RNA-binding protein MEI2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	52
277	senescence-associated protein	<i>Pisum sativum</i>	76
285	pyrophosphate-dependent phosphofructokinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	78

Clone	Putative Identification	Species	Homology (%)
286	senescence-associated protein	<i>Pisum sativum</i>	93
289	pyrophosphate-dependent phosphofuctokinase beta subunit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	67
290	pyruvate decarboxylase	<i>Zea mays</i>	97
291	cysteine proteinase inhibitor	<i>Zea mays</i>	80
292	Sec31p	<i>Oryza Sativa</i>	94
295	RING-H2 finger protein RHC2a	<i>Oryza Sativa</i>	100
301	sugar transport protein	<i>Oryza Sativa</i>	70
303	endoxyloglucan endotransglycosylase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	70
304	translation elongation factor eEF-1 alpha chain	<i>Oryza Sativa</i>	98
306	A. thaliana mRNA for SC35-like splicing factor SCL28	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100
310	wound-induced protein W112	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	64
311	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	60
323	alpha-expansin (EXP5) gene	<i>Oryza Sativa</i>	100
326	putative flavanone 3-hydroxylase	<i>Oryza Sativa</i>	78
329	pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit	<i>Oryza Sativa</i>	80
334	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	84
339	heat shock protein HSP 70	<i>Oryza Sativa</i>	90
346	putative MIN3-like protein mRNA	<i>Dianthus caryophyllus</i>	100
347	A. thaliana MEK kinase (MAP3Ka) mRNA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	95
353	cysteine proteinase inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	99
357	cysteine protease inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	99
358	glycogen phosphorylase	<i>Corynebacterium callunae</i>	39
361	major facilitator superfamily antiporter (mfs2) mRNA	<i>Oryza Sativa</i>	100
363	O. sativa subsp. indica putative dnaJ-like protein	<i>Oryza Sativa</i>	99
364	flavanone 3-hydroxylase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	64
366	O. sativa GF14-b protein mRNA	<i>Oryza Sativa</i>	99
367	receptor-associated protein	<i>Oryza Sativa</i>	80
368	GTP cyclohydrolase I	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51
372	L-ascorbate peroxidase	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	91
374	ATP synthase beta chain	<i>Oryza Sativa</i>	84
378	pathogenicity protein PATH531-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	58
380	RING-H2 finger protein RHA1a	<i>Oryza Sativa</i>	54
381	cysteine protease inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	97
382	MAP kinase kinase 1 mRNA	<i>Oryza Sativa</i>	96
383	phosphotransferase fusion protein	<i>synthetic construct</i>	85
384	cysteine proteinase inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	100
385	transcription factor scarecrow-like 14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	31
386	FVT1 - like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	48
387	neutral invertase	<i>Oryza Sativa</i>	97
389	alcohol dehydrogenase 1	<i>Oryza Sativa</i>	93
393	cysteine protease inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	100
395	thaumatin-like protein	<i>Oryza Sativa</i>	96
396	harpin induced gene 1 homolog	<i>Oryza Sativa</i>	94

405	OsMST3 mRNA for monosaccharide transporter 3	<i>Oryza Sativa</i>	99
406	inorganic pyrophosphatase	<i>Vigna radiata</i>	96
407	hydroxyproline-rich glycoprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	25
408	translation elongation factor eEF-1 alpha chain	<i>Arabidopsis thaliana</i>	81
410	GF14-b protein	<i>Oryza Sativa</i>	95

Continued.

Clone	Putative Identification	Species	Homology (%)
411	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase type 2	<i>Rattus norvegicus</i>	53
417	Rice mRNA for glycine-rich protein (gene name AD489)	<i>Oryza Sativa</i>	98
420	receptor protein kinase-like protein	<i>Oryza Sativa</i>	74
422	actin	<i>Zea mays</i>	93
424	gamma-glutamylcysteine synthetase	<i>Oryza Sativa</i>	98
426	receptor protein kinase-like protein	<i>Oryza Sativa</i>	74
428	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	82
429	cysteine protease inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	100
430	protein kinase	<i>Oryza Sativa</i>	53
434	DEAH-box RNA helicase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	35
436	actin	<i>Oryza Sativa</i>	100
437	zwille protein	<i>Oryza Sativa</i>	95
439	adh1-adh2 region	<i>Oryza Sativa</i>	95
441	Photosystem I reaction center subunit II	<i>Lycopersicon esculentum</i>	40
442	EF-1 alpha	<i>Oryza Sativa</i>	100
443	carbonic anhydrase	<i>Oryza Sativa</i>	77
444	histone H2B	<i>Oryza Sativa</i>	74
447	putative asparaginase	<i>Oryza Sativa</i>	94
452	beta Galactosidase-like protein	<i>Oryza Sativa</i>	80
453	harpin induced gene 1 homolog	<i>Oryza Sativa</i>	98
456	Rice mRNA for glycine-rich protein	<i>Oryza Sativa</i>	98
458	putative translation initiation factor	<i>Oryza Sativa</i>	83
466	cysteine protease inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	97
470	ADP-ribosylation factor	<i>Oryza Sativa</i>	97
471	phenylalanine ammonia-lyase	<i>Oryza Sativa</i>	100
475	alcohol dehydrogenase I	<i>Oryza latifolia</i>	70
476	GTP-binding protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	71
477	bacterial blight resistance protein Xa1-like protein	<i>Oryza Sativa</i>	94
478	cysteine protease inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	80
480	mRNA for MAP3K alpha protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100
481	NADH nitrate reductase	<i>Solanum tuberosum</i>	42
482	MEK kinase (MAP3Ka) mRNA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100
483	putative beta-1, 3-glucanase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	43
484	pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase t	<i>Solanum tuberosum</i>	76
485	protein kinase HvPKABA1	<i>Oryza Sativa</i>	90
486	shoot GS1 mRNA for cytosolic glutamine synthetase	<i>Oryza Sativa</i>	98
487	proline-rich cell wall protein	<i>Gossypium hirsutum</i>	33
489	phenylalanine ammonia-lyase	<i>Oryza Sativa</i>	100
490	glycine-rich protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	34
491	putative zwille protein	<i>Oryza Sativa</i>	95
493	cysteine protease inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	100
495	CHIA_CIGAR ACIDIC ENDOCHITINASE PRECURSOR	<i>Oryza Sativa</i>	65
496	putative phenylalanyl-tRNA synthetase beta-subunit	<i>Oryza Sativa</i>	49
497	partial mRNA for putative 1,4-beta-cellobiosidase	<i>Agaricus bisporus</i>	100
499	partial mRNA for putative hexose transporter protein	<i>Agaricus bisporus</i>	100
500	beta-glucosidase	<i>Oryza Sativa</i>	97
501	glycine-rich cell wall protein (Angrp-1) gene	<i>Oryza Sativa</i>	98
502	33 kDa secretory protein	<i>Oryza Sativa</i>	73
504	12-oxophytodienoic acid reductase	<i>Oryza Sativa</i>	92
505	putative RAB24 protein	<i>Oryza Sativa</i>	81

Continued.

Clone	Putative identification	Species	Homology (%)
507	translation elongation factor-1 alpha: EF-1 alpha	<i>Oryza Sativa</i>	100
508	mRNA for gibberellin 20-oxidase	<i>Solanum dulcamara</i>	100
509	ADP-ribosylation factor-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100
512	high mobility group protein	<i>Oryza Sativa</i>	86
515	ADP-ribosylation factor	<i>Oryza Sativa</i>	96
516	hypothetical protein ei2	<i>Oryza Sativa</i>	83
518	ADP-ribosylation factor	<i>Oryza Sativa</i>	98
519	putative ARG1 protein	<i>Oryza Sativa</i>	100
525	cysteine protease inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	100
531	contains similarity to polyadenylate-binding protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	86
532	putative peptide transporter	<i>Oryza Sativa</i>	75
534	putative phenylalanyl-tRNA synthetase beta-subunit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	56
536	cysteine protease inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	100
539	acidic endochitinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	40
548	putative inorganic pyrophosphatase	<i>Oryza Sativa</i>	96
549	RRM-containing RNA-binding protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	54
551	calcium-binding protein	<i>Oryza Sativa</i>	96
555	putative acetyl transferase	<i>Oryza Sativa</i>	44
558	immunophilin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	77
568	sucrose synthase	<i>Oryza Sativa</i>	97
569	putative dynein light chain	<i>Oryza Sativa</i>	100
570	probable chitinase	<i>Oryza Sativa</i>	92
571	Glycine max ribonucleotide reductase large subunit A mRNA	<i>Glycine max (soybean)</i>	100
572	Rice mRNA for glycine-rich protein	<i>Oryza Sativa</i>	98
574	putative senescence-associated protein	<i>Pisum sativum</i>	74
577	Rice mRNA for glycine-rich protein	<i>Oryza Sativa</i>	97
582	putative cell cycle switch protein	<i>Oryza Sativa</i>	89
584	putative translation initiation factor ,putative RNA helicase RH2	<i>Oryza Sativa</i>	83
585	Rice mRNA for glycine-rich protein	<i>Oryza Sativa</i>	98
586	probable chitinase	<i>Oryza Sativa</i>	93
589	susceptibility transcription factor RVS1	<i>Oryza Sativa</i>	62
590	1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	78
592	sucrose synthase	<i>Oryza Sativa</i>	97
594	transcription factor AP2 alpha 2	<i>Danio rerio</i>	38
595	Histone H3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	98
596	putative protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	72
597	mRNA-binding protein precursor	<i>Imported</i>	55
599	ADP-ribosylation factor-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100
604	cysteine proteinase inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	100
608	putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	<i>Oryza Sativa</i>	76
613	cysteine protease inhibitor	<i>Oryza Sativa</i>	93
614	cycloartenol-C24-methyltransferase	<i>Oryza Sativa</i>	97
621	putative leucine rich repeat containing protein kinase	<i>Oryza Sativa</i>	99
622	putative 40S ribosomal protein S12	<i>Oryza Sativa</i>	100
623	putative heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	<i>Oryza Sativa</i>	67
624	allene oxide cyclase	<i>Oryza Sativa</i>	95
627	inducible phenylalanine ammonia-lyase	<i>Triticum aestivum</i>	96
628	B12D-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	63
629	immunophilin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	77
635	putative RNA-binding protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	60

2) 벼 고친화성 인산 운반체 genomic DNA의 분리 및 구조분석

벼 고친화성 인산 운반체 genomic DNA를 클로닝하여 분석한 결과 OsPT5를 제외한 나머지 유전자는 인트론을 가지고 있지 않아 cDNA와 같았으며, OsPT5는 500bp 정도의 인트론을 가지고 있었다. 이들 10종의 벼의 인산운반체 유전자들은 약 1.6kb

정도의 크기이며, 단백질의 크기는 약 60kDa 정도인 것으로 계산되었다. 특히 이들 단백질은 아미노 말단, 카르복실 말단 그리고 중앙부위를 제외하고는 전체적으로 매우 유사한 전형적인 gene family의 특징을 하고 있다. 이들 유전자들 간에는 매우 높은 유사성이 있었으며, 아미노산 서열의 60, 200, 280 및 c-terminal 부근은 유전자들 간에 유사성이 매우 낮은 것으로 나타나, 유전자들에 따른 다양성이 인정되었다.

분리한 10종의 OsPT 유전자들의 promoter의 특성을 조사하기 위해서 각각의 genomic clone을 분리하여 직접 sequencing 하거나, 공개된 rice genome data base를 이용하여 10종의 OsPT 유전자들의 genomic sequence를 확인하였다. 특히 promoter 영역을 조사한 결과, SSH 방법으로 분리한 WRKY, MYB 등 전사조절인자가 결합하는 cis-element 부위가 대량발견 되었다. 이러한 결과는 OsPT 유전자의 발현이 WRKY, MYB 등 전사조절인자에 의해서 조절될 가능성을 시사한다. 현재 이러한 가능성을 조사하기 위해서 WRKY, MYB 등 전사조절인자가 대량 발현되는 벼 형질전환체를 제조 중이다. 또한 인산 농도의 변화에 민감하게 반응하는 OsPT1, OsPT7, OsPT8의 promoter를 분리하여 GUS reporter 유전자에 연결된 construct를 제조하여 실험을 수행하였다. 이러한 형질전환체는 논 토양의 유효인산 농도가 벼 생육에 적합한 가를 쉽게 GUS 발현을 조사함으로써 관독 가능하므로 인산비료의 시비시기와 농도를 최소화하는데 매우 유용하게 이용될 것이다(그림 31).

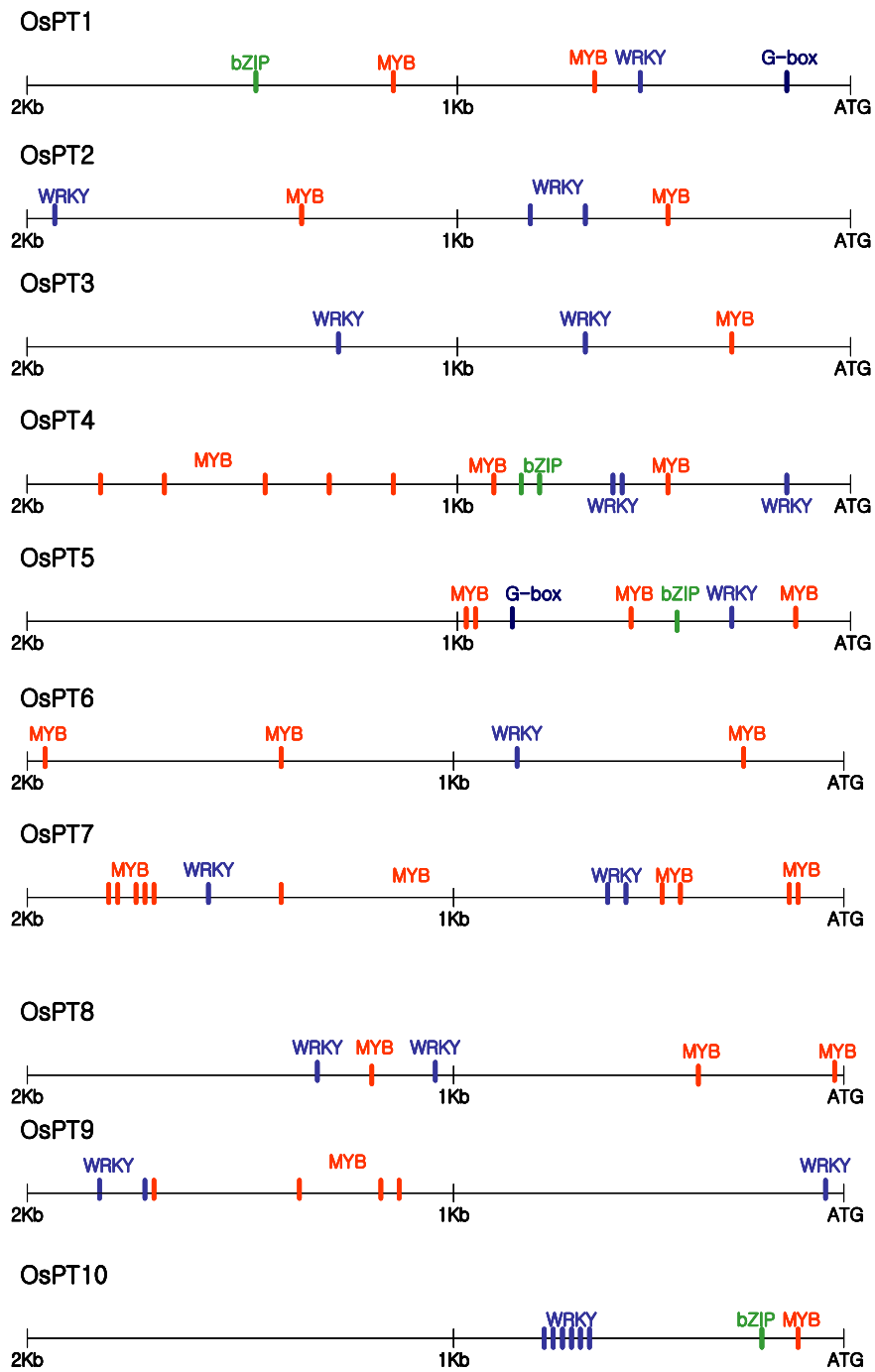


Fig. 31. Cis-elements in rice high-affinity phosphate transporter promoter region.

고친화성 인산 운반체 유전자의 염색체상 위치를 분석한 결과 OsPT5는 벼의 1번 염색체에 위치하고 있었고, 인산 결핍에 의해 강하게 발현하는 OsPT1, OsPT7, OsPT8 유전자는 3번, 4번, 8번 염색체에 위치하고 있었다. 그리고 3번과 4번 염색체에는 3개 이상의 벼 고친화성 인산 운반체 유전자가 위치하고 있음을 알 수 있었다 (그림 32).

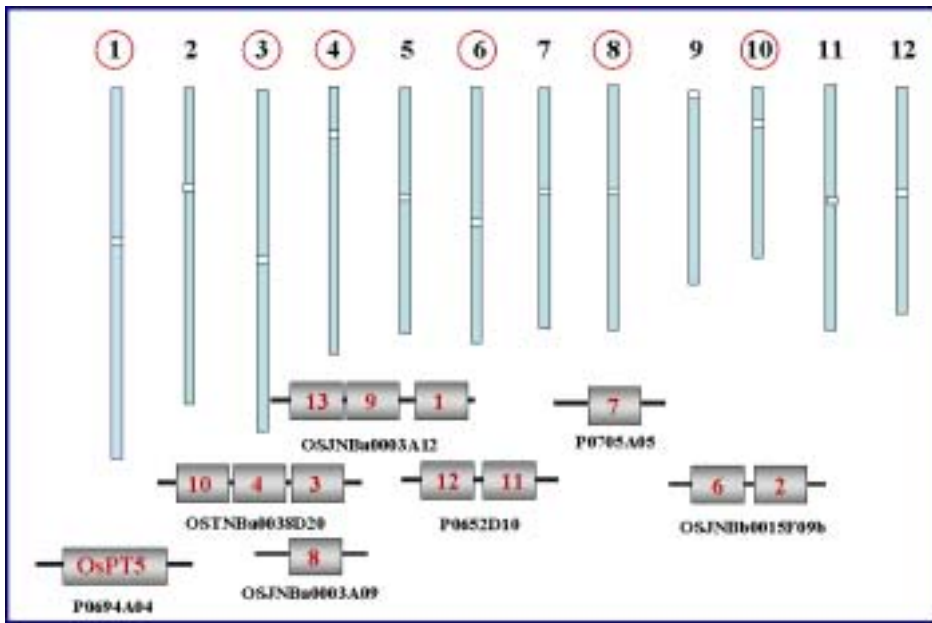


Fig. 32. Chromosome location of OsPT genes

벼 고친화성 인산 운반체 유전자의 genomic DNA의 coding 및 promoter 영역의 sequence는 다음과 같았다(그림 33-42).

```

OsPT1
12361 GCTGCCCAAATTTCCAAAGATATTAATGTAAGTGGATTGTTTGACTAATCTTATTCTTATAGG
12421 AGTATTGCATTAAGGAGAAACAAATCCGAAGCGATGACGTGGCTCTTTCTAGCTAGTTTGG
12481 TCATTTGCCCTCCCTATAAATACCATCCATGTGTACCTTTGCCATCGGTTCTTCAGAGTTAC
12541 AGTGCCTAACGCCCTGCAGCAGAGTGCAGCGACTCCCTCGAAGAAAATGGTATATTAATAT
12601 CAGGTGTGTATATATTTTCAATTTTATTCTAGTAATACTAATTAATGACATGCTATATAT
12661 GTCAAATTTTAAAGTATATACTGTAAATGGAAATTTAAATTTTCATATATTCACAAATTTT
12721 TTGCTCATGGAACTATGCCCTCAAGGCAGGATGTTGTGTAGGGGTGTAAATTAATGATTTG
12781 CATTAAGTTGCCCTCATGAATCATGAAAAATTTCTTCATAAAATCACAACAAGAGAGC
12841 CTTTTGTGCCCTCTTTTACGCCATGCTAAAGTCAAGAAAGTTCAACAAAGCAACCAACA
12901 GATTTCTTTTCTGAAAACATATGAAATTCAGAAATTTCTGTGCAATTTATCTCATGACC
12961 TAAACAAGACGATGCTTGGCCACGAAATAGAAAGACAAAGATAGTTTCGTCAATTCGAG
13021 AAGTTTGTCCGGAACAATACTGATGATAGCGGCAAGATTTGCATGATTCATGAAATTTGT
13081 AAGTAAGGTGCCAATCTTGGTTGCAAGATGCACTCGGATCCGGCTATCTAGCTTCAAC
13141 GAGAATCCCATCTCTGCTCTCTAAATTCAGCCAGAAACTGAATTTATGTAAGATTTT
13201 CTCGAAATTCAGACATTTTTCATCTGGATGGATCGGGATTTGGCTGATAAAGCTCGGA
13261 TTTGAAAGAAACAAGAAATTTTGTATATGATATCTTGAATTAACGAGGAGTTTCTGAAG
13321 TAGTGGCATGCTCTGTTCCAGATGCTCTCTGAATTTCTGTTTCACTTCACTGAGCTT
13381 ATTGTTGCTGAACTGAAACGAATATTAATCTTCTCTGTAAGCAGCTGCATTCTGTAATTTT
13441 CTTTTGCTCAGTTCCGACACGCATATACATCTGAGGCTAATTAAGCTCAATTAATCGCCG
13501 TTTGCTTAAATTTCCCAAATTAATTTCTTCTGTTCAATTCAGAAATTCAGGAGATTTG
13561 TCGAAATAAATACTTGTGTTCACTTATCTCTGAAAAAATTTGCATATTCAGAGTAC
13621 CTGAGATTTGCTCCATGGCCGGCGAGCTCRAAGGTGCTGACGCGCTCGACTCGGCCRAAG
1201 AGACGCAGTGGTACCAATTCACGGCGATCGTGATCGCCGGCATGGGTTCTTCACCGSAGC
1261 CCTACGACCCTTCTCTCATCTCCCTCGTCACCAAGCTGCTCGGCCGCACTACTACTTCA
1321 ACCCGGCGTCCRAAGGCCCGGCTCCCTCCCGCCCAAGCTCTCCCGCCGCTCAATGGCG
1381 TCGCCTTCTCGCGCACCCCTCGCCGGCCAGCTCTTCTCTGGTTGGCTCGGCGACRAGTGG
1441 GCGCGAAGAAAGGTGTACGGCATGACGCCTCATGCTCATGCTCATCTGCTGCTCCGCTTCG
1501 GCTCTGCTTCCGGCTCTGCGCGCAAGGCGCTCATGGCCACGCTCTGCTTCTTCCGCTTCT
1561 GCTCGGCTTCCGCGCATCGCGCGCACTACCCGCTCTCGCGCACRATCATGCTGGAGTACG
1621 CTAAATAGCGCACCCGTTGAGCGCTTCTATCGCCCGTGTTCGCGCATGCAAGGCTTCGGCA
1681 ACCTCACCGCGCGCATCGTGGCGATCATCGTGTCCGCGCGCTTCAAGTCCGCGGTTCCSAGC
1741 CGCCGGCTACGAGGACGACCGGACCGGCTCCACCGTCCGCGAGGCGCACTACGCGTGC
1801 GCATCGTGCCTATGTTCCGGCGCATCCCGCGCTGCTCACCCTACTACTGCGGATGAGAG
1861 TGCCGGAGACCGCGCTACACCGCGCTGGTCGCGCAAGACCGCGAGGACAGGCCCGCGCGG
1921 ACATGACGCAAGGTGCTCAACGTCGAGATCGTGGAGGAGCAGGAGAGGCGTACGAGGTCG
1981 CGCGCGCGAGCGATTCGGGCTCTTCTCCCGCCAGTTTTTGGAGCGCCATGGGCGCCACC
2041 TGC TGGGCACGCGGTGTGCTGCTGCTGCTGCAATCGCCTTCTACTCTGCGCAACCTGT
2101 TCCAGAAAGCACTACACCGCGGTGCAAGTGGCTGCGCGAAGCGGACACCAATGAGCGCC
2161 TGGAGGAGATGTTCAAGATCTCCCGGCGACAGACGCTCGTGGCGCTGTGCGCGCACATTC
2221 CGGGCTACTGGTTCCCGCTCTTCTTCACTGACATCATCGCGCGCTTCCGTCATCCAGCTCG
2281 GCGGCTTCTTCTTCACTGACGGCTTCACTGCTCGGCTCGCGCTGCGCTGCAACCACTGGA
2341 CGACGCCGGGACCACTACGCTTCTGTTGTCATGTAAGCCTTCACTTCTTCTTCTCGCRA
2401 ACTTCGGGCCCAACTCCACGACTTCACTCGTGC CGCGGAGATCTTCCCGCGAGGCTGCG
2461 GTTCACCTGCCCGCATCTCGCGCGCGCGGGGAAAGGCGCGCGCATCGTGGGCTGCTG
2521 TCGGCTTCCGTACCGCGCGCAAGGCAAGGCGCGGACGAGCAGAGCGGACGCGCGCTACCCG
2581 CGGGCATCGGCGTGCACACTCGCTCTTCTTCCCGCGGATGCAAGCTCATCGGCTTCT
2641 TCTTCACTTCCGTTGCGCGGAGTCCAGGCGGAGTCCGCTGGAGGAGCTCTCCCGCGSAG
2701 ACGAGGACGATGACGATGTCGCGGAGCGCCCGCGAGCGGCGATCACCGGACGTCGCGCG
2761 CGCCCGCGCTTGATACCCCGCGCAAACCAAATGTCATCATCAGTGTCTTGTGT
2821 AATAATGTGCAATGATGATTTCTGTTCTGCTAGTGTCGAAACAAATTAACAAT
2881 ACTAGTCTCAAGCCAGGCAACGCAAGGTTACTGTTGATATTAATAAGTGCACCTTAGAT
2941 TAGTATTAATAATTTTCTAAAATTAATGTTGCTTAAATTTGTAARAAAGATAAT
3001 GCGGCTTAGATTCATGAAATTAACATCACTGCCATCAATTCACCTTAGTCCCATTT
3061 GATTTGAAAAAATAAAGGAATTTTGGATGGTTTTAAATCCATCAAAAAATTTGCTAT
3121 GAAGGCAATTTGAACAAATCCCTTGGAAATTCATAAGATTCATTAATCTATAGATTT
3181 TGGAAAAATTAAGCAATGTTCTAACCTCTTTGAAATTTGAAATTTCTTTGAGTA
3241 TATCTCTCTGCTCGAATTTCTAATTTTTCTGCGGTCCAATCAAATCTGCTTCTAGT
3301 TTTTTCTAGTATTTGTAATCATCTTTTTGCACTTGCATTCATATCAAGAAATTTCTGCTT
3361 TTTTCTATTCACTATTTTTTCATTCATGCTATTCAAATGGACCCTTAAAAATTAATGTT

```

Fig. 33. OsPT1 genomic DNA sequence.

OsPT2

1981 **CTRTATAC TACAGT TTAATT TGT TTT TTT TATAAC TTG TAAAAG TTA AAT TTGAAC TTGT**
2041 **ATGPTTGT GAAGTC ATATAT TTC ATATTAATCAAT TTTATCATT TTT TTA TAACTGTTTA**
2101 **GTAAACAT GTAAGAAAC GAGTGAACG TTC ACT CGGGAGATT AAAATC CAT CTT CTT CGGT**
2161 **ATACT AAAAGC TTT TAGCGT GAACTGATT GAAAAAAT CATACA TACAAT AAA TATATTG**
2221 **TATAT CGCATATTAATAAGT CAGCGT GCGAAGTGC TTC TGGGAT GAA CCGATC GGT GACC**
2281 **CGAGCGCGTGC GTT CGGCA CCT ATCAA CCC TTG TAC ACAAGC GCATGGCCC CGCGTGA**
2341 **GATTCGTGCGT TTT TTC TTC CCT CTC CAT ATTACAGTGACAACC AAGCAGGCGTGC CAAA**
2401 **TC CACTGGACACCGCCAAGT CGGCTACCA TTC CTGCGC CTACATATA CCGCGG CAT CTC**
2461 **CGCGC CAT TGC TGT GCC CAGAGAGCT CGACACAAA TACAGGGGACT CGT CTT CTT CCC**
2521 **GAGCT TTGCGAGCAGAGT CGTTCAGC CRTGGCGGGCAGGAGCAGCAGCGCACTGCRG**
2581 **GTGCTGAGCGCGT GAGCGCGC GAGGAC GCAGTGGTACACTT CACGGCGT OGTOGT**
2641 **GC CGC CRTGGCGT CTT CACCGCGC CTACGACT CTT CTG CRT CTC OCT OGT CAC CAG**
2701 **CTGCT OGGCG CRTCTACTAC CACGCACT OGC CAGGAGGAAOCC OGGCAGCCTGCCGCC**
2761 **AAOGT OGC OGC GCG GGT GAAOAGGT OGC GTT CTG OGGC CAC GCT GCG GGGCAGCT CTT**
2821 **TT OGGTGCT OGGCGACAGCT OGGCGGAGAGCGT OGGCGGAGAGCGT GTA OGGGT GAC GCT GCT**
2881 **RTGGT CRTCTGCT CRT OGC GTC GGGGCT CTC GTT CTC GCACAC GCC CAC CAGOGT CRT**
2941 **GC GAC GCT CTG CTT CTT OGGGT CTG GCT OGGRT OGG CRT OGGCGGCACTAC OGC GCT**
3001 **TC GCGAC CRT CRT GTC GAGTACGC CAC CAGAGAGC OGC OGGCG GTT CRT OGC OGC**
3061 **GTGTT OGC CRT GAGGGGTT OGC CRT OCT OGC OGGCG CRT OGT CAC OCT CRT CRT CTC**
3121 **TC OCGTT OGC OGC OGGGT OCGGCCGCCGCC GTRACGAGCAGC OGC OGC GGGCTC CAC**
3181 **GT OGC CGGC OGC ACTAGT GTGGCGGT CRT OCT CRT GCT OGGCG CRT GCCGCCGCT**
3241 **CTC CACTACTGCGCGGT GAGGT GCC GGAGC GCC GCGCTAC CAC OGC OCT OGT OGC**
3301 **AGAGCGC CAGCAGGC OGC OGC OGC CRT GTC CAGGT GCT OCGGT OCGRT OCGAG**
3361 **GAGCAGGAC CAGCT GGAGCAGT GGT GAC OCGGAC CAGC CAGCTT OGGCT CTT CTC**
3421 **OGCAGTT OGC GCG OGC OGC OCT OGC OCT OGT OGGC CAC OGC CAC GAC RTG GTT OCT**
3481 **CT OGC CRT OGC CTT CTAC CAC CAGACT GTT OCGAGGAC CRT CTT CAC CAG CRT CAC**
3541 **TGGT OGC CAGGC CAGAC CRT GTC GCC GCT GAGGAGGT GTT OGC CRT OGC GCGGCC**
3601 **CAGC GCT CRT OGC OCT GTG OGGC CAC OGT OCGGGCTACTG GTT CAC OGT CTT OCT CRT**
3661 **GACRT OGT OGGCGCTT OGC CRT OCGCT GCT AGGGT TTT CRT GAT GAC OGT GTT CRT**
3721 **CT OGC OCT OGC OGT GCC GTRACCA CCACTG GAC GAC GAAGGGGAA CCA CRT OGGCT OGT**
3781 **GT CRT GTRAC CTT CAC CTT CTT CTT OGC CACTT OGGGCC CACTC CAC CAC CTT CRT**
3841 **GTGCCGCC GAGGT CTT OCGGC GAGGCT GCGTTC CAC CTG OCGGG CRT CTC GCGGCC**
3901 **CGGGGAGGCC OGGCGC CRT CRT OGGTC GTT OGGGT OCT GTAGCG GCGCAGGACCG**
3961 **CACAGCC OGC OGC OGGTACCAACC OGGGT OGGGT GAGGACTC GCT GTT OGT GCT**
4021 **GC OGGRT CCACT GCT OGGGT CRT CTG CAC GTT OCT OGT GCC GGAGTC GAAGGGGAG**
4081 **TC GCT GGAGGAGT GTC OGGCGGCC GGAGGACGACGACGAGGT GCG OGC OGC OGC**
4141 **GCTGCGC OGC OGT GCGGCCGACGAC GCGGTAGTGT GAC TGC ACC TGAATA TAGTGA**
4201 **GGTTT TAC TTAATT TACTTACTGTTATTA TTAATA TAC TCC TAC TTGTGT TTGCTATGT**
4261 **GA AAT TCGGAATCA TGAACC CATGAT CAT GTT TTGTTAGGT TAGGAGCCAAAGAAATG**
4321 **TG TGT AARTACTT CAATTA TGTAAA CTC TGT TTT TAACTATT GCC CAC TTGAGGAATA**
4381 **AT TCT TGCAGAC CAGCARTT TGGCAGCAATAC RTTTA TAA TTGAAC TAC CAC TCTACCA**
4441 **GAGTACTAC TACTA RTTT GCC TTAGAGAGGACAATGAGATCT TAAAT TTT CAATTA T**
4501 **GGCTGTGT TGAGTT CAGCGTAAA GTT TAGATT TTGTT GAAAT CGAGAT GAT GTGACTA**

Fig. 34. OsPT2 genomic DNA sequence.

OsPT3

421 CTGCCAGCCGATCTGACACCCGTAGAAT TCTAAACAGTGGGAGGCCATAAGCTGATATG
481 CATAGATAGTTGAAAGT TAAATTT CACATT CCACGATCC TGC AAA TAGAAT AACATTTGAC
541 TTCTGTACGGGCAT TTTAAAGACAATATA TGT CAC TAT CTGCTT GCAATC TACAGTATGT
601 ACCGTACATCCAAT GCACTAGAAAGAAAA TCT TTT TTC TCCAAC CAT GCCCTGCTGTAT
661 CCTGTCCGGAC TGC CCT GCGGCTATA TATACAGCACCATGGCAA CAGAGATGAGGAAACT
721 AACAGACACACAGCGATCCCTCTGCTC TCT CTC CGGAGT CAACCCATC CTC AAT CTT C
781 CCAAGCTACTCAAC CCT CTC TCC TGCATC TGAGTT CCA TGT TAG CAGAGATGC TAGATT A
841 ATTAGTGT TCGGT TTAGCCTTT CAGGAAAC GTT C TACTGAAT ATT TGT TGAATCATAT
901 GCCTAATATTA TTA CCC GCCAATAAGATT AGT TGT GCAAACATG TGC TTC TACTAT TTAG
961 TACAGTACGCATTA AAAATG GACACA CCC CTATCT ATT GAAATT TCAATT ACT GAGCGGT
1021 AAATCATGAAT TCT CAATCT CAACAGTGC GAAACC TGA AAT TTC TCT GTT CAATTAACAT
1081 TCAACGATCTAGTC AGATATAAATGGAGA TGC CTAGGT GAAGAA TTT TCT GTT CTT TTGT
1141 GATAT GTT GTC TGT ACTAAGCAAAGC TTA TAACTT TGCAGC TTGAGGAAAAAGATCATC
1201 **ATGGCGGATCGACTCAGCTTTGGT CAGCTCGACCGCC CAGAGC CAGTGTAC**
1261 **CATTTCTTGGCGTCTGTCTTGGCGGGGTTCTT CACAGCGCCTAGCACTCTT**
1321 **TGCTTGGCTGTCTTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
1381 **ATCCAGGGACTCTCCGCCAAGCTGTCGTCGCGCTCTTGGGCTGCGCTCTGCGGC**
1441 **ACGCTTGGCGGCGCTCTTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
1501 **TTGGATTCAGCTCTTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
1561 **CACACGCC CAGAGCGTGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
1621 **ATGGCGGACTACTCCGCTCAGCGC CAC CTT CTT GTC GGAGTACGCGAGCAGAGAC**
1681 **CGCGGGCTCTTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
1741 **ATGGTGGCTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
1801 **CAGAACCCGCGCTGCTGCTGCGCGGCTGACTACAGCTGCGGCTCTTCTTGGTCTTGGT**
1861 **TTGGCAGCTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
1921 **CGGTACAGCGCTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
1981 **CTCCAGCGCAGCTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2041 **ACCTGGGGCTCTTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2101 **ACAGCAGCTTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2161 **ATCTTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2221 **TACCGCTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2281 **TTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2341 **ATGCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2401 **CACACAGCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2461 **ATCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2521 **CAGCGCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2581 **TACCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2641 **ATCGCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2701 **CCGGAGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2761 **GCCAGCAGCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT**
2821 **GA A A A A A A T G T A T G C T T T A T T A C T C T A T T G G T G T G A T T A C T T A A T C T A G T T T T G T A T A C T**
2881 **T T T C T A G T G T C T C T C T T T A C A C T T G T G A T T T G T G G G T T T C T C T T T T T T T T T**
2941 **T T T T G G T T G A A A C A T T T A A C T T G T T G T G A G A T T T T G T G A C T T T C C T G C A C T G T A**
3001 **T A A A T G C C A T A C A T T C A A T T G T A T T G T A A A T G C C G T G A G C G C T T T G C A A A C C G C**
3061 **T A A T A A T A T T G T T A C A C T T T C G T T A T T T C A A T T G A C T A A T T T C T T C G T T T G T T A T G T**

Fig. 35. OsPT3 genomic DNA sequence.

```

0:PT4
1321 GGCAGAAATTCCGAGTAGGTCGGCAGCGCAGGAGGAGGTTGGGGAACTCCGGCGAAAAT
1381 ATCGGCCTGTGGAGCTATACGCCGGAGAAAGGAAAGTGGCCATGGGGCCACCATTAGCAAG
1441 TGGGTATGGCTGTCAAGATTTGGCTACGTTTGGCTGGAGCAAAGCAACCAAGGGACA
1501 CAACGAGGTGAAAGATTATCTCGAGGCCTAAAAGGTGAAAGATGGCAATTCGCGGGAGC
1561 TATAGCTAGCTTCTCCAGNACTTCTGCTCCATATCTTGTCTGCGTCAAGAGCCATGCAA
1621 ACAAAACAACACACTCTCTGCGTCAATTCGGGGAGTATGTTTCGCTCGCTAGGGCAT
1681 GCACTGCTTCAGATTTCTCGCAGGAGTTCATTCGTCAGAGAGCTTCGCTGGAAATTTCT
1741 CGACCTCTTCTCCGATTTGTTGAGCGAAAGGAGCAGTGGTTGTTCTCAAGCTGAAATTT
1801 AGCCTCATGTCAAATTCATCAACAAAAGAGATAGCGAGCAAGCAAGTCTGATTAAGCTAG
1861 GCATGTGCCATGTGGAAGAAACAAAGAAACAAAGAAATTTAAAGCCGGAGAGGCTCAAGGTG
1921 TACTGCAACTACTGTTGCAGCTGTGCTCCACGGCCTACCGAAGGACGCCATAGAACTG
1981 CTTTCATTGAGCCAGTATGTCAGCCAGCCATGCTCTGGCAAAATCCCTACCTGCAATCT
2041 CAACTGGCTGATGATTCATATCAAAGAAAGAAATTTCACTAGCAAACTATCTCGCTAACA
2101 AGTACAGTATGATTAACAATTAAGAAACAAAGCAAGCAATTCAGCTGCTGATTTCAAGCTA
2161 TCCATATCTCTCTCTGTTTAAATAGATGACGCCGTTGACTTTTCTTATCATATTTGA
2221 CCAATTCCTCTTATCCAAAATTTTATGTAATGTTATATAGATTAATCACTTAAGGTA
2281 TTATGATGATATAACTCACTCATATTAATAATAATTAATTAATTAATTAATTTTGAATA
2341 GAGCGAATGTTAAACATGTGAGAAAATAACAAAGCCATCTATCTATTAATAAAAGGAGGT
2401 AGTACTTGGTCTTGCCTCAGCTGTGCTGCTGCTTTCTTCAACCTGCTAATGAGAACTGAT
2461 TGTGTTACGTAATCAAGTACAGTACAGTACAGTACAGTACAGTACAGTACAGTACAGTAC
2521 GTCAGTAAATGATGAAAGATGTCCTGTTAAATATGCTTCAAAGCCGGGAAAGAAAGGAA
2581 CCAAAGCACTTCAGTTTTGCAGTCCGCTCTCTCACTGTCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
2641 AAGAACGGCAACTATTAGAGTTGACTAGTTGAGCAATTCAGCACTGCACTGCACTGCTG
2701 AGTATATATATCTGCTCACTAGTAAAGAAAGTCACTGTTAGCGGCAAGCAAAAGAA
2761 GTTAGATCAAGGAGAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCT
2821 CAACGTGCTGAGCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCT
2881 CATCGCCGGCATGGGCCTTCACCGCAAGCCCTACGACCTCTTCGCAATTCCTCGCTCAG
2941 CAAGCTGCTCGGCCCGCATCTACACCGCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAG
3001 GCCCAACGTGTCGGCCCGCATCTACCGCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAG
3061 TTTCTCGGATGCTCGGCCCGCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAG
3121 TCTGATGCTGCTGCTCGGCCCGCATCTACCGCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAG
3181 CGTGTCTAGCTCTGCTTCCTCGGCCCGCATCTACCGCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAG
3241 GCTCAGCGCCACCATCATGCTCGGAGTACCGCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAG
3301 CGCCGTGTTCCGCTGCAAGGGTTCGGGATCTCTTCGGCCGCAATCTCGCTCGCTCGGGT
3361 GTCGCCGGGGTTCGGCCGCAAGGGTTCGGGATCTCTTCGGCCGCAATCTCGCTCGCTCGGG
3421 GCTCGTCCCGCAAGGGTTCGGGATCTCGCTCGGGTTCGGGATCTCGCTCGGGTTCGGGAT
3481 GGCCGCTCACCTACCTCGGCGATGAAAGATGCCGAGACGGCCGGTACACGGCCGCTCAT
3541 CGCCCGCAAGCGCAAGCGAGGGCCGGCCGCAATGTCAGAGGTGCTGCAACCCAGATTGA
3601 GGAAGCGCCGGCCCGCCGCAAGCGGGTGGCCGCTCGGCCGGCGAGAGCTGGGGCTCTTC
3661 CGCCAGTTCCTGCGCCCGCCAGCGCTCCACCTCTCTCGCCAGCAGCAGCAGCTGCTCT
3721 CCTCGACATCGCCCTTCACAGCCAGAACTCTGCTCGAGAGGACATCTTCAGCAGAGCTCG
3781 GTGGATCCCGCCGGCGAGGACCATGAAAGCGCTCGAGGAGCTCTCCGCTCGCCCGCCG
3841 CAGGGCTCATCGCGCTCGCCGACCATCCCGGGCTACTGGTTCACCGTCCGCAATCAT
3901 CGAGATCATGGCCAGGTTCTGAGTCCAGATCATGGCCCTCGCCATGATGACGGCGTTCAT
3961 GCTCGCCCTCGCCATCCGCTACCGCACCTGAGAGCAGCCGGGGCACCGACCGCCGCTCAT
4021 CGTCAATGACGGATTCACCTTCCTTCGCGCAAGCTTCGGCCCAACAGCAGCAGCTTCAT
4081 CGTCCGGCCGGGATACTCCGGCCGGCTCCGGCTCGAGCTGCGCACCGGCTCTCCGCGC
4141 CGCCGGGAGGGCCGGCCGCTCATCTCGGAGGCTTCGGGTTCTGTCAGCGCCGGCGAGCA
4201 CGCAAGGCCGAGCCCTGGTACCCAGGGGATCGGCATCAAGAAAGCGGCTCTTCGTCG
4261 CGCCGGCACCAACTCTCGGGGAGGATCGAGCTGCTCGTGGGGAGTCCAGGGGCT
4321 GTCGCTCGAGGTTATCTCGCAGGAGGTCGCGCACGGCGCACGAGGAGGGCCGGCCCTCC
4381 GAAGTAAATTTGACCGCGCTGTATCACTCGAGGAGTGGTTGCTCGTAACTATTGCTGCT
4441 ATCTTTTTTCCAACTGTAACTCTATGCTGTCGCTTCGGTACGAGTGGTATTTTTTTC
4501 TTTTTTTGATAGTTTGTAGAAATTCATTAAGTACTAGTTTGTAGTATGTGAGT
4561 GAGATGTTGTATATGTTCTTGAAGATTTGAGGATTTCCCTGAGTTTGAAGGAAATGACATCA
4621 TGTATTTGAAAAGGAAATGCAATGATATGTAATGTTAGGAAATTTGATTTGTA
4681 GCGACCACCGAACATATCAATTTTTTATGTACTCCGTTCTCTGTTCTGAGCTGAT
4741 CAATCTTGTGCTAGTTGCTATTAAGACTACAGTACTAGTAAAGAAATGGAATCA
4801 AAATCGTAATTTGGGACCATATATAAGAGCAGCACTAGGTTAGCAAACTTTGATCC
4861 GCTGTCAGGCGCTGCTGCTGGATTTGGAAGCAAAATGAGGCTGCTGCTGCTGGAAG

```

Fig. 36. OsPT4 genomic DNA sequence

OsPT5

```

1141 CT TGAGGGTGA AATCCCAGCTTTAAGATCGGGCAAAGCCAGCGAGCAGTTTGGTGATCAGA
1201 GGTAGCTAGCTAGCCTCCTAGCACTGTTCCCGCGCGCGAGAGCGCCAGGAGAGGACGAT
1261 CGACGGCATCATCGGAGATGCGCGACCGCGACGGGCGCTCGAACCTGCGCGGTCTGGACG
1321 CGCTGGACTCGGCGCGCACGACAGATGTACACATGAAGCGGATCGTGATCGCCGGCATGG
1381 GCTTCTTACCACGACGCC TACGACCTGTTCTGCATCTCCACGGTG TCCAAGCTGCTCGCC
1441 GTCTCTACTAC CAGCCC GRTGGCTDGNMGGACMGFANGCCAGGGCCTCTGTCCANGMCG
1501 CCANCANCRTGGTCRTGGCGTCGGCTCTGTCGGCAGGCTCRITGGCCAGCTTGTCTTCG
1561 GCTACTTCCGGCACAGCTCGGCCGGANGCGCTCTACGGCGTCACCTCRTCCTGRTGG
1621 CCGCTTGC GGCRTCCGGCTCCGGCTGTGGCTTCGGCAGCTGGCGCANGGCAGTCTRTGGCA
1681 CGCTGTGCTTCTCCGCTTCTGGCTCGCCCTCGGCRTCGCCGGGGAC TACCGCTGTGGG
1741 CCACCRTCTGTCCGAGTACTCANCANGANGMCGCGCGCGGCTTCRTCGCCGGGGT
1801 TCGCCRTGCGGGCGTCGGCRTCRTCTTCCGGGGCTCGTGTCCRTGRTCTCTAGCA
1861 TCTTCTCTACCTTACANCANGGGCGCGTGGTACTANGGGGAC CRTGACCTCTGGANGCAG
1921 TGCCCGGGCTGAC TACGTGTGGCGCRTCCTCTGRTGRTCGCCGGCTTCOOGGGTTGG
1981 CGACCCTTCTAC TGGCGGRTGANGRTGCGGGANGMGGGGGAC TACMGGGRTCTRTGRTG
2041 GCANCGGANGCAGCGCGGACGACRTGCGANGGGTGTGTGTGRTCGAGRTAGGGCCG
2101 AGCAGGGANGCTGGCCAGTTCANCGGGCCANCANC TACCGCTCTGTGGRTGGGT
2161 TCGCCCGGCGCACGGCTGACCTCTRTCGCCAGAGMCCAGTGGTTCCTCTTGCAC
2221 TCGCCCTTCTACAGCCAGACCTGACCAGANGGACRTCTCCGGCTRTGGCCCTGRTCA
2281 GCGCGCTGCCGAGTCAACGCTCTCAGGGGRTGTTCCAGRTATCCANGGCC TGGTTC
2341 TCGTCCCTCTCTCGCCACCTTCCCGGCTACTGGGTCACGTCGCTCTCTGACANGA
2401 TGGCCAGGTACTGTACGACC GTATARRCTGGACACTTGTGCAARTGCARTCGRTGGA
2461 ACRTACACGARRTGARTGARTTCTRTGGTCACATRTGCAAGTACATGATCCAGCTGATGG
2521 TTTCTTCACTGTCCATGTTCACTGTGGCGATGGGCATCTGTAGGACTACCTCARRAC
2581 CCRTCTCTTCTGTGGGGCTCTGTAGGCGCTACTTTCTTCTTGGCCACTTGGGCC
2641 GACAGCACCACTTGGTGTGCGGGCGGACTGTTCGAGCGCGGTGCGCTCCACTG
3001 CCAGCCATCAGTGGCGGGCGGCGANGGCGGGCCATGGTGGCGGCTTGGCATTC
3061 GAGCTCACGTACACTCTCANGTCARRAGCATCANGANGGCGCTCATCTATCTCTCAT
3121 CACCACATGCTGGCTTCTTCTCACGTTCCTGTCCGGAGCCATGGGTCGGTGGCT
3181 CGAGGAGTCTCCGGCGAGGAGGCGACACCGGGCGGGGCGGGGGCGCCCTGGCGC
3241 TGCCARTGCGGGCTTGGGTGAGCGCTTGGRTGTAGCAGGGAGGANGRTTCCCTGC
3301 TTTAGCACCGARTGGCAGACTCCRTGCGAGGRTGRTAGGCTCRTC TGGGRTRTGCATA
3361 CCTACACAATACCACTACCTATACCTACGCAATAA TAGTACTATATTGATATATCTGTAT
3401 TATGAGAGTGGAAA TGGACC AAAATAATGCAATAACTTCARRITGCCMGATGCTAGCTTG
3461 GGAATTTGATA TACAAGTATATACTCCATTACCATGTAGAGTAAATATA TATGTTGAG
3521 TGTGTGCACTCATGCAACAA TAGTATATA TCGTGACCAATCACAA TGTGAGA ACTACTA
3581 GCTAGCAA GAAACTGAGAATGAGAGGGAC AATGCAACTATGCTCTTTACTACTTCGTA
3641 TTAGTGTATGCGTATTGCAAGCAGCTAATCAATCAATCTGTAGTTC TTTCTCTATATGA

```

Fig. 37. OsPT5 genomic DNA sequence.

OsPT6

```

1681 AATACGATTACATATATCAAGTCTAGAACTTGAAACTAGATGGGTGGTTCCACCATATA
1741 TAACTGAAATCTAACTCAATTCATCTCTATTATATAATAGAGATCATTTGGAAGTTTTTAA
1801 TTTCGAAAGAAATTTAAAATGTTCTTTTCGAAATAAAATTTTAAATCAGCCTATCTCTCGT
1861 TGACTCAGATCACTCCAAATCATCATGTCCTTAACTCCGGAAAGCAGCATTAACTCAATAAAA
1921 ATCTCAAGCAAGTGCATCTTAGCTCACACCTACTATAGTACATTAATCTCTCTAGGGTT
1981 ATACTATATATTTGCACTGCACTAGCTGCTTCTGCTAGCTCGGTGAGGAGCAAGACGAAAC
2041 GAGGCTACGCTCGGCGCAAAATGCGGACGGGCACTCAAGCTACTGACGACCGCTGGACTAT
2101 GCGAGGACCGCACTGCTATCTATTCATGCGGATCGTATCGCCGGCATGGGCTCTTCAACC
2161 GAGCGCTACGACTCTTCTGCACTCCCTCGCTCCCAAGCTGCTCGGCGGACTCTACTACT
2221 ACCGACTTCGCCGGGACAAACCCGGGAGCTGCGCCCAAGCTGTCGGGACGGGTAAC
2281 GCGCTCGCGCTGTGCGGCACTGCGGGGCGACTCTTCTTTCGGGTGGCTCGGCGACAAAG
2341 CTCGGCGGAAAGAGCGGTACTGGCTTCAAGCTGCTGCTCATGCTGCTGCTGCCGCTCGG
2401 TCGGGCTCTCGTTCGGGCGCAAGCGGAAAGGGCGTCTCGCCACGCTCTGCTCTTCCGG
2461 TCTGCTCGGCTTCGCACTGCGGCGGACTACTCGCTGTCGGCGGACGATCATGTCGGAG
2521 TACGCCAAGAAAGAGCGCGGGGCGTTCACTCGCCCGCTGTTTCGGCATGCAAGGGTTCT
2581 GGCATCTGTTTCGGGCGCACTGCTGCGCTGCTGCTGTCGGGCGGGTTCGGAAAGCGTACT
2641 CCGGCGCGCTGCTGCTGCGGCGGCGCGGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
2701 TGGCGGATCATCTCATGTTTCGGCAAGCTCGCGGCGGCTCACTACTACTGCGGCACTG
2761 AAGATGCTCGGAGACGGCGAGGTACTACCGGCTCACTGCGCGGAAAGCGGAAAGCGGCG
2821 GCCGACTGTCGAAAGGCTCTGACACGGGATCTCAGGAGGACGCGGACTGCGCGGAGGCG
2881 GTCGCCCGCGGCGGCGCGGCAAGGAGTGGGGGCTCTTCTCGCGGCACTTCTGCTGCGG
2941 CAGGGGCTGCTGCTGCTGCGGCGGCGGCGGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
3001 AGCCAGAACCTGTTCCAGAAAGGACTCTTCTCCAAAGCTCGGGTGGATCCCGCGCGGAGG
3061 ACGATGAACCGCGCTGAGGAGGCTTCTCGCACTCGCGCGGCGGCGGCGGCTCATCGCGCTG
3121 TGGGGCACTATCCGGCTACTGGTTCAAGCTCGGCTTCACTGAGCTGCGCGGCGGCTTCT
3181 GCCATCAGCTGATGAGGTTTCGCCATGATGACCGCTTCACTGCTCGGCTCTCGCGGCGG
3241 TACCACTGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
3301 TCTTCTTTCGCCAATCTGCGCCCAAGCGGCGGCGGCGGCTTCACTGCTGCTGCTGCTGCTG
3361 CCGGCGAGGCTGCTGCTTCCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
3421 ATCTGCTGCGGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
3481 TCAAGCCAGGCACTTGCATCTCGGAACGCGCTGTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
3541 GGCATGCTCATGACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
3601 AAGGAGAACTTCGCCGACGACGAGGAGGCGGCGGCTAGCTCAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG
3661 AAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG
3721 AATTTTCTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
3781 TTGTATGCTTATGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
3841 AAGCTTAACTCTGTTGATATTTGATGCGATTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
3901 TGATGATATTTCTTTCTTATATTAAGAAATAAAGTGTGATGATATTTCTTATTTCTTTCTTT
3961 GCAAAATATTGATTTCTTTGATTAATGATTTTAAAGGTAAGAACTTCAAGAAAGAAAGAAAG
4021 CTATTTTTTTTTAAAAAAAAGGATTTGCTCCAGTTTTTAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG
4081 AACCTCATAAGATGATGATTTATTTGAGAAAGCTCAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG
4141 CTATATACTTAAAGCTCAAGAAAGCTCAAGAAAGCTCAAGAAAGCTCAAGAAAGCTCAAGAAAG

```

Fig. 38. OsPT6 genomic DNA sequence.

OsPT7

3361 TGGGGGTGAGATCATGTGGTTAGGTTGCAAGGGTGTATGATCTAGCAGCGTGAGCCACCC

3421 CAGGATGAAAGGAGAAAACACATATCGATTTGTTGATGAAAGGGGTGATGCCAGTGTGTG

3481 GAGCGAAAGAGGACAGGGATAGGAAAGGCTTGTCCAGCTTCGCGGGTTCAGCGCTGGCA

3541 GTCCAAAGAGGAAATGCATCAACGCGGTTCAAAGTTGGGACTTGGAAAGTTGGTGGCAC

3601 AAGAGACCGGATCAGGAGAGGGGGAGGCTATGTTAAAATTAGATTGTTACAAAATAACA

3661 ATGTAACTCTGAGCTATTTAATAAATCTATATAAATAAATCATCAGGCAACTAATGAATGGTCA

3721 AGCCGTTATCAATTAATTCGGATGCTAACTCCCTGCCCTTCGATGCCAGGACGGAGTGTAGC

3781 GGGGGCCCTCTGTCGACCATCCCTTGCATAGAAGTTTCTTCTCTCAGTAACTTATA

3841 TTTCCTGTATTTGTGTTTTTTGTTTCTTTTTTTCTTTGACCCTTAGCAACGGCCCTCTG

3901 ACCGTTTGCCTTGTGTAACCAAACTCTGTTGCTTCTTCTAATATATTTGACCTGTGCAT

3961 CATTTCGCGCTTCCGCGAAGAAAATAATGGTTGGATGGTTAAATCTTACTAGAAACGAG

4021 AACAAAGATAGGCTACGCAATTAACAATGCAATGGTGGCATTAGCTCATTAAGGTCAAC

4081 CGACGGAGTACATTTGCTGCATAAATAAGCAACTAGCGTAATATGTGATGTGATGTACTT

4141 CTAAGCTTATAAATAAGTTTATTTTTAGCTACTATATTTGCTTAGAAATAGGTTAAT

4201 TTTTAGAATAAATATTTGATCTGGAGTTTATGAAAGTAAAAGTAAATTTGATTTGGAGTA

4261 CATAAACTGAGGAAATATTGAGATTTGATAAAGTAGAGGATTTTATGTTTTTTTTATTG

4321 GTACGTATGAGATTAATGAAAATAAATTTATTTGGGAAAGGATGTAGTACCTAGCTACT

4381 CTTGTACCACTAGATTAATATAAATCAAAAACAAAGGAGTAGTAGTAGTAAAGAAATGT

4441 AAAACGGTTCAAAATAAAGCAACAAAGGAAAGCGGTTGGATATTGGTTGGGAGGAGAAAG

4501 GAGATTCCTTTGAGTAGGTTATAAATAAGCAAGCAATACATAGTACCTTCAAAATCATC

4561 ACAAGCAAGCAATTAAGCTGCAATGGGCGGCGGCGGCGGAGGAGCAGCAGCAGCTGAGG

4621 TGCTCCACGCGCTGGACGTGGCCAGACGCAATGTACCAATTTCCAGGCGCATCGTGGTGG

4681 CCGGAAATGGGGTTCTTCRCGAGCGCCTATGACCCTCTCTGCACTCCCGCTCCRCRAGC

4741 TGCTGGGCGCGCATCTACTACCGGTCGACGGGTCGCCGTCGCCCGGCGACGCTCCCGCCG

4801 ACGTCTCCGCTCCGTCRACGCGGTGGCCTTCGTGGGCGCGCTCTCAGGGCAGCTCTCTCT

4861 TTGGCTGGCTGGGCGACRAGCTCGGCGGTRAGCGGCTCTATGGCATCAACCTCATGCTC

4921 TGGTGCCTGCTCCCTCGCCTCGCGCTCTCCTTGGCCACRACCCCGACCTCCGTCATGG

4981 CGACCCCTGCTCTCTCCGCTTCTGGCTCGGCTTCGGCATCGGCGGCGACTACCCGCTCT

5041 CCGCCACCATCATGTCCGAGTACGCCRACRAGRAGACGCGTGGCGCTTCACTCGCGCGCG

5101 TCTTCGCGATGCAAGGCTTCGGCATCACTCACCGGCGGCTCGTCCGCACTCCGTCCTCG

5161 CCTCCTTCAGGGCGCGCTTCCCGGCGCTCCCTACGCGAGGAGCCCGTGGCTCCGACCG

5221 CGCCGCAGGCGCACTTCGTTGAGGATCACTACTGCTGGGCGCGCTGGCGCGCGCGCG

5281 TCACCTACTACTGCGCGRCCRAGATGCCCGRAGCGGCGGCTACRACGCGCGCTGGCGCA

5341 ACACCGCCRAGCGAGGCGCGCGCGACRATGTCRAGGTCGTCAGGTTGGTGGAGATGCGTA

5401 ATRTTGGTAAATAGGTTGGCAGCGAGGAGGCGCTTCGGGCTGTTCTCGGCGAGTTGTCC

5461 GCGGGCACGGGCTGCACCTGGTGGGCGCTCGGCGACGTGGTGGTGGTGGACATTCGCT

5521 TCTACGCGCAAGACCTGTTCCAGAAAGACATTTCCAGCGCGTGGGGTGGATCCCGRAGG

5581 CGGCGACGATGAGCGCGCTGGAGGAGCTGTTCCGCTCGCGGGCGGAGACGCTGATCG

5641 CGCTGTGCGGGACGGTGC CGGCTACTGTTCCAGCGTCCGCGTCACTCGACGTTGGTGGCG

5701 GTTTCARATCCAGGCGGTTGGCTTCTTCATGATGACCTCTTCACTGCACCCCTGAGCC

5761 TGCCGTAACCACTGACCGCGCGGGGAGRAGCAACGTCGGCTTCCGCTGCTGCTACG

5821 GCTTCACCTTCTTCTCGCCACTTCGGCCCACTCCACCACTTCACTCGTGGCGCGG

5881 AGRATTTCCCGGCGCGGCTGCGGGCCACGTCGCGGCTCTCGGCGGCTCGGGGAGC

5941 TGGGCGCCATCGTCCGATCCTTCGGGTTCCGTACCTGGCGCAGAGCCCGGACCGGAGCA

6001 AGACGGAGCACGGGATCCCTCCGGGCACTCGGCGCTCCGCACTCGCTCTTCCGCTCGCG

6061 CCTGCRACTGCTGGGCGCTGCTCTTCACTTCCGCTGCGCGGAGTCCRAGGGGAGTCCG

6121 TGGAGGAGATGCTCGGCGAGCGCGAGGCGCAGGAGGAGGCGCGCGCGCCCTGCAACCTG

6181 TACTGTAGCGCTGCTGCCCTGCTGCTATCTATCTATATATATGCAAGATATTAAGCAAC

6241 ATATAATATAACTGATCGATCGAGCAAGGATCGAAGAAACCGCGAGTTGAT

Fig. 39. OsPT7 genomic DNA sequence.

```

OsPT8
1141  GGTAGCCGGAGGATTGACCACGGTGAAGGCTTGGTCTTGATCCGGTACCTCGCCGGGG
1201  AGGGATGACTGGCTGGGGCCCATCCGAACTGGCCGGTGGCTTCATGGCCGGCCGGCC
1261  GTCCTCGTAGACGTAGCCGAGGAGGCGCCCGCAGGCGTCCGACGCTGATGGGGTGGCTT
1321  CCGCTGGATCCCAGTAGTTGAGCTGTCTGAAAGAAAGGGGGGATCTTCTCCCGCCG
1381  GAACTGGAGCCGCGACTGTCCTCACCACGAGAAAGGAGCGTCCCTTGGTGGCCGGCTC
1441  GAACTAGACCCCTCCGGGTATAGCTGGCCGCCGTGAGGTTGAGGTCGCCCGGCACTC
1501  CGGCACTGGTACTGTGGCCGCCGCCGATGAGGACCGCATCCCGCCGGCCACCCGAG
1561  CACGAGATCTTCTGCTGGTCCAAACGATGGATCTGGTAGTTGAGTGAATTTTGTTC
1621  AATTAGGGAAGATGATTTCTAGGGAGGACACGGCCACCGGAAAGCGAAGCCGCTTGGACT
1681  GGAATTTCTTCTACGACCATGAGAAAGTTCTTCTATGGTGAAGATCAAAGCCAAAGAC
1741  CCATGTTTTTTGAGTTTCCAAATGTTTCCAGACGGAAATACGGTGGGGCCATTCAGGT
1801  CCAGTTTGTTTTGGATCGCCCGCCCATTAAGCCGTTGCTTCTCTCTCCGTTCCGTGT
1861  TCTACGAGATTTCTTCAACAATCAATCCGAATTTTGGAGCAGAGTTGTTACGAATTTGT
1921  ATCGGCAAAACATATCATGTGTATCATGTGATCATCAGAGTATATACATAACAAGTAA
1981  AAAATCTGACGGTTTCCAGCTCTCTGTGTAGTACGGCCGATAGCTAATGGGATATGGAT
2041  CCAAAAACGCGAGCCATGGGATTTGGATCGAGCCCGTCAAAAATTTTGGCTGGAAAG
2101  GAGCGAGAAAGCTTTCATTTCCCGGAAAGAAATGAAAGATATGAACTCGGAATATTTCT
2161  GCTTCACTGGCTATACATAGCAACCAACCACTGTTCCATCTCTCTGTAGCTCATCTCC
2221  TCGCCGCAATTAAGAGGCAAGGAGGTTTGTGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGCTT
2281  TGACCGCCGAGCAGCAGCTCACCGCCATGGCCGGCGRTGAGATGACCGTGGCTCCCGC
2341  CTTGGACAGCGCCAAAGACGAGTGGTACCACCTCACCGCCATCGTATCGCCGGCATGGG
2401  CTTCTTCCACGACGCCCTGACCTTCTGTCATCTCCCTGTCACCAAGCTCATGGCCGG
2461  CGTCCTCACCGCCGACGGCGCTCCAGGCGGGCGAGCCTGGCCGCCCAAGCTCTGGC
2521  GGCCGTGACCGCCGTCGCCCTTCTGGCCACGCTCACGGGGCAGGCTCTTCTGGGGTGGCT
2581  CGCCGACAGGGCTCGCCGGAAGAGCGTCTACGGCATGACGCTGCTTGGATGATCATCTG
2641  CTCCGTCGCCCTGGGGCTGCTGCTGGGGGACACGCCGAGGAGCCTGATGGCCACGGCTCT
2701  CTTCTTCCCGCTTCTGGCTCGGCTTCCGGCATCGCCGGCGACCTACCCGCTCAGCGCCAC
2761  CATGCTGGAGTACGCGACAGCGGACCGCCGGGGCTTCATCGCCGCCGGTGGTTCGGCAT
2821  GCAAGGGTTCCGGATCTCTGCCCGGGCGGGTGGCGATCGGGATCACCGCGATCTTCAG
2881  GAGCCGGTTCCCGCGCCGCCGTTGCCCGCCGACCCGGGGCGCTCACCCCGCCCGAGG
2941  CGACTCGGTGCGGGCTCATCTCATGTTCCGGCGGCTTCCCGCGGGCTCACCTTCTA
3001  CTGGCGGATGAGGATCGCGGACGGCGCGGTRCACCGCCATCGTCCCGAAGACCGCGG
3061  GCGCGCCCGCCGACGATGTCAGAGGTCTCAGGTGAGATCACGGCGGAGCAGGGCGGA
3121  GATGGCCCTGCCGGTGGACAGCCCTTCCACAGCAAGCCCTTCCGGCTCTTCTCCGGCGA
3181  GTTCCCGCGCGCCGACGGGTTCCACCTCTGGGACGAGCTCGACGCTGCTCTCTGGA
3241  CATCGCTTCTTCCGACCTGTTCCGAGAGGACATCTTCCAGCGCCATCGGGTGGAT
3301  CCGGAGGCGAGGACGATGAGCGCGCTGGACGAGCTGTACCATCGCCCGCGCGGACGAC
3361  GCTGATCGCCGCTGCGGGGACGGTGGCCGGGCTTCTGGTTCACGGTGGCGCTGATCGAC
3421  GCTCGGGCGGTTCAAGATCGAGCGGGCGGGTTCCTGATGATGAGGGCTTCTATGCTGG
3481  GCTGGCGGGTCCGCTGACCGCTGAGCGGGCGGGGACCGATCGGGTTCGTGGTGGCT
3541  GTACCGCTCACCTTCTTCTTCCCAACTTCCGGCCGACCGGACGACGTTCTATCGTGGC
3601  GCGGAGATAACCCGGCGAGGCTGCGCGGACGTCACCGGAGATAAGGGCGGCTCGGG
3661  GAAAGTGGGCGGATCTCGGGTCTTTCGGGTTCTGTRCCTGGCGGAGGCGCCGTCGCC
3721  GGCCAAAGGGCGCGGCGCCGCTCACCCGCGGGCATCGGCTCGCCACCTCGCTTCCG
3781  GCTCGCCGGCTGACGCTTCTGCTGGCTTCTCTCTCACCTTCTTGTGGCGGAGCCCAAGG
3841  CAAGTCGCTCGAGGAGATGTCAGGGAGAACGAGGTGGCCGAGCCGTAATCACCCGTTA
3901  ATTCACCCCGTCCGCTGCAAGCAGGATCGATGCAATGCGGTGGTTAGTCCACCTGAG
3961  ATTTTGTCTCTTTTTCAGAAATCCATGGAAATGATATGTTCTTTTTCCTGAGAA
4021  TCCATTAGAGGCTGGATGATGAAATATGAGCCGCAATTAATTTGTTGACGACAAATGAT
4081  TTAGCATTAGGTGAGTTTTCAATATGAAATATCATTAGAGTTCATGCTGATTCGT
4141  TTCGGCAGAGGATCTCTGCTGCTTCTTTTCTGTTGATTTGATGATGATCAAGAGC
4201  GATCTTCTTCAAAAACAAACAGATGCTATCTCTATATATCAAAAAGAAAAGATAT
4261  TTGATGTAACAATTTCTTAACTACTCATTTGACAGGCTTGGAGAAAGCTTCAACA
4321  CTGCTCAGGCTCAACAGGGCTTCTATTTGGCCCGCTCTGCTCACTTCAACCAAGG
4381  CCCAATCTGCGCTTCTTGAATGACCTGCTGAGGACAGTGAACCTGCTACCATG
4441  TCTCAGAAAGGAGCAGGCTTTTTTTTGGAAAGGAGGAGGAGGCTTCAAGTTAATCTGTT

```

Fig. 40. OsPT8 genomic DNA sequence.

OsPT9

```

15781 ACATTA CAATAGAACAAACAAGG CAGATTAAATATATATAC CCAATGAAATATTTCCCTC
15841 TGTTCCTTTAATTAAACATTCGAAAGTATAAAAATAGAACTAACCAACGTCAGAAAGTAA
15901 AAAATAGAGGAAA CATATAAACCTAAAGATCAGCATTTAAATACTTTTCTGTATTTTCC
15961 TCCAAATTA CAA GATAATT CACATACAGTA CAACTACTATTTAGTGGAGAAAATAGTT
16021 AATAATGACCTATATGATCAGAGGTTCAAACCTGTATATGTTCTAGACCAITCAACAACCT
16081 GTGC CAAAATACCAATGAGATTATGACATG CATG CATATG CATTG C C C TATAGTATGATG
16141 GTAA CCAATG CATA CCA G C CATAACAAA TTA AAC TTGT C C ATG C AT GAA CAAA CCA GAA TG
16201 TTC CAG GATTTCTTCTA G C TAA TAC CTGTCACTTA CAC CAAATTCCTTGCACTATA
16261 TATA GCTAC AAT AATTCATG C GTG CATGCCATTGCCATTGACCATATGCAA GACTAGTGC
16321 CATAAC AATTTCA CAA TAA CTTAGAGTATTATAT CAAAGATA GTC G C C G C C C C C C A T G
16381 GCTCAGGATCGCAAGGTGCTCGACGCGCTG GACACGCGCAAGACG CAG TGG TACCAC TTC
16441 ACGCGCGTGTGATCGCCGGCATG GGG TTC TCCACC GAC G C C TAC GAC C TC TTC CCA TC
16501 TCCCTCGTCACCARGCTGCTCGGCCGCATCTACTACTTCACCCCGCGCTCCARGACCCCC
16561 GGC TCCCTCCCGCCACAGCTCCCGCCCGCTCAATGGCGTCGCCCTTCGCGGCACCCCTC
16621 CCGCGCCAGCTCTTCTTCCGGCTGGCTCGGCCGACAGAA TGGGGCGCAAGAGS TG TAC G T G
16681 ATGACGCTCATGCTCA TGGTCA TCGTGCCTCGCTCGCC TCCGGCCTCGCTTCCGGTCTGG
16741 GCGAAAGGCGCTCA TGGCCACGCTCTGCTTCTTCCGCTTCTGGCTTGGGTTCCGCACTGGT
16801 GCGGACTACCCGCTCTCGGCGACCACTCATGTCGGGATGATGCTACACAGCGTACCCCTGGG
16861 CGGTTCACTCGCCGCCGTGTTTCGCCATG CAGGGCTTCGGCAACCTCACCGGCCGCA TCGTG
16921 GCCATCACTGTCGCCGCCGCTTC AAGTCGGTTCGACGCGCCGGCGTACAGG GAC GAC
16981 CCGGCCCGCTCCACCGTGC CGCAGGCTGAC TACGCGTGGCGCATCTGCTCA TGTTCGGC
17041 GCCATCCCGCGCTGCTCA C C TAC TAC TGG C GGA TGAAGA TCCCGGAGACGCGCGCTAC
17101 ACCGCGCTGTCGCCAAGAACGACAAAGAGCGCAGCCGCCGACATGCGCGCGCTTC CAAAC
17161 GTCGAGCTGCTGACGAGCAGGAGAGGCGAGCGCGCGCAAGCGCGCGCTGCGGAGGAG
17221 GAGGCA G C A C G G C G C G A G C A G T A C G G C T C T T C C C G G A A T T C G C A C G G C G C C A T G C
17281 CACCACCTGCTGCGCAAGAGCGTGTGCTGGTTCGCTGCTG GACATCGCC TAC TAC TCGCAG
17341 AACCTGTTCCAGAGGAGACATC TACACGCGCGTGCAGTGGCTGCCAAGCGCGGACACCATG
17401 AGCGCCCTGAGAGAGATGTTCAAGATCTCCCGGGCACAGACGCTCGTGCGCTGTCGCGC
17461 ACCATCCCGGCTACTGGTTCA CCGTCTCTTCA TCGACATGCTCGGCCGCTTCCGCACTC
17521 CAGCTCGGCCGGCTTCTTCTCA TGAAGCGCTTCA TGC TCGGCC TCGCCG TGCCGTAC CAC
17581 CACTGGACGACCGCGGGAAAC CACGCTCGGCTTCG TSG TCA TGTATGCC TTCACCTTCTTC
17641 TTCGCCAATCTCGGCCCAAC TCCACGACCTTCA TCG TSGCGCGGAGATCTTCCCGGCG
17701 AGGCTGCTCCACCTGCCACGGCATCTCGTCCGCGCCCGGGAAGATGGCGCCATCTGCTC
17761 GGGTCGTTCCGGTCTTG TACCGCGCGCAGAGCACCGAC CCGAGCAGACGCGGACCGCGC
17821 TACCGCGCGGCA TCGCGCTGCGCAAC TCGCTGTTCTGCTCGCGGATGCAAGCTGCTC
17881 GGC TCTTGTTCACGTTCTTSGTGC CAGAGTCGAAAGGGAGTCCGCTGAGGAGCTCTCC
17941 GCGGAGAACAAA TGGAGCTGAGCTCGCGCGCAGCACTACTCC TACAGG CAGACCGCTC
18001 CCTGACAGCGGACAGTCCGAGTAAATAAACATAAATTA C CCAATTAC TGTATCTGATCT
18061 TGTATACTTCACTAGTTGCATTC TGC CATTCTTGCCTCAGGCTGTATATAATAATCTTC
18121 GAAATTTGCTAC TSCCA TGA CTAGGATTTGGGAA CCA G C A G A T T T T C A C C A T G T T G
18181 TACAGCTTCTCTGATCTCTTCTATGCTCTGCAA GAC C A C C T G G A A T T C T C A C A T G G C A C
18241 CTTGCTGCCCTTCTGATCTCATTTCA CAGATTGGCAAATGAGATRAAC TTTAACC GCTCC
18301 AGAGCAATTGATCTGCGCAATGAGATATGTTCTTGGGCGG CATTG C A T C C A C G T C T T
18361 TTTCACTCTGATGCTTATACCTCTGAGGAGCATG GATGTTCTTCCGAA GAAATTTGGTTAC
18421 AACCTTCAA C T C C A C T C A G A C C A A G A A C A C A G C C A A C C T C C A A G G G C A A A A A A T
18481 GACAGC A A A A C T A G G A A T G C C C A A T T G C A A T T G A A T T T A T T G A A T A A A T T T T A A C
18541 TTC A A A T C T A G G T T T A A A C A A A A G G G A A A A G A A A C T C C A G G T C T A C G A C C A T C G C C T T T
18601 CTGGTAAAGTACCATGTAC C A C C C T A T A G T A A A T T C C A C C T G A T G T T G A T C T T G G A
18661 A G G T G T A A C A T G C C T T A T A A C C A A C C A C T C G G T C T A A G A G G C T T A T C C G C T T C C T C G C
18721 A G G C G G A A G C G C C A A A A T T A A G T G C C C A G T C C T G C T T T T A C A G A T A G G G C A C A G A T T

```

Fig. 41. OsPT9 genomic DNA sequence.

0:PT10
 961 GCAAGAAAAATGTTTTTTTATAATTCAAATTGAC TTGAC TCAATCTCATTATCAAATGAC
 1021 AGAAACACAAATTCATTGCATATTTGCAGTCAAAATCTTTCAGAGTTTCAGATTACAAAAT
 1081 TAGTACATTCAGTGTCAATCTCAGAAACAGGATTCATTGCATATCAGCTCGCCGGCCACG
 1141 GACCGCTTCGAGCCGGCTGGCCGGGACCGCGCCCGCGCCGAGCGGCACAGCGGGAG
 1201 GCGCAGCTCGCCGGCCAGCCGACCATCGAGCCGGCTGGCCAGGACCGCTCGCCGGCC
 1261 GCGAGCGCCGACCGCGGGAGCGCGGAGGACCGCCCGCACATGAAACAGCGGGGGATTTGT
 1321 ATAAAAAACAGATTAGCAGAGATGAGTCCGGCCGATTAAAGTCAAAAGTAGCCTACCTCT
 1381 GTCCTTAGCCATCGGATGAGCATCATGTAATCTTGAATGAAAATTTCCAGGCTTGCACAG
 1441 CAACTCTGGTTTGCACGAGATACGGTCCGATCCGAGGGGGTGCATGCTGCAATG
 1501 GCGTTGCATACGTAATCTCGTTTGTATAACCGAATCGGCTCTTTGCACGGCACGGTTT
 1561 ATCTCGTACTCGAACTCCGATCTGTTATAACCATCGCTTTGGATCGTAGCAGCAGCCGCC
 1621 GACCCAAAACGCAAAACGCAAAACGCGACGCCATGGGAAAGGCGAGGACGAGCAGCTGCGG
 1681 CTGAACCGCGCTCGACCGCGCAAGACGCAATGGTACCACTTCCAGCGGATCATCGCGCC
 1741 GGCATGCGGTTCTTCAACCGACGCCGACGACCTCTTCGCACTCGCTCGTCAACCAAGCTT
 1801 CTCGGCCGCACTTACTACACCGACCCCGCCAGCCCGCAGCCCGGCTCGCTGCGCCGAC
 1861 ATCGCCCGCCCGCGTGAATGGCGTCGCGCTCTGCGGCAACCTCTCCGGCCAGCTCTTCTT
 1921 GGATGGCTCGGCGACAGCTCGGCGCAAGAGCGCTTACGGGATGACGCTGCTGCTCAAG
 1981 GTGATTTGCTCCATCGCCTCAGGGCTCTCCCTCTCGCACAGCCGACGAGCGCTAGGGCC
 2041 ACGCTCTGCTCTTCCGCTCTTGGCTCGGCTCTGCGCATCGGCGGTGACGACCCGCTGAC
 2101 GCCACCATCATGTCGAGTAGCGCCACAGAAAGACCCCGCGCGGCTTCACTCGCCCGCTC
 2161 TTCGCCATGCAAGGGTTGCGCATCTCGCCGGCGGCGTTGTACGCTCGCCATGTCGCGG
 2221 GGGTTCAGGCGCGCTTCCCGGCCCGAGCGTACGAGGTCARTGCGGCTGCGCTCCACCGTG
 2281 CCGCAGGCCGACTACGTCGCGCCATCATCTCTGATGCTCGGTCGCTGCGGCCATCTCTG
 2341 ACGTACTACGCGGATGAGATGCGGAGACGCGCGGTACACGCGCGCTCGCTCGCCAG
 2401 GACGCGAGCGAGCGCTCGTCCGACATGCGCCAGGCTGCTGCGGTTGGAACTGAGGTCGAG
 2461 GAGGAGAGCTCGAGGACATCAGAGGGGCGAGGACGACGCGCTCTTTCGCGCGCGGTT
 2521 GCCAAGCGCCATGCGCGCGCACCTCTCGGCCACGGCGCGGACGTTGTTCTCGTCCGACGTC
 2581 GCGTACTACAGCCAGAACCTGTTCCAGAGGACATCTTCCACGACATCCACGGAATCCCC
 2641 AAGCGCGCCACCAAGAGCGAGCTCGAGGAGGTTCTCGCATCTCCCGCGCGCAGACGCTC
 2701 ATCGCGCTCTGCGGCAACCGTCCGCGCTACTGGTTCAACCGCTTCTCATCGACATCATC
 2761 GCGCGCTTCAGATCCAGCTCTCGGCTCTCGCGGATGACGCGGTTCTGCTCGGCTCTC
 2821 GCCATCCGTTACCACTAGGACCATGCTCGGCAACGAGGTCATCTTCTCTCTCTTAC
 2881 GCGTTCACCTCTCTTCCGCACTTTGGGCGGACCGGACGAGCTTCACTGTCGCGGCC
 2941 GAGATCTCCCGCGCGCTCTCCGTCRACCTGCCACGGCATCTCCGCGCGCTCCGGCAG
 3001 GCGGCGCGATCATCGGAGCATTCGGTTCTCTTACGCGCGCGAGCCACAGGACRAGGCG
 3061 CATGTCGAGCGCCGGCTACAAACCTGGGATTGGCGTCCGGAACCGCTCTTCTGCTCGCC
 3121 GGGTGCACCTCGTTGGTTCTCATGACATGGAATGCTCGTCCGGAATCGAAGGGAAG
 3181 TCGCTGAGGAGATGTCGCGGAGGCCGACGACGAGGAGGCTTCTGCGCAACGCGGTGCC
 3241 ACCGCGGTCRACCTCGTCCGGATTGGATGTTGATCTTTCAGGACGCAAGGATGAC
 3301 GAAACATTTGATGCGAAGCTCTGATCTGTAAGCTGATAGGAAATGTTATATATATTTA
 3361 TTAGATCTGATCTCTAATGTAATATCATAACTATGTTAGTACTNGCTTTTTAGGTA
 3421 GAGGTTCTCTTGTACTCTGAGGTTGATCTCTAAATTTCTGAGAACTTAATTAATCATGG
 3481 CAGGAGTTCTCTATTAATAGAGCTATTTAAAATTTTGGGATGCTCTCTTGTATAT
 3541 TGTATGTTACTTAAACAAATTAATAAAAAATAGAAAAAATTAATAGATAATTACAAAT
 3601 ATATCATTACACAAACATACATACAAAGCTCGTCTTTCTGAAAAAGATTTCTCGTGTTC

Fig, 42. OsPT10 genomic sequence.

2) DNA microarray 방법을 이용한 인산 결핍 특이적 유전자 분리

인산 결핍에 의해 특이적으로 발현이 유도되는 벼의 유전자들을 DNA microarray 방법을 이용하여 확보하였다. 간략히 실험방법을 살펴보면 다음과 같다. 인산이 결핍된 또는 충분한 배양액에서 1일 동안 배양한 rice calli로부터 mRNA를 각각 분리하였다. 인산이 충분한 조건에서 배양된 세포로부터 분리된 mRNA는 Cy3로 라벨하고 인산 결핍 조건에서 배양된 세포로부터 분리된 mRNA는 Cy5로 라벨하여 그린진 바이오에서 제작한 64K 올리고 칩에 혼성화하여 인산 결핍 조건에서 대량으로 발현하는 유전자 군에 대한 분석을 실시하였다. 분석 결과 SSH 방법에 의한 분석과 비슷한 결과를 보였고, SSH 방법에 의한 분석 때 보다 여러 가지 양분 흡수에 관여하는 운반체 유전자들의 발현 양상을 볼 수 있었다. 그리고 myb과 같은 transcription factor와 kinase 등 식물의 신호전달과 관련된 많은 유전자가 발현되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 인산의 결핍도 식물에 있어서 매우 큰 환경스트레스로 작용하고 있기 때문에 일반적인 스트레스 전달 경로를 거쳐 하류의 인산 운반체 유전자를 작동시키는 것으로 생각된다. 따라서 하류의 인산 운반체 유전자 뿐 만 아니라 상류에 작용하여 하류의 다수의 유전자 발현을 조절하는 transcription factor 등을 이용하면 보다 효율적인 인산 흡수력이 강화된 식물체의 작성이 가능할 것으로 생각된다(그림 43, 44, 표 8).

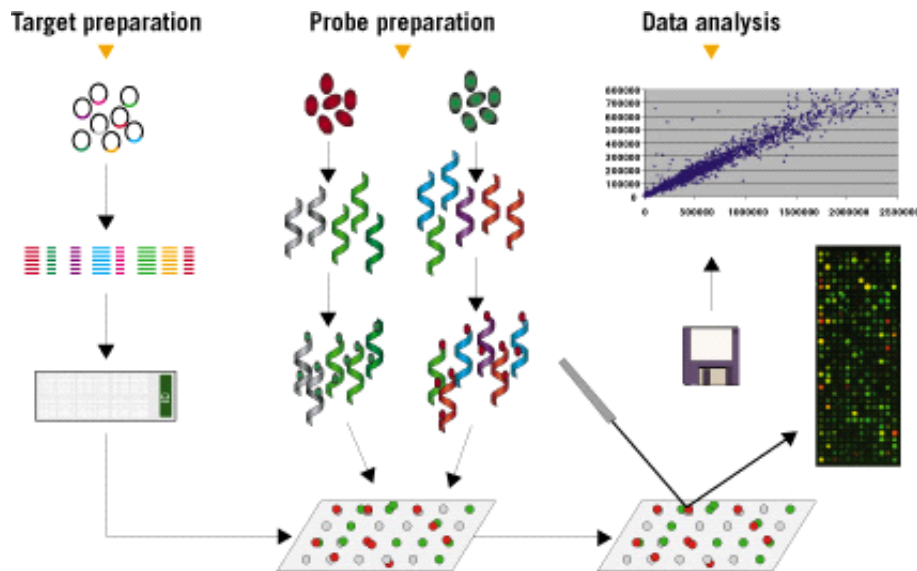


Fig. 43. Microarray analysis of phosphate starvation responds genes.

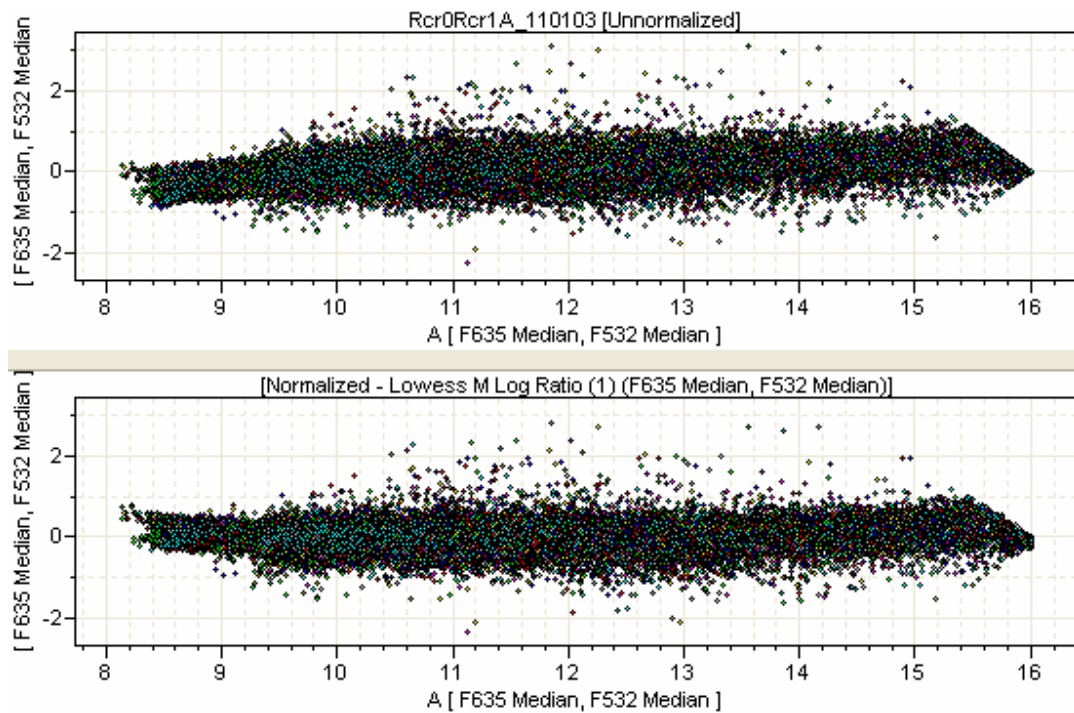


Fig. 44. Log ratio before and after block-by-block Lowess normalization of Rcr0(Cy3) and Rcr1(Cy5).

Table 8. Phosphate starvation induced rice cDNA clones by DNA microarray.

	spot_id	name	cog_id
1	A01010302	Os002379_01	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)
2	A01011104	Os011946_01	Permease of the major facilitator superfamily
3	A01011123	Os013021_01	A WRKY superfamily transcription factors
4	A01021501	Os016901_01	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26
5	A01021715	Os019929_01	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26
6	A01021806	Os020694_01	Beta-glucosidase, lactase phlorizinhydrolase,
7	A01021906	Os022126_01	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26
8	A01031315	Os014963_01	Bifunctional GTP cyclohydrolase II/
9	A01031601	Os017967_01	NAD-dependent malate dehydrogenase
10	A01040519	Os005737_01	A Predicted E3 ubiquitin ligase
11	A01040710	Os007574_01	A G-box binding bZIP transcription factor
12	A01041106	Os012357_01	Multidrug resistance-associated protein
13	A02010110	Os000386_01	Glutathione peroxidase
14	A02011717	Os020047_01	Alcohol dehydrogenase, class III
15	A02011819	Os021231_01	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
16	A02021408	Os016200_01	Serine carboxypeptidases
17	A02021511	Os017396_01	Ribosome biogenesis protein RPF1,
18	A02021602	Os018149_01	Sulfite reductase (ferredoxin)
19	A02021616	Os018877_01	Cl ⁻ channel CLC-3 and related proteins
20	A02031904	Os021650_01	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26
21	A02041511	Os017407_01	Uncharacterized conserved protein
22	A02041622	Os019240_01	O-acetyltransferase
23	A02041821	Os021550_01	A Pectinesterase
24	A03011722	Os020194_01	Protein DRE2, required for cell viability
25	A03020814	Os009008_01	40S ribosomal protein S13
26	A03020826	Os009432_01	Alcohol dehydrogenase, class V
27	A03021801	Os020639_01	60S ribosomal protein L35A/L37
28	A03022411	Os028447_01	A (1, 4)-beta-xylan endohydrolase
29	A03030808	Os008572_01	Pleiotropic drug resistance proteins
30	A03030905	Os009696_01	Glutathione S-transferase
31	A03031113	Os012632_01	UDP-glucose 4-epimerase/
32	A03031604	Os018278_01	A Glutamyl-tRNA reductase
33	A03032306	Os026853_01	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)
34	A03040908	Os009819_01	Uncharacterized conserved protein
35	A03040919	Os010511_01	Defender against cell death protein
36	A03041107	Os012373_01	Glutathione S-transferase
37	A03041306	Os014662_01	A Unnamed protein
38	A03042106	Os024389_02	Glutathione S-transferase
39	A04020526	Os006161_02	NADH:flavin oxidoreductase

40	A04020810	Os008773_01	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
41	A04021622	Os019227_01	A CER1 protein involved in wax synthesis
42	A04021923	Os022969_01	Tyrosine aminotransferase
43	A04030619	Os006668_02	A Unnamed protein
44	A04030810	Os008501_01	Glutathione S-transferase
45	A04032118	Os024904_01	A Unnamed protein
46	A04032513	Os029457_01	A Uncharacterized protein
47	A05010905	Os009683_01	NADH:flavin oxidoreductase
48	A05011708	Os019464_01	Predicted PhzC/PhzF-type epimerase
49	A05020117	Os000932_02	Pleiotropic drug resistance proteins
50	A05021218	Os013915_01	A Abscisic acid-responsive protein
51	A05030918	Os010398_01	A Germin/oxalate oxidase
52	A05031225	Os014205_01	Serine/threonine protein kinase
53	A05032325	Os027651_01	Molecular chaperone
54	A05042513	Os029646_01	A Receptor-like protein kinase
55	A06010718	Os007738_01	Pleiotropic drug resistance proteins
56	A06011020	Os011451_01	SCF ubiquitin ligase, Skp1 component
57	A06011121	Os012900_01	FOG: Kelch repeat
58	A06011214	Os013679_01	RNA-binding protein musashi
59	A06011511	Os017111_01	Uroporphyrin III methyltransferase
60	A06011810	Os020834_01	NADH:flavin oxidoreductase
61	A06021025	Os012079_01	A Unnamed protein
62	A06030808	Os008476_01	Glutathione S-transferase
63	A06031608	Os018230_01	NADP/FAD dependent oxidoreductase
64	A06031808	Os020822_01	Dynein light chain type 1
65	A06031811	Os020863_01	A Receptor-like protein kinase
66	A06041316	Os015154_01	Serine/threonine protein kinase
67	A06041511	Os017405_01	FOG: PPR repeat
68	A06041611	Os018834_01	A Unnamed protein
69	A07011004	Os010805_01	Predicted spermine/spermidine synthase
70	A07011616	Os018689_01	NADH:flavin oxidoreductase
71	A07012315	Os027236_01	GTPase Rab11/YPT3,
72	A07012402	Os027668_01	A R2R3-type MYB transcription factors
73	A07020108	Os000267_01	O-linked N-acetylglucosamine transferase OGT

74	A07020803	Os008599_01	Secretory carrier membrane protein
75	A07021808	Os020998_01	UDP-glucuronosyl
76	A07032325	Os027650_01	Molecular chaperone
77	A07040413	Os004279_01	RAB proteins geranylgeranyltransferase
78	A07041522	Os017992_01	Aldo/keto reductase family proteins
79	A08021025	Os012078_01	Serine/threonine protein kinase
80	A08021507	Os017345_01	Pleiotropic drug resistance proteins
81	A08021526	Os018122_01	Nuclear distribution protein NUDC
82	A08032007	Os023096_01	Uncharacterized membrane protein
83	A08040805	Os008729_01	Citrate synthase
84	A08042113	Os024851_01	Uncharacterized high-glucose-regulated protein
85	A08042121	Os025212_01	Mitochondrial oxaloacetate carrier protein
86	A09011216	Os013794_01	Pleiotropic drug resistance proteins
87	A09021326	Os015728_01	Beta-glucosidase, lactase phlorizinhydrolase
88	A09031607	Os018317_01	Small Nuclear ribonucleoprotein splicing factor
89	A09031808	Os020914_01	C2H2-type Zn-finger protein
90	A09031812	Os020962_01	Predicted haloacid-halidohydrolase
91	A09041301	Os014605_01	A Receptor-like protein kinase
92	A10010924	Os010362_01	MEKK and related protein kinases
93	A10011701	Os019289_01	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
94	A10021606	Os018475_01	Predicted transporter
95	A10030309	Os002658_01	FOG: PPR repeat
96	A10031804	Os020488_01	Acetyl-CoA acetyltransferase
97	A10041606	Os018487_01	Predicted sugar kinase
98	A10041914	Os022598_01	Thioredoxin
99	A10042313	Os027411_01	40S ribosomal protein S3
100	A11010114	Os000521_01	H+/oligopeptide symporter
101	A11011214	Os013769_01	Predicted ubiquitin-conjugating enzyme
102	A11021914	Os022495_01	UDP-glucuronosyl transferase
103	A11040803	Os008609_01	Glutathione peroxidase
104	A11041118	Os012777_01	Transcription factor NF-X1

105	A11041623	Os019158_01	Translation initiation factor 4F
106	A12011124	Os012927_01	Serine/threonine protein kinase
107	A12011322	Os015208_01	Fe ²⁺ /Zn ²⁺ regulated transporter
108	A12031803	Os020481_01	A Unnamed protein
109	A12032315	Os027152_01	Cytochrome P450 CYP2 subfamily
110	A12041705	Os019629_01	Protein involved in sister chromatid
111	B01021308	Os044866_01	NADH:flavin oxidoreductase
112	B02011223	Os044266_01	Glutathione S-transferase
113	B02021823	Os052096_01	Glutathione peroxidase
114	B02042110	Os055053_01	A Polyneuridine aldehyde esterase
115	B03022009	Os053532_01	Predicted Zn ²⁺ -binding protein
116	B03022420	Os057984_02	A U-box protein
117	B03041902	Os052067_01	60S ribosomal protein L29
118	B03042303	Os056863_01	RNA-binding protein LARP/SRO9
119	B03042405	Os057619_02	Protein phosphatase 2C
120	B04010618	Os036647_01	DNA helicase PIF1/RRM3
121	B04012015	Os053695_01	E2F-like protein
122	B04022113	Os055082_01	Uncharacterized conserved protein
123	B05030324	Os033333_01	Molecular chaperone
124	B05032105	Os054535_01	Molecular chaperone

125	B05032203	Os055648_01	Uncharacterized membrane protein
126	B06012102	Os054387_01	40S ribosomal protein S3
127	B06012110	Os054762_01	Calcyclin-binding protein CacyBP
128	B06020504	Os035031_01	Xanthine dehydrogenase
129	B06021205	Os043765_01	AAA+-type ATPase
130	B06022210	Os056162_01	A Uncharacterized integral membrane protein
131	B07010307	Os032554_01	Serine/threonine protein kinase
132	B07012118	Os055223_01	40s ribosomal protein S27
133	B07020413	Os034169_01	Serine/threonine protein kinase
134	B07021014	Os041443_01	Glutathione S-transferase
135	B07021911	Os052441_01	NADH:ubiquinone oxidoreductase
136	B08011906	Os052190_02	UDP-glucose 4-epimerase
137	B08012102	Os054386_01	60s ribosomal protein L10
138	B08012512	Os058280_02	Serine/threonine protein kinase
139	B08021505	Os047540_01	NADH:flavin oxidoreductase
140	B09010405	Os033693_01	DNA helicase PIF1/RRM3
141	B09021704	Os049754_01	A Predicted N-hydroxycinnamoyl
142	B09031424	Os046987_01	Tam3-transposase (Ac family)
143	B09031901	Os051966_01	Thioredoxin
144	B09032206	Os055676_01	Aldo/keto reductase family proteins
145	B09042101	Os054579_01	Glutathione S-transferase
146	B10011823	Os051814_01	Mercaptopyruvate sulfurtransferase/
147	B10021605	Os048703_01	Glutaredoxin and related proteins
148	B11011908	Os052305_01	GTPase Ran/TC4/GSP1
149	B11012103	Os054497_01	Bax-mediated apoptosis inhibitor TEGT/BI-1
151	B11031824	Os051924_01	Molecular chaperone (HSP90 family)
152	B12011920	Os052628_01	Glutathione S-transferase
153	B12030401	Os033277_01	NADH:flavin oxidoreductase
154	B12031006	Os040883_01	NADH:flavin oxidoreductase

	spot_id	name	cog_id
156	A01010302	Os002379_01	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)
157	A01010905	Os009685_01	A predicted lipid transfer protein
158	A01011123	Os013021_01	A WRKY superfamily transcription factors
159	A01011215	Os013792_01	60s ribosomal protein L6
160	A01011302	Os014509_01	Ribonucleotide reductase, alpha subunit
161	A01011411	Os016053_01	A Predicted lipase
162	A01011509	Os017184_01	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
163	A01012025	Os023936_01	A Uncharacterized protein
164	A01020221	Os002116_01	Kynurenine 3-monooxygenase
165	A01020223	Os002419_01	Small nuclear ribonucleoprotein E
166	A01020320	Os003235_01	Sphingolipid hydroxylase
167	A01020620	Os006842_01	FOG: Transposon-encoded proteins
168	A01021302	Os014603_01	Chorismate mutase
169	A01021407	Os016100_01	Nucleolar protein-like/EBNA1-binding protein
170	A01021501	Os016901_01	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
171	A01021706	Os019536_01	Aspartyl protease
172	A01021806	Os020694_01	Beta-glucosidase, lactase phlorizinhydrolase
173	A01021906	Os022126_01	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
174	A01021918	Os022545_01	Protein required for biogenesis of the ribosomal
175	A01021919	Os022563_01	40S ribosomal protein S20
176	A01030717	Os007836_01	Ribosome Assembly protein
177	A01031019	Os011552_01	Predicted chitinase
178	A01031426	Os016800_01	Molecular chaperones mortalin/PBP74/GRP75
179	A01031623	Os019071_01	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
180	A01031712	Os019805_01	Predicted RNA-binding protein containing
181	A01031806	Os020611_01	40S ribosomal protein SA (P40)/Laminin
182	A01031813	Os020984_01	Protein involved in rRNA processing
183	A01031916	Os022443_01	A Uncharacterized protein
184	A01032022	Os023907_01	Glutathione S-transferase
185	A01032210	Os025764_01	Predicted NAD-dependent oxidoreductase
186	A01032508	Os029203_01	MADS box transcription factor
187	A01040819	Os009368_01	G protein beta subunit-like protein
188	A01041005	Os010929_01	Glutathione S-transferase
189	A01041121	Os013103_01	A Potassium transporter

190	A01041212	Os013857_01	Phosphatidylinositol transfer protein
191	A01042215	Os026194_01	Y Unnamed protein
192	A01042503	Os029244_01	Predicted transporter
193	A02011208	Os013332_01	Cdc2-related protein kinase
194	A02011211	Os013651_01	Protein involved in mRNA turnover
195	A02011302	Os014414_01	Chaperone HSP104 proteases
196	A02011625	Os018989_01	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
197	A02011703	Os019317_01	NADH-dehydrogenase (ubiquinone)
198	A02011709	Os019669_01	Predicted nucleic-acid-binding protein
199	A02011717	Os020047_01	Alcohol dehydrogenase, class III
200	A02011725	Os020426_01	A LRP1, protein expressed in lateral
201	A02011911	Os022003_01	Polypeptide release factor 3
202	A02020219	Os002183_01	Uncharacterized membrane protein
203	A02020809	Os008768_01	Chitinase
204	A02021008	Os011315_01	RNA-binding protein (RRM superfamily)
205	A02021122	Os013191_01	Nucleotide-sugar transporter VRG4/SQV-7
206	A02021402	Os015851_01	Mitochondrial solute carrier protein
207	A02021408	Os016200_01	Serine carboxypeptidases (lysosomal cathepsin A)
208	A02021517	Os017744_01	60S ribosomal protein L3 and related proteins
209	A02021602	Os018149_01	Sulfite reductase (ferredoxin)
210	A02021702	Os019581_01	Notchless-like WD40 repeat-containing protein
211	A02021911	Os022285_01	A Unnamed protein
212	A02030106	Os000070_01	40S ribosomal protein S14
213	A02030812	Os008809_01	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)
214	A02030818	Os008880_01	Mitochondrial import inner membrane translocase
215	A02031001	Os010699_01	A Expansin
216	A02031423	Os016677_01	Endosomal membrane proteins, EMP70
217	A02031602	Os017879_01	A predicted lipid transfer protein
218	A02031616	Os018610_01	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
219	A02031624	Os018983_01	Plasma membrane H ⁺ -transporting ATPase
220	A02031710	Os019686_01	ATP-dependent RNA helicase
221	A02031717	Os020059_01	60s ribosomal protein L24
222	A02031904	Os021650_01	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
223	A02031909	Os021991_01	A Predicted alpha/beta hydrolase

224	A02031912	Os022021_01	Serine palmitoyltransferase
225	A02032004	Os023057_01	A MYB transcription factor
226	A02032307	Os026777_01	Reductases with broad range
227	A02032507	Os029102_01	A Uncharacterized protein
228	A02041017	Os011717_01	Predicted membrane protein
229	A02041216	Os013999_01	Protoheme ferro-lyase (ferrochelataase)
230	A02041604	Os018467_01	Mitochondrial solute carrier protein
231	A02041821	Os021550_01	A Pectinesterase
232	A02042316	Os027445_01	60S ribosomal protein L38
233	A02042408	Os028229_01	Glutaredoxin and related proteins
234	A03010203	Os001260_01	A Potassium transporter
235	A03011012	Os011177_01	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
236	A03011110	Os012298_01	Mitochondrial translation initiation factor
237	A03011112	Os012322_01	Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase
238	A03011119	Os012692_01	60s ribosomal protein L18
239	A03011615	Os018685_01	A S-adenosyl-L-methionine:carboxyl
240	A03011619	Os019011_01	FOG: Zn-finger
241	A03011905	Os022025_01	Putative transcriptional regulator DJ-1
242	A03011926	Os022815_01	A Pectinesterase
243	A03012214	Os025798_01	Ribosomal protein S7
244	A03020814	Os009008_01	40S ribosomal protein S13
245	A03020826	Os009432_01	Alcohol dehydrogenase, class V
246	A03021003	Os010893_01	40S ribosomal protein S2/30S
247	A03021011	Os011265_01	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase
248	A03021415	Os016475_01	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
249	A03021508	Os017259_01	NADH-dehydrogenase (ubiquinone)
250	A03021702	Os019488_01	Nuclear AAA ATPase (VCP subfamily)
251	A03021801	Os020639_01	60S ribosomal protein L35A/L37
252	A03022307	Os026954_01	60s ribosomal protein L23
253	A03030417	Os004238_01	Kelch repeat-containing proteins
254	A03030908	Os009726_01	A Unnamed protein
255	A03030919	Os010416_01	A Uncharacterized plastocyanin-like protein,
256	A03031420	Os016446_01	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase
257	A03031508	Os017177_01	Cytochrome P450 CYP2 subfamily
258	A03031715	Os019845_01	Uncharacterized membrane protein
259	A03032023	Os023924_01	Nucleolar protein (NOP16) involved in 60S
260	A03032302	Os026522_01	A S-adenosyl-L-methionine ethyltransferase
261	A03040719	Os007947_02	Uncharacterized conserved protein
262	A03040908	Os009819_01	Uncharacterized conserved protein

263	A03040919	Os010511_01	Defender against cell death protein
264	A03041005	Os010928_01	40S ribosomal protein S24
265	A03041306	Os014662_01	A Unnamed protein
266	A03041520	Os017690_01	Stationary phase-induced protein
267	A03041626	Os019192_01	Endosomal membrane proteins, EMP70
268	A03041709	Os019868_01	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26
269	A03041723	Os020319_01	DNA replication factor/protein phosphatase
270	A03042106	Os024389_02	Glutathione S-transferase
271	A04010126	Os001124_01	Mitochondrial import inner membrane translocase
272	A04010805	Os008437_01	Molecular chaperones GRP78/BiP/KAR2, HSP70
273	A04010901	Os009542_01	60S ribosomal protein L3 and related proteins
274	A04010908	Os009619_01	GTPase Rab2, small G protein superfamily
275	A04011212	Os013656_01	Translation initiation factor 5 (eIF-5)
276	A04011723	Os020117_01	Amino acid transporters
277	A04011810	Os020835_01	FOG: RRM domain
278	A04011821	Os021254_01	Predicted membrane protein
279	A04020526	Os006161_02	NADH:flavin oxidoreductase/12-oxophytodienoate
280	A04021017	Os011704_01	Asparaginase
281	A04021808	Os021094_01	A Unnamed protein
282	A04030619	Os006668_02	A Unnamed protein
283	A04031410	Os015952_01	Os015952_01
284	A04032118	Os024904_01	A Unnamed protein
285	A04032513	Os029457_01	A Uncharacterized protein
286	A04041809	Os021124_01	Fibrillarin and related nucleolar RNA-binding
287	A05010905	Os009683_01	NADH:flavin oxidoreductase/12-oxophytodienoate
288	A05011522	Os017888_01	Exocyst component protein and related proteins
289	A05011723	Os020211_01	Glycinamide ribonucleotide synthetase (GARS)
290	A05021216	Os013891_01	Cystine transporter Cystinosin
291	A05021409	Os016122_01	40S ribosomal protein S3A
292	A05021818	Os021400_01	A Predicted membrane protein
293	A05031621	Os019046_01	Aspartyl-tRNA synthetase
294	A05041023	Os011973_01	A Predicted membrane protein
295	A05041122	Os013107_01	Synaptobrevin/VAMP-like protein
296	A05041513	Os017613_01	Hydrolytic enzymes of the alpha/beta hydrolase
297	A05041805	Os020698_01	DNA replication factor/protein phosphatase inhibitor
298	A05042313	Os027319_01	60S ribosomal protein L14/L17/L23
299	A05042402	Os027776_01	40S ribosomal protein S15
300	A05042513	Os029646_01	A Receptor-like protein kinase, contains lectin

301	A06011214	Os013679_01	RNA-binding protein musashi/mRNA cleavage
302	A06011810	Os020834_01	NADH:flavin oxidoreductase/12-oxophytodienoate
303	A06021112	Os012509_01	Acyl-CoA synthetase
304	A06021820	Os021518_01	Alcohol dehydrogenase, class V
305	A06030104	Os000044_01	A Potassium transporter
306	A06030808	Os008476_01	Glutathione S-transferase
307	A06031608	Os018230_01	NADP/FAD dependent oxidoreductase
308	A06031808	Os020822_01	Dynein light chain type 1
309	A06032112	Os024552_01	60S ribosomal protein L3 and related proteins
310	A06041611	Os018834_01	A Unnamed protein
311	A06041622	Os019238_01	Cytochrome P450 CYP2 subfamily
312	A06041807	Os021099_01	Nuclear localization sequence binding protein
313	A06041815	Os021476_01	60S ribosomal protein L5
314	A07010208	Os001585_01	40S ribosomal protein S11
315	A07010814	Os008912_01	A Unnamed protein
316	A07010825	Os009330_01	Glucose-6-phosphate/phosphate
317	A07011616	Os018689_01	NADH:flavin oxidoreductase/12-oxophytodienoate
318	A07020103	Os000214_01	FOG: RRM domain
319	A07020803	Os008599_01	Secretory carrier membrane protein
320	A07020908	Os009805_01	A Predicted alpha/beta hydrolase
321	A07021011	Os011263_01	WD40 repeat protein
322	A07030614	Os006421_01	RNA polymerase I transcription factor UAF
323	A07031520	Os017595_01	Mitochondrial processing peptidase, alpha
324	A07031816	Os021293_01	Tyrosine kinase specific for activated
325	A07041305	Os014654_01	Inorganic phosphate transporter
326	A07041513	Os017612_01	Translation elongation factor EF-1 alpha/Tu
327	A07041803	Os020673_01	Kinesin-like protein
328	A07041805	Os020697_01	60S ribosomal protein L7
329	A08010901	Os009540_01	60s ribosomal protein L10
330	A08011109	Os012196_01	A Unnamed protein

331	A08011604	Os018169_01	Mitochondrial chaperonin, Cpn60/Hsp60p
332	A08012310	Os026792_01	A Uncharacterized protein
333	A08020823	Os009493_01	A Predicted N-hydroxycinnamoyl
334	A08020908	Os009899_01	A Unnamed protein
335	A08021818	Os021493_01	Translation initiation factor 3, subunit i (eIF-3i)/
336	A08030421	Os004461_02	A Unnamed protein
337	A08031524	Os017829_01	ATP-dependent DNA helicase
338	A08032007	Os023096_01	Uncharacterized membrane protein, predicted
339	A08040926	Os010955_01	A Predicted lipase
340	A08041409	Os016227_01	Predicted hydrolase (HIT family)
341	A08041410	Os016233_01	Predicted chitinase
342	A08042121	Os025212_01	Mitochondrial oxaloacetate carrier protein
343	A09010326	Os003483_01	WD40 repeat protein
344	A09011114	Os012623_01	A beta-1, 3 glucanase
345	A09011219	Os014119_01	Serine/threonine protein kinase
346	A09011506	Os017138_01	Tryptophan synthase beta chain
347	A09020103	Os000213_01	60S ribosomal protein L14/L17/L23
348	A09021117	Os012760_01	Mercaptopyruvate sulfurtransferase/thiosulfate
349	A09021326	Os015728_01	Beta-glucosidase, lactase phlorizinhydrolase
350	A09021718	Os020238_01	60S ribosomal protein L9
351	A09030613	Os006414_01	60S ribosomal protein L28
352	A09030716	Os007814_01	Poly(A)-specific exoribonuclease PARN
353	A09030915	Os010088_01	40S ribosomal protein S20
354	A09031808	Os020914_01	C2H2-type Zn-finger protein
355	A09031812	Os020962_01	Predicted haloacid-halido-hydrolyase
356	A09040813	Os009011_01	A Predicted lipase
357	A09041101	Os012019_01	Uncharacterized conserved protein
358	A09041107	Os012370_01	Chaperonin complex component
359	A09041511	Os017309_01	60s ribosomal protein L6
360	A09041814	Os021080_01	GTPase
361	A10011216	Os013700_01	60S ribosomal protein L11
362	A10011425	Os016685_01	40S ribosomal protein S4
363	A10011623	Os018961_01	Multidrug resistance-associated protein
364	A10012215	Os025996_01	AAA+type ATPase
365	A10012402	Os027572_01	Ribosomal protein S7
366	A10020820	Os009451_01	RNA-binding protein required for biogenesis
367	A10021209	Os013624_01	A Receptor protein kinase containing LRR
368	A10021417	Os016590_01	Protein phosphatase 2C

369	A10021702	Os019577_02	Predicted protein involved in nuclear export
370	A10022009	Os023379_01	Succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit
371	A10030309	Os002658_01	FOG: PPR repeat
372	A10030814	Os008829_01	A bHLH transcription factor
373	A10031110	Os012213_01	Cystathionine beta-synthase and related enzymes
374	A10031607	Os018222_01	Translation initiation factor 3, subunit d (eIF-3d)
375	A10031712	Os019706_01	Aldehyde dehydrogenase
376	A10040804	Os008710_01	A Male reproductive organ-specific protein
377	A10040813	Os009104_01	Carbonic anhydrase
378	A10040815	Os009128_01	A Unnamed protein
379	A10040911	Os010227_01	Ubiquinol cytochrome c oxidoreductase
380	A10041117	Os012864_01	40s ribosomal protein s10
381	A10041603	Os018457_01	WD40 repeat-containing protein
382	A10041606	Os018487_01	Predicted sugar kinase
383	A10041715	Os020032_01	Asparaginyl-tRNA synthetase (mitochondrial)
384	A10042313	Os027411_01	40S ribosomal protein S3
385	A11010114	Os000521_01	H??詞? symporter
386	A11010218	Os001977_01	60S ribosomal protein L26
387	A11011025	Os011888_01	A Cellulose synthase catalytic subunit
388	A11011214	Os013769_01	Predicted ubiquitin-conjugating enzyme
389	A11011406	Os015704_01	A CER1 protein involved in wax synthesis
390	A11011821	Os021345_01	Multidrug/pheromone exporter, ABC superfamily
391	A11021303	Os014616_01	Amino acid transporters
392	A11021402	Os015751_01	Translation initiation factor 3, subunit c (eIF-3c)
393	A11021914	Os022495_01	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase
394	A11022025	Os024024_01	Prohibitin
395	A11030322	Os003446_02	60S acidic ribosomal protein P0
396	A11030616	Os006712_01	A LRP1, protein expressed in lateral
397	A11030824	Os009322_01	Stationary phase-induced protein, SOR/SNZ family
398	A11031116	Os012658_01	P-type ATPase
399	A11031204	Os013384_01	Glutathione S-transferase
400	A11031223	Os014178_01	Apoptotic ATPase
401	A11031707	Os019467_01	Glycine/serine hydroxymethyltransferase
402	A11031724	Os020226_01	A No apical meristem (NAM) developmental protein
403	A11031910	Os022087_01	OTU (ovarian tumor)-like cysteine protease
404	A11032221	Os026167_01	Mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K)
405	A11040405	Os003914_02	FOG: Kelch repeat
406	A11041402	Os015763_01	RNA-binding protein musashi/mRNA cleavage
407	A11041515	Os017634_01	Translation initiation factor 2, beta subunit
408	A11041718	Os020249_01	Uncharacterized membrane protein
409	A11041909	Os022175_01	Cytochrome P450 CYP2 subfamily
410	A12010113	Os000423_01	Mitochondrial phosphate carrier protein
411	A12010806	Os008439_01	Mitochondrial chaperonin
412	A12011524	Os017815_01	Translation initiation factor 5B (eIF-5B)
422	A12040216	Os002150_01	Predicted chitinase

423	A12040721	Os008329_01	A Unnamed protein
424	A12040820	Os009462_01	Predicted 3-ketosphinganine reductase
425	A12041206	Os013594_01	Uncharacterized membrane protein
426	A12041415	Os016577_01	A Uncharacterized protein
427	B01011121	Os043173_01	Apoptotic ATPase
428	B01011424	Os046979_01	Stationary phase-induced protein
429	B01011911	Os052352_01	40S ribosomal protein S2
430	B01012310	Os057011_02	DNA replication factor/protein phosphatase
431	B01021308	Os044866_01	NADH:flavin oxidoreductase
432	B01022103	Os054595_01	Calnexin
433	B01030717	Os037913_01	Ribosome Assembly protein
434	B01031701	Os049645_01	Predicted transporter
435	B01031803	Os050833_01	A Uncharacterized plastocyanin-like protein
436	B01031904	Os051999_01	40S ribosomal protein S16
437	B01031916	Os052690_01	NMD protein affecting ribosome stability
438	B01032111	Os054885_01	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
439	B01041824	Os052021_01	60S ribosomal protein L26
440	B01041826	Os052044_01	60s ribosomal protein L34
441	B01041904	Os052091_01	40S ribosomal protein S15
442	B01042207	Os056061_01	Amino acid transporters
443	B02012107	Os054455_01	60S acidic ribosomal protein P0
444	B02012225	Os056619_01	Lipid exporter ABCA1 and related proteins
445	B02020412	Os034249_01	Cytochrome P450 CYP2 subfamily
446	B02021823	Os052096_01	Glutathione peroxidase
447	B02021825	Os052120_01	60s ribosomal protein L15/L27
448	B02041910	Os052531_01	Dehydrogenases with different specificities
449	B02042110	Os055053_01	A Polyneuridine aldehyde esterase
450	B03011024	Os042038_01	Aldehyde dehydrogenase
451	B03011209	Os043624_01	60S ribosomal protein L13a
452	B03011823	Os051910_01	Ubiquitin/40S ribosomal protein S27a fusion
453	B03012105	Os054524_01	60S ribosomal protein L27
454	B03020411	Os034147_01	60S ribosomal protein L22
455	B03021902	Os052055_01	60S ribosomal protein L32
456	B03022103	Os054594_01	Transcription-coupled repair protein CSB/RAD26
457	B03030126	Os031030_01	Fructose-6-phosphate 2-kinase
458	B03031117	Os042852_01	A Receptor-like protein kinase, contains lectin
459	B03031826	Os051952_01	40S ribosomal protein S4
460	B03040418	Os034237_01	A Unnamed protein
461	B03041902	B03041902	60S ribosomal protein L29
462	B03041906	Os052389_01	Small Nuclear ribonucleoprotein G
463	B03042303	Os056863_01	RNA-binding protein LARP/SRO9
464	B03042317	Os057251_02	A Gibberellin response modulator
465	B03042405	Os057619_02	Protein phosphatase 2C/pyruvate dehydrogenase
466	B04010217	Os031701_01	60s ribosomal protein L23
475	B04041903	Os052177_01	60s ribosomal protein L34

476	B04041912	Os052552_01	Imidazoleglycerol-phosphate synthase
477	B04042103	Os054699_01	Mitochondrial oxoglutarate
478	B05012104	Os054506_01	60S ribosomal protein L7A
479	B05012108	Os054553_01	Monodehydroascorbate
480	B05012113	Os054895_01	60s ribosomal protein L24
481	B05021824	Os052008_01	60S ribosomal protein L38
482	B05021825	Os052025_01	A Uncharacterized protein
483	B05021826	Os052031_01	40S ribosomal protein S7
484	B05022104	Os054599_01	40S ribosomal protein S21
485	B05031813	Os051235_01	60S ribosomal protein L44
486	B05031908	Os052320_01	RNA-binding translational regulator IRP
487	B05032102	Os054494_01	40S ribosomal protein S6
488	B05032106	Os054541_01	A Pectinesterase
489	B05032203	Os055648_01	Uncharacterized membrane protein
490	B05032308	Os057004_02	60S acidic ribosomal protein P0
491	B05041505	Os047458_01	A Unnamed protein
492	B05041902	Os052066_01	60S ribosomal protein L29
493	B05042103	Os054605_01	40s ribosomal protein S26
494	B06011801	Os050700_01	A Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
495	B06012102	Os054387_01	40S ribosomal protein S3
496	B06012107	Os054453_01	60S acidic ribosomal protein P0
497	B06030917	Os040428_01	Aspartyl protease
498	B06031902	Os051882_01	60s ribosomal protein L19
499	B06031910	Os052249_02	Fibrillarin and related nucleolar
500	B06031922	Os052933_01	Sensory transduction histidine kinase
501	B06032115	Os054838_01	60S ribosomal protein 15.5kD/SNU13
502	B06041420	Os046847_01	A Predicted alpha/beta hydrolase
503	B06042106	Os054728_01	Glutamate synthase
504	B07010919	Os040534_01	A Predicted alpha/beta hydrolase
505	B07011703	Os049654_01	Carbonic anhydrase
506	B07011907	Os052301_01	Predicted RNA-binding protein
507	B07012101	Os054475_01	60s ribosomal protein L23
508	B07012118	Os055223_01	40s ribosomal protein S27
509	B07021014	Os041443_01	Glutathione S-transferase
510	B07021826	Os052030_01	Cytochrome b5
511	B07022025	Os054264_01	Predicted chitinase
512	B07030122	Os030696_01	A Unnamed protein
513	B07031826	Os051950_01	60S ribosomal protein L5
514	B07032106	Os054540_01	40S ribosomal protein S11
515	B07032110	Os054865_01	Ribosomal protein RPL1/RPL2/RL4L4
516	B07042325	Os057440_02	FOG: RRM domain
517	B08012102	Os054386_01	60s ribosomal protein L10
518	B08012307	Os056947_02	Translation initiation factor 5 (eIF-5)
519	B08021505	Os047540_01	NADH:flavin oxidoreductase
529	B10011918	Os052606_01	Mitochondrial oxoglutarate

530	B10012116	Os054830_01	A Unnamed protein
531	B10012307	Os056946_01	Cytochrome c
532	B10022308	Os057092_02	Uncharacterized conserved protein
533	B10022403	Os057647_02	A Predicted bifunctional aspartate
534	B10022405	Os057659_02	A Unnamed protein
535	B10032102	Os054397_01	dTDP-glucose 4-6-dehydratase
536	B10041901	Os052150_01	60S ribosomal protein L10A
537	B11010511	Os035212_01	Carbonic anhydrase
538	B11011901	Os051954_01	A Unnamed protein
539	B11011914	Os052650_01	40s ribosomal protein S26
540	B11012108	Os054550_01	A Unnamed protein
541	B11020711	Os037635_01	60S ribosomal protein L11
542	B11021901	Os052045_01	60s ribosomal protein L34
543	B11021902	Os052051_01	60S ribosomal protein L9
544	B11031901	Os051965_01	Mitochondrial ADP/ATP carrier proteins
545	B11041112	Os042593_01	60S ribosomal protein L36
546	B11041903	Os052080_01	40S ribosomal protein S25
547	B11042320	Os057264_02	Sulfite reductase (ferredoxin)
548	B11042510	Os058368_02	Uncharacterized conserved protein
549	B12010118	Os030539_01	60S ribosomal protein L7A
550	B12010622	Os036691_01	Cytochrome P450 CYP2 subfamily
551	B12011915	Os052576_01	Imidazoleglycerol-phosphate synthase
552	B12011920	Os052628_01	Glutathione S-transferase
553	B12012306	Os056937_02	Uncharacterized high-glucose
554	B12012308	Os056949_02	Purple acid phosphatase
555	B12022210	Os056159_01	Uncharacterized membrane protein
556	B12030401	Os033277_01	NADH:flavin oxidoreductase
557	B12030606	Os035943_01	Translation elongation factor
558	B12030707	Os037409_01	60S ribosomal protein L44
559	B12031006	Os040883_01	NADH:flavin oxidoreductase
560	B12031016	Os041571_01	A Uncharacterized protein
561	B12032101	Os054390_01	40S ribosomal protein S3
562	B12032410	Os057549_02	A bHLH transcription factor
563	B12042007	Os053609_01	AAA+type ATPase
564	B12042104	Os054701_01	mRNA splicing factor
565	B12042105	Os054719_01	Glutathione S-transferase

다. 현 기술상태의 취약성

- 종래의 연구경향은 주로 재배, 생리학을 중심으로 하는 인산결핍 스트레스에 관한 연구였다. 1990년대 들면서 식물 영양원소 결핍에 대한 식물체의 반응을 분자수준에서 이해하고자 하는 새로운 경향이 나타났으며 몇 개의 관련 유전자들이 분리되어 지기 시작했다.

- 그러나 분리된 대부분의 유전자들의 생물학적 기능에 대해서는 아직 많이 알려지지 않고 있다. 특히 영양결핍을 극복하기 위한 식물세포의 반응을 조절하는 신호전달 체계에 대한 연구는 전무하다.

- 다만 영양원소 수소에 대한 연구가 잘 되어있는 효모를 이용하여 인산을 비롯한 몇 개의 영양원소 수송체들의 유전자들이 식물체로부터 분리되어 Arabidopsis, 담배 등의 모델식물체를 이용하여 그 응용가능성에 대해 연구하고 있다. 그러나 아직까지 경제성 있는 작물과 목본류에 광범위하게 적용하지 못하고 있다.

- 따라서 영양결핍 스트레스에 저항성 있는 식물체를 개발하기 위하여 먼저 사용 가능한 유전자 확보를 위한 다양한 연구방법이 필요하다 .

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표의 달성도

인산 결핍 조건에서 특이적으로 발현되는 유전자들의 클로닝을 위한 cDNA library의 구축과 SSH법에 의한 인산운반체 유전자를 다수 확보하였고, 벼의 형질전환을 위한 시스템의 확립과 인산운반체 유전자(OsPTs)를 형질전환한 식물체를 만들었다. 그리고 인산결핍 조건 특이적 장애기작을 조사하기 위해 벼의 수경재배 시스템을 만들어 인산 농도별 벼의 생육과 수량의 조사 및 인산 결핍 장애의 생화학적 연구를 수행하였으며, 토양 중 유효인산의 증대를 위해 acid phosphatase와 citrate synthase 유전자를 클로닝하여 특성을 조사하였고, 인산 결핍 조건에서 유도되는 유전자를 SSH법과 DNA microarray 방법으로 대량으로 확보하여 특성을 분석 중에 있다. 그리고 인산 결핍 조건에서 특이적으로 발현되는 유전자들을 SSH법과 DNA microarray 방법을 이용하여 대량 확보된 DNA 클론들을 가능한 생물학적 기능을 기준으로 clustering 하여 향후 식물체의 인산 이용성을 증대시키는데 유용한 유전자들의 선별을 위한 기초작업을 완료하였다. 또한 고친화성 인산 운반체 유전자를 10종 분리하여, 인산결핍 시 발현양상을 Northern Blot 으로 분석하였다. 그중에서 발현이 인산결핍에 유도되는 3종(OsPT1, OsPT7, OsPT8), 항상 발현되는 OsPT4 그리고, 뿌리공생균인 arbuscular mycorrhiza의 감염에 유도되는 OsPT5를 각각 대량발현하는 형질전환 벼를 만들었다. 이들 형질전환체들로부터 T2 순계라인을 만들어 재배 중에 있고, 종자가 확보되면, 인산결핍 조건 특이적 장애기작을 조사하기 위해서 개발한 벼의 수경재배 시스템과 사경재배 시스템을 이용하여서 인산 농도별 벼의 생육과 수량의 조사할 것이다.

제 2 절 관련분야에의 기여도

벼의 고친화성 인산 운반체 유전자에 대한 연구의 진전으로 타 작물의 인산 흡수와 관련된 운반체 유전자의 연구를 활성화시킬 것이며, 벼에서 클로닝된 유전자를 발작물에 도입하여 발작물의 인산 흡수 능력 향상을 위해 크게 기여할 것으로 생각된다. 그리고 토양 중의 인산 고정화는 밭 토양에서 문제가 더욱 심각한데, 본 실험에서 얻어진 결과는 이러한 토양에 고정된 인산의 유효화를 위해 중요한 기초자료로서 활용 가치가 높을 것이다.

전 세계적으로 많은 작물을 대상으로 무기양분의 흡수에 대한 분자수준의 연구가

진행되고 있거나 우리나라는 아직 시작 단계에 머무르고 있다. 따라서 본 연구는 국내의 분자수준의 무기양분 연구의 활성화를 위해 크게 기여할 것으로 생각된다.

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	달성도(%)
1차 년도(2001년)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 벼 뿌리 특이적 cDNA library 구축 여부 ○ 인산 흡수 증대를 위한 유용유전자의 확보 정도 ○ 벼의 형질전환 system의 확립 정도 	100
2차 년도(2002년)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 벼의 고친화성 인산 운반체 gene family의 기능 검증 여부 ○ 인산 흡수 기구의 해석 및 운반 유전자의 유용성 검증 여부 ○ 유용 유전자들의 발현을 위한 construct 제조 여부 	100
3차 년도(2003년)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용 유전자들이 도입된 벼의 형질전환체 작성 여부 ○ 형질전환 벼의 인산 흡수 능력 조사 ○ 인산 흡수 관련 유전자가 도입된 벼의 유전 및 생리적 특성 조사 	100
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인산 흡수 관련 유전자의 확보 및 특성 연구 ○ 형질전환 벼의 개발 및 특성 조사 	100

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 기술적 측면

- 현재 본 연구 결과는 식물이 인산의 결핍에 반응하여 스트레스를 극복할 수 있는 방법을 분자 수준에서 연구함으로써 인산 스트레스에 저항성을 가지는 식물체의 개발에 이용될 수 있을 것이다.
- 본 실험에서 확보된 10개의 유전자는 gene bank에 등록하여 소유권을 확보할 예정이며, 인산 흡수 관련 유전자가 도입된 벼 형질전환체를 대상으로 인산의 이용성이 증대된 벼 품종을 만들기 위한 중간모본으로 이용이 가능할 것으로 생각된다.
- 본 연구성과를 토대로 다른 작물의 인산 흡수력을 증대시키기 위한 연구가 많이 이루어질 것으로 생각되며, 이러한 연구를 위한 기초 정보를 본 연구 결과는 제공할 것이다. 특히 밭 작물을 대상으로 한 연구에 본 연구에서 확보된 유전자를 이용하여 인산 이용성이 증대된 작물의 개량이 가능할 것으로 생각된다.
- 식물에서 유용한 유전자의 확보는 외국에 의존하지 않고 독자적으로 새로운 신품종의 개발을 위한 가장 선행되어야 하는 기술임
- 인산 흡수 기작에 대한 기초적 연구를 통하여 식물의 양분 흡수에 대한 반응을 연구함으로써 양분흡수 능력이 향상된 작물개발을 위한 기초 기술이 됨
- 유전자의 탐색 기술은 분자유종 기술을 이용한 작물의 개량에 필수적인 기술로서 본 연구를 통하여 이러한 기술의 축적이 가능함
- 새로운 벼 품종의 개발을 위해 첨단 기술인 분자유종법과 기존의 육종법이 결합하면 매우 우수한 벼 품종의 개발이 가능할 것임
- 인산 운반체 유전자의 형질전환에 의한 양분 흡수 능력이 증대된 벼 신품종의 육종이 가능하며, 특히 시트르산 생성효소 유전자를 이용한 토양 중의 인산 유효도 증대는 작물의 인산 흡수 효율의 증대에 크게 기여할 것임

제 2 절 경제 · 산업적 측면

- 토양 중의 인산을 효율적으로 사용함으로써 인산질 비료의 사용량을 줄일 수 있어 생산비의 절감 효과와 비료의 과다사용에 인한 생태계 파괴를 예방할 수 있음
- 척박지에도 벼의 재배가 가능하게 됨으로서 재배 면적의 확충을 기할 수 있고, 벼 생산량의 증대를 가져올 수 있음
- 국내 벼 재배에 투입되는 생산비의 감소로 국내 벼의 국제 경쟁력 강화에 크게 기여할 것임
- 우리 나라의 식량자급화를 통한 경제의 안정적 성장과 농산물의 수입에 따른 무역 적자를 줄일 수 있을 것으로 기대됨
- 유용 유전자의 탐색과 이를 이용한 우량 품종의 개발로 세계 시장에 수출할 수 있는 작물로서 벼의 위상을 제고시킬 수 있음
- 인산의 함량이 너무 낮아 벼의 생육에 장애를 초래하는 척박한 토양에서도 인산질 화학비료의 과다한 사용이 없이도 재배가 가능한 형질전환 벼를 개발하여 농업에 적극적으로 활용함
- 국내에서 널리 재배되는 다른 주요작물들에 개발된 방법을 적용하여 인산 흡수능력이 증대된 새로운 작물개발을 시도할 것이다.
- 확보된 유전자를 외국과 공유함으로써 우리 나라에 필요한 외국의 다른 유전자들의 확보 가능

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- Barber 등은 135개 토양의 포화 추출물에서 인산을 측정 한 결과 인산의 농도가 대다수의 토양 시료에서 $0.65 \mu\text{M} - 0.25 \mu\text{M}$ 사이인 것을 발견하였고, 자연상태에서 용해성 인산의 수준은 고친화성 인산 운반체의 K_m ($5\mu\text{M}$) 보다 더 낮은 것으로 토양에서 인산의 유효성은 pH와 같은 요인에 크게 영향을 받는다고 보고하였다.

- 인산 수송에 대한 분자생물학적 연구는 Bun-Ya등에 의해 효모에서 처음으로 고친화성 인산운반체 유전자(PH084)가 분리되었고 생물학적 기능이 규명되었다. 그후 이 유전자가 결손된 효모 돌연변이의 complementation을 이용하여 식물체에서 상보성에 의해 tomato, Arabidopsis, potato 등 다양한 모델식물체에서 고친화성 인산운반체 유전자들이 분리되어 분자생물학적 생화학적인 기초연구가 시도되고 있다. 그러나 아직 인산 흡입 관련 유전자들의 농업적 응용이 시도된 적은 없다.

- 인산결핍 조건에서 식물체는 뿌리에서 phosphatase의 분비 능력을 증가시키거나 citrate, malate 등 유기산의 분비를 촉진하여 근권 토양에서 인산의 유효성을 증가시킨다는 보고 이후 담배, Arabidopsis 등의 모델식물체와 박테리아에서 acidic phosphatase, citrate synthase 유전자들이 분리되었고 농업적 응용이 시도되고 있다.

- Arabidopsis의 acidic phosphatase가 담배와 carrot suspension cell line에 대량발현 될 경우 phosphate 이온이 결핍된 배지에서 성장이 촉진됨이 보고되었다. 또한 Pseudomonas aeruginosa의 citrate synthase의 유전자가 대량발현 되는 담배 형질전환체는 산성토양의 대표적인 오염원인 Al 이온에 저항성을 가지며 Al 이온에 고정화된 phosphate를 분리하여 토양의 유효 인산 농도를 증기시키는 것으로 보고되었다.

- 그러나 전 세계적으로 인산흡수 관련 유전자들에 대한 연구는 아직 시작 단계이다. 현재 Arabidopsis, Medicago, 토마토, 감자, 보리 등의 식물체에서 인산흡수 관련 유전자들의 탐색이 이루어지고 있다. 특히 고친화성 인산운반체 유전자들이 이들 식물체로부터 분리되어 응용 가능성에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.

- Rice genome project의 1차 초안이 완성된 현재, 본 연구단에서 지난 3년 동안의 과제를 수행하면서 분리한 10 종류의 벼의 고친화성 인산운반체 유전자들 외에 3종이 더 존재한다고 보고되고 있다. 벼의 유전체의 1차 초안을 최초로 발표한 Syngenta는 뿌리공생균에 특이적으로 발현하는 고친화성 인산운반체의 특성을 규명

한 반면, 본 연구팀은 인산결핍 조건에서 뿌리에서 특이적으로 발현하여 뿌리에서 인산 흡수에 관여 할 것으로 생각되는 고친화성 인산운반체와 식물체 전체에서 발현하면서 흡수된 인산을 지상부위로 운반하는데 관여 할 것으로 생각되는 고친화성 인산운반체 유전자들을 분리하고 그 특성을 규명하였다. 특히 이들 유전자들을 대량발현하는 벼와 애기장대 형질전환체들을 각각 제조하여 응용 가능성을 밝혔다.

제 7 장 참고문헌

Bates TR, Lynch JP (1996) Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant J.* **19**: 529–538

Bechtold N, Ellis J, Pelletire G (1993) In planta *Agrobacterium*–mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R. Acad. Sci. paris, Life Sci.* **316**: 1194–1199

Bieleski RL (1973) Phosphate pools, phosphate transporter, and phosphate availability. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**: 225–252

Bieleski RL, Ferguson IB (1983) Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: Lauchli A, Bieleski RL (eds) *Encyclopedia of plant physiology*, Ns Springer, Berlin Heideberg New York, **15**: 422–449

Chrispeels Mj, Carwford NM, Schroeder JI (1999) Protein transporter water and mineral nutrients across the membrane of plant cells. *Plant Cell* **11**: 661–676

Cho sk, Chung YS, Park SJ, Shin JS, Kwon HJ, Kang KH (1998) Efficiency transformation of Korea rice cultivars (*oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant biology* **41**: 262–268

Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host range DNA cloning system for gram–negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**: 7347

Drew MC, Saker LR, Barber SA, Jenkins W (1984) changes in the kinetics of phsopahate and potassium absorption in nutrient–dificient barley roots measured by a solution–depletion technique. *Planta* **160**: 490–499

Epstein E (1976) Kinetics of ion transporter and the carrier concept. In U Luttge, MG Pittman, eds, *Encyclopedia of Plant Physiology*, New series, Vol 2B: Transporter in Plants, II, Part B: Tissues and Organs. Springer, Berlin, pp 70–94

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791

Gahoonia TS, Nielsen NE (1998) Direct evidence on participation of root hairs in phosphorus (^{32}P) uptake from soil. *Plant soil* **198**: 147–152

Griffith JK, Baker ME, Rouch DA, Page MGP, Skurray RA, Paulsen IT, Chater KF, Baldwin SA, Henderson PJF (1992) Membrane transporter proteins : implications of sequence comparisons. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**: 684–695

Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katarai F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U et al. (2002) *A Draft Sequence of the Rice Genome (oryza sativa L. ssp. Japonica)*. *Science*

Harlan JR (1995) *The Living Fields: Our agricultural Heritage*. Cambridge Univ. Press, New York 30–31

Henderson PJF (1993) The 12–transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **5**: 708–721

Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant cell* **14**: 2413–2429

Jeschke W, Kirkby E, Peuke A, Pate J, Hartung W (1997) Effects of P deficiency on assimilation and transporter of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis L.*) *J. Exp. Bot.* **48**: 75–91

Karthikeyan AS, Varadarajan DK, mukatira UT, D’Urzo MP, Damsz B, Raghothama KG (2000) Regulation Expression of Arabidopsis Phosphate Transporters. *Plant Physiol.* **130**: 221–233

Khush GS (1997) Origin, dispersal, cultivation and variation of rice *Plant Mol.bio.* **35**: 25

Leggewie G, Willmitzer, Riesmeier JW (1997) Two cDNAs from Potato Are Able to Complement a Phosphate Uptake-Deficient Yeast Mutant: Identification of Phosphate Transporters from Higher Plants. *Plant cell* **9**: 381–389

Liu C, Muchhal US, Uthappa M, Kononowicz AK, Raghothama KG (1998) Tomato Phosphate Transporter Genes Are Differentially Regulated in Plant Tissues by Phosphorus. *Plant Physiol.* **116**: 91–99

Marschner H (1995) Mineral Nutrition of higher plants. Academic press, San Diego, CA

Mimura T (1995) Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant cell physiol.* **36**:1–7

Mohanty A, Sarma NP, Tyagi AK (1999) Agrobacterium-mediated high frequency transformation of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1 and transmission of the transgene to R2 progeny. *Plant Science* **147**: 127–137

Muchhal US, Pardo JM, Raghothama KG (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 10519–10623

Muchhal US, Raghothama KG (1999) Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 5868–5872

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473–497

Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 665–693

Raghothama KG (2000) Phosphate transporter and signaling. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **3**: 182–187

- Reizer J, Reizer A, Saier MH** (1994) A functional superfamily of sodium solute symporters. *Biochim. Biophys. Acta.* **1197**: 133–166
- Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N, Bucher M** (2001) A phosphate transporter expression in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* **414**: 462–466
- Rausch C, Bucher M** (2002) Molecular mechanisms of phosphate transporter in plants. *Planta* **216**: 23–37
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin Ac, Iglesias J, Leyva A, Paz–Ares J** (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* **15**: 2122–2133
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM** (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* **116**: 447–453
- Sentence H, Grignon C** (1985) Effect of pH on orthophosphate uptake by corn roots. *Plant Physiol.* **77**: 136–141
- Smith FW, Ealing PM, bei D, Delhaize E** (1997) The cloning of two Arabidopsis genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant J.* **11**: 83–92
- Stevens MA, Rick CM** (1996) Chapter 2: Genetics and Breeding. In Atherton, J.G. and Rudich, J. (eds.), *The tomato crop. A scientific basis for improvement.* Chapman and Hall, London, pp.35–109
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs SP** (2002) Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 13324–13329
- Poirier Y, Bucher M** (2002) Phosphate transporter and Homeostasis in Arabidopsis. *American Society of Plant Biologists.* pp.1–35

- Thompson JD, Higgins DG, Svensson C** (1994) CLUSTAL_W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680
- Tilman D, Fargione J, Wolff B, D'Antonio C, Dobson A and Howarth R et al.** (2001) Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* **292**: 281–284
- Toki S** (1996) Rapid and efficient *Agrobacterium*–mediated transformation in rice. *Plant Mol. Bio. Rep.* **15**: 16–21
- Toriyama K, Terada R, Izawa T, Fujimoto H** (1985) Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci.* **41**: 179–183
- Torriani–Gorini A** (1994) The Pho regulon of *Escherichia coli*. In A Torriani–Gorini, E Yagil, S Silver, eds, *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1–4
- Ullrich CI, Novacky AJ** (1990) Extra– and intracellular pH and membrane potential changes induced by K^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$, and NO_3^- uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnium stoloniferum*. *Plant Physiol.* **194**: 1561–1567
- Wykoff DD, Grossman AR, Weeks OP, Usuda H, Shimogawara K** (1999) *Psr1*, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 15336–15341
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GKS, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J et al.** (2002) A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* *L. ssp. indica*). *Science* **296**: 79–92

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.