(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년03월06일
(11) 등록번호 10-1369654
(24) 등록일자 2014년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0099591
(22) 출원일자 2012년09월07일
심사청구일자 2012년09월07일
(56) 선행기술조사문헌
MPMI Vol. 19, No. 5, 2006, pp. 480-494.

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울시 성북구 안암로 145 (안암동)
(72) 발명자
황병국
서울 서초구 사임당로17길 116, 103동 1405호 (서초동, 서초삼성래미안)
최두석
서울 용산구 원효로71길 7-9, (원효로2가)
임채우
경기 화성시 병점3로 158, 706동 304호 (병점동, 안화동마을주공7단지)
(74) 대리인
김선애

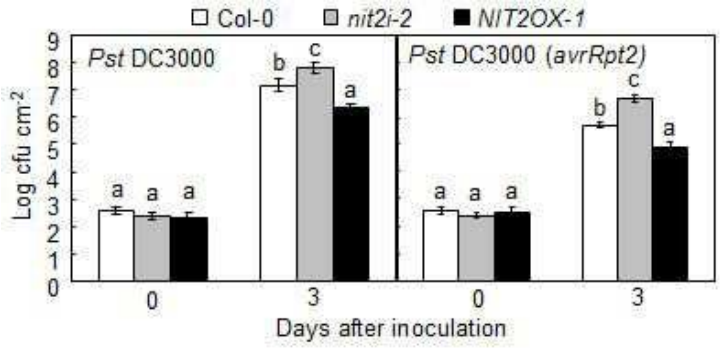
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 **애기장대의 ＮＩＴ２를 이용한 병감수성 및 저항성 형질전환 식물체**

(57) 요 약

본 발명은 병 방어 관련 애기장대 유전자 *NIT2* 유전자(NCBI Accession No. AY088028)를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물병에 대해 감수성 혹은 저항성을 갖는 형질전환 식물체 및 상기 형질전환 식물체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 애기장대의 니트릴라아제 유전자의 병저항성 기작을 밝혀내고, 식물병에 대한 감수성 또는 저항성 형질전환 식물체를 효율적으로 제작할 수 있다.

대 표 도 - 도14



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008027
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	고추에서 병저항성관련유전자의 분리와 기능분석
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

NIT2 유전자(NCBI Accession No. AY088028) 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 도입된, 슈도모나스 시린게 pv. 토마토(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)에 의한 세균성 마름병 또는 하이알로페로노스포라 아라비돕시디스 아이솔레이트 Noco2(*Hyaloperonospora arabidopsidis* isolate Noco2)에 의한 노균병에 대해 저항성을 갖는 형질전환 식물체.

청구항 2

NIT2 유전자(NCBI Accession No. AY088028)를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계; 및

상기 발현 벡터를 식물세포에 도입하는 단계;를 포함하는 슈도모나스 시린게 pv. 토마토(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)에 의한 세균성 마름병 또는 하이알로페로노스포라 아라비돕시디스 아이솔레이트 Noco2(*Hyaloperonospora arabidopsidis* isolate Noco2)에 의한 노균병에 대해 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 제조하는 방법.

청구항 3

NIT2 유전자(NCBI Accession No. AY088028)를 pB7GWIWG 벡터에 삽입하여 재조합 벡터 pB7GWIWG:*NIT2*가 도입된, 하이알로페로노스포라 아라비돕시디스 아이솔레이트 Noco2(*Hyaloperonospora arabidopsidis* isolate Noco2)에 의한 노균병에 대해 감수성을 갖는 형질전환 식물체.

청구항 4

NIT2 유전자(NCBI Accession No. AY088028)를 pB7GWIWG 벡터에 삽입하여 재조합 벡터 pB7GWIWG:*NIT2*를 제조하는 단계; 및

상기 재조합 벡터를 식물세포에 도입하는 단계;를 포함하는 하이알로페로노스포라 아라비돕시디스 아이솔레이트 Noco2(*Hyaloperonospora arabidopsidis* isolate Noco2)에 의한 노균병에 대해 감수성을 갖는 형질전환 식물체를 제조하는 방법.

청구항 5

제3항에 의한 형질전환 식물체와 살리실산 분해 돌연변이체(*nahG*), 살리실산 미생성 돌연변이체(*sid2*) 또는 살리실산 신호전달 경로 억제 돌연변이체(*npr1*)의 교잡을 통해 제조된 이중 돌연변이체.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 애기장대 식물의 식물병 방어 관련 단백질 니트릴라아제 유전자 (*Nitrilase 2*; *NIT2*)를 이용한 병감수성 및 저항성 형질전환 식물체에 대한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 애기장대의 니트릴라아제 유전자의 병저항성 기작을 밝혀내고, 이 유전자를 포함하는 세균성 마름병 또는 노균병에 대한 저항성을 갖는 형질전환 식물체 및 병저항성을 탐색하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 *NIT2* 유전자를 이용한 재조합 벡터(pBIN35S:*NIT2*)와 아그로박테리움 매개 구조적 과발현 방법(*Agrobacterium*-mediated overexpression)을 통하여 형질전환 식물체를 제작하고, 재조합 벡터(pB7GWIWG:*NIT2*)를 이용한 유전자 사일런싱 방법을 통해 이 유전자를 무발현 시키는 방법을 제공하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물은 지속적으로 기주로서 외부의 병원균에 노출되어 있다. 이들의 침입에 대한 방어를 위해 병원균 자체 혹은 병원균이 분비하는 물질패턴을 인식함으로써 식물은 방어 기작을 활성화 시킨다. 대표적인 방어반응에는 세포 대사의 재프로그램, 세포벽 강화, 항미생물질(antimicrobial compound) 합성, 병생성관련 단백질

(pathogenesis-related protein)의 생성 등이 있다. 병원균 역시 식물의 방어 기작을 무력화시키고 성공적인 병 진전을 위하여 독특한 병원성 기작을 진화시켜왔다. 병원균은 효소(enzyme)나 독소(toxin)를 내어 물리화학적으로 방어 구조를 뚫고 침입하며 이펙터(effector) 등을 내어 식물의 인식을 회피하거나 억제한다. 또는 식물의 생리적 대사활동을 조절하여 병원균이 필요한 영양분을 획득하거나 방어반응을 무력화시킨다. 병원균에 의하여 영향을 받는 식물의 생리 활성의 변화에 대한 연구는 식물의 방어 생리 기작을 밝히는 데 있어 중요한 가치가 있으며 여기에서 얻어지는 병저항성 유전자는 해당 작물의 병저항성을 극대화시킬 수 있을 뿐만 아니라 다른 식물 종의 분자육종 또한 가능하게 할 수 있다.

[0003] 한편, 니트릴라아제(nitrilase)는 indole-3-acetonitrile(IAN)을 indol-3acetic acid(IAA)로 전환을 촉매하는 효소로 애기장대(Arabidopsis)에서는 네 개의 isoform(NIT1, NIT2, NIT3, NIT4)이 존재하는 것으로 보고되었다. 이 네 개의 니트릴라아제 isoform은 식물의 여러 발육 단계 동안에 차별적으로 발현한다. 그러나 니트릴라아제가 식물과 병원균 상호작용에서의 역할 규명은 아직 미진하다. *NIT2*는 애기장대에서 병원성 균주인 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*에 감염되었을 때 잎에서 발현되는 것으로 보고되었다. 또한 뿌리혹병(clubroot)균 *Plasmodiophora brassicae*에 감염되었을 때 뿌리에서의 발현이 보고되기도 하였다.

[0004] 이러한 연구결과와는 달리 니트릴라아제가 병저항성 기작에서 어떠한 역할을 하는 지는 아직 불분명하다. 따라서 세균성 마름병균 *Pseudomonas syringase*를 애기장대에 접종한 후 프로테옴 분석을 통해 차별적으로 발현하는 니트릴라아제 유전자를 이용하여 형질전환 식물체의 제작하고 세균 생장 등의 저항성 검정 평가를 할 수 있다면, 식물의 병저항성 기작에 대한 지식적 정보를 축적할 뿐만 아니라 이를 이용하여 저항성 식물 육종, 개발에 이바지하여 식물보호 및 식량 자원 확보에 있어 실용적 대안을 제시하여 줄 것이다.

[0005] 본 발명의 배경이 되는 기술로서 세균성 마름병균 *Pseudomonas syringase*를 애기장대에 접종한 후 프로테옴 분석을 한 기존의 논문(Phytochemstry 2004. 65: 1805-1816; Proteomics 2011. 11:1664-1683) 보고가 있으나 여기서는 니트릴라아제가 보고되지 않았으며, *NIT2*를 과발현하는 형질전환 식물체를 이용하여 뿌리혹병 저항성을 검정하였으나 대조구인 야생형 애기장대 식물과 차이가 없었다는 보고가 있었다(Plant Physiol. 2000. 122:369-378). 또한, 대한민국 등록특허공보 10-0218855(1999.10.01)에는 제초제에 대한 내성의 니트릴라제를 코딩하는 적어도 하나의 유전자를 포함하는 키메라 유전자에 대해 기재되어 있으나, NIT2의 병저항성 기작에 대해서는 기재되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 10-0218855(1999.10.01)

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Jones AM et al., Phytochemstry 2004. 65: 1805-1816; Proteomics 2011. 11:1664-1683

(비특허문헌 0002) Slobodanka Grsic-Rausch et al., Plant Physiol. 2000. 122:369-378

(비특허문헌 0003) NCBI Accession no. AY088028(2006.01.27)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 비록 몇몇 방어관련 유전자들이 밝혀졌지만 복잡한 상호작용에 의해 생리활성이 조절된다는 생물학적 성질을 고려할 때 본 발명은 상술한 종래 기술상의 과제를 해결하기 위한 것이다.

[0009] 본 발명의 목적은 애기장대 세균성 마름병(*Pseudomonas campestris* pv. *tomato*)에 감염된 식물에서의 방어반응 동안에 일어나는 단백질의 발현 변화를 찾아 병관련 단백질을 탐색하여 코딩하는 유전자를 분리하고 이 유전자를 이용하여 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자가 발현이 되지 않으면 병 감수성이 증가하는 식물을 제조하여 유전자의 저항성 기능을 탐색하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적과 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 *NIT2* 유전자(NCBI Accession No. AY088028) 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 도입된, 식물병에 대해 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 제공한다.

[0013] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *NIT2* 유전자(NCBI Accession No. AY088028)를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계; 및 상기 발현 벡터를 식물세포에 도입하는 단계;를 포함하는 식물병에 대해 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *NIT2* 유전자(NCBI Accession No. AY088028)를 pB7GWIWG 벡터에 삽입하여 재조합 벡터 pB7GWIWG:*NIT2*가 도입된, 식물병에 대해 감수성을 갖는 형질전환 식물체를 제공한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *NIT2* 유전자(NCBI Accession No. AY088028)를 pB7GWIWG 벡터에 삽입하여 재조합 벡터 pB7GWIWG:*NIT2*를 제조하는 단계; 및 상기 재조합 벡터를 식물세포에 도입하는 단계;를 포함하는 식물병에 대해 감수성을 갖는 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 상기 *NIT2* 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체와 살리실산 분해 돌연변이체(*nahG*), 살리실산 미생성 돌연변이체(*sid2*) 또는 살리실산 신호전달 경로 억제 돌연변이체(*npr1*)의 교잡을 통해 제조된 이중 돌연변이체를 제공한다.

[0017] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0018] 본 발명은 분리된 애기장대 니트릴라아제2 *NIT2* 병관련 유전자를 분자생물학적 분석을 통하여 밝혀내고 발현억제와 과발현을 통하여 식물병 저항성 유도를 확인하여 달성하였다.

[0019] 따라서 본 발명은 *NIT2* 유전자(NCBI Accession No. AY088028) 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 도입된, 식물병에 대해 저항성을 갖는 형질전환 식물체 및 식물병에 대해 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 *NIT2* 유전자(NCBI Accession No. AY088028)를 pB7GWIWG 벡터에 삽입하여 재조합 벡터 pB7GWIWG:*NIT2*가 도입된, 식물병에 대해 감수성을 갖는 형질전환 식물체 및 식물병에 대해 감수성을 갖는 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0021] 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 상기 재조합 벡터는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 pB7GWIWG:*NIT2*, pBIN35S:*NIT2*이다. 상기 재조합 벡터를 이용하여 *NIT2*가 식물에서 발현이 억제되거나 (도 7 ~ 도 13 참조) 증가하였을 때(도 14 참조) 병저항성의 변화를 확인하였다.

[0022] 상기 형질전환 식물체 제조 방법은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 역전사 중합효소연쇄 반응 등 공지의 방법에 의해 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0023] 나아가, 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 식물세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법 (Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.

[0024] 본 발명에 따른 바람직한 방법은 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 아그로박테리움을 이용한 플로랄 딥핑 방법 (Plant J. 1998. 16:735-743)이 이용되었다.

[0025] 바람직하게 본 발명에서 상기 식물병은 특별한 제한이 없으며, 세균병 또는 진균병을 포함하고, 바람직하게 잿빛곰팡이병, 세균성 마름병 또는 노균병일 수 있다. 바람직하게 상기 잿빛곰팡이병의 병원균은 *Botrytis cinerea*이고, 상기 세균성 마름병의 병원균은 *Pseudomonas syringae*이다. 바람직하게 본 발명에서 상기 노균병의 병원균은 *Hyaloperonospora arabidopsidis*이다.

[0026] 본 발명에서 상기 식물체는 특별히 제한이 있는 것은 아니나, 바람직하게 애기장대일 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 *NIT2* 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체와 살리실산 분해 돌연변이체(*nahG*), 살리실산 미생성 돌연변이체(*sid2*) 또는 살리실산 신호전달 경로 억제 돌연변이체(*npr1*)의 교잡을 통해 제조된 이중 돌연변이체를 제공한다. 상기 이중 돌연변이체를 제조하기 위하여 교잡(Plant Cell 2008. 20:3161-3179) 방법을 이용하였다.

[0028] 상술한 바와 같이 본 발명에서 *NIT2*가 세균성 마름병 또는 노균병을 포함한 식물병에 대한 병저항성 조절에 중추적 역할을 한다는 것을 확인하고 *NIT2*의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 병생성 관련 단백질 (PR protein)의 유전자 정보를 축적할 수 있게 되어 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병저항성이 증진되는 생명공학적 식물을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0029] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 애기장대 식물이 세균성 마름병균 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)의 비병원성 균주에 감염될 때 특이적으로 유도되는 유전자인 니트릴라아제2를 이용하여 저항성 또는 감수성 식물 품종 개발 및 형질전환 식물체 제작에 기여하는 효과를 기대할 수 있게 된다.

[0030] 따라서 본 발명은 애기장대 니트릴라아제2 유전자원을 이용하여 저항성 품종을 개발할 수 있어 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명에 의하여 애기장대 잎에 세균성 마름병 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후, 단백질을 추출하여 이차원 전기영동을 실시한 후 실버 염색을 하여 단백질 발현 양상을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 2는 도 1에서 발현 변화를 보인 주요 단백질 점들을 확대하여 나타낸 도면이고,

도 3은 도 2에서 나타난 단백질 점들이 발현 정도를 전체 단백질 발현에 대한 백분율 수치로 나타낸 그래프이고,

도 4는 도 1에서 발현 변화를 보인 주요 단백질을 코딩하는 유전자의 세균성 마름병 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 애기장대 잎에서 발현 정도를 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 5는 애기장대 식물에 세균성 마름병 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 네 개의 니트릴라아제(nitrilase) isoform의 유전자의 발현 정도를 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 6은 애기장대 식물에 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)를 접종한 후 네 개의 니트릴라아제(nitrilase) isoform의 유전자의 발현 정도를 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 7은 재조합 벡터 pB7GWIWG:*NIT2* 제작을 위한 개략적 모식도를 나타낸 도면이고,

도 8은 도 7에서 제조한 재조합벡터 pB7GWIWG:*NIT2*를 가지는 형질전환 애기장대 식물에서 *NIT2*의 발현이 억제되는 것을 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 9는 도 7에서 제조한 *NIT2* 유전자가 사일런싱이 된 식물과 살리실산 돌연변이체와 교잡으로 제조된 이중 돌연변이체에 세균성 마름병 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 세균 생장 수를 검정한 결과를 나타낸 그래프이고,

도 10은 도 7에서 제조한 *NIT2* 유전자가 사일런싱이 된 식물과 살리실산 돌연변이체와 교잡으로 제조된 이중 돌연변이체에 세균성 마름병 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 IAA(indole-3-acetic acid)의 함량을 정량하여 나타낸 그래프이고,

도 11은 도 7에서 제조한 *NIT2* 유전자가 사일런싱이 된 식물과 살리실산 돌연변이체와 교잡으로 제조된 이중 돌연변이체에 세균성 마름병균(*Pseudomonas syringae*)을 접종한 후 살리실산(SA, salicylic acid)의 함량을 정량하여 나타낸 그래프이고,

도 12는 니트릴라아제 돌연변이체에 노균병균 *Hyaloperonospora arabidopsidis* isolate Noco2를 접종한 후 떡잎(cotyledon)에 형성된 포자경(sporangiophore)을 나타낸 도면이고,

도 13은 니트릴라아제 돌연변이체에 노균병균 *Hyaloperonospora arabidopsidis* isolate Noco2를 접종한 후 떡잎(cotyledon)에 형성된 포자경(sporangiophore) 수를 나타낸 그래프이고,

도 14는 재조합 벡터 pBIN35S:*NIT2*를 통해 *NIT2*유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 마름병 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 세균 생장 수를 검정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0033] **[실시예 1] 애기장대 식물에서의 세균성 마름병균 접종 후 프로테오믹스 분석**

[0034] **[단계 1]**

[0035] 애기장대 식물에서 병저항성 관련 단백질을 찾기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0036] 4주 생육기의 애기장대 식물 잎에 세균성 마름병 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후, 0, 24, 48시간에 잎을 수거하여 액체질소에서 곱게 갈아낸 뒤 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and 0.07% (v/v) β-mercaptoethanol이 포함된 아세톤(acetone)으로 단백질 침전을 시킨 후 고속원심분리로 얻은 침전물을 0.07% (v/v) β-mercaptoethanol이 포함된 아세톤으로 두 번 씻어내고, 다시 원심분리하여 침전물을 수거하였다. 이 침전물은 동결 건조시킨 후 용매(7 M urea, 2 M thiourea, 4.8% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfate (CHAPS), 40 mM Tris, 0.8% (v/v) Bio-lyte 3-10 carrier ampholytes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 2 mM tributyl phosphine (TBP), complete protease inhibitor cocktail)에 녹이고 braford dye binding assay로 단백질 함량을 측정하였다.

[0037] 100㎍의 단백질을 24cm의 immobilized pH gradient (IPG) strip에 올려 24시간동안 재수화를 시키고 Isoelectric focusing (IEF)과정을 총 70,000 voltage hours (Vh) 까지 되도록 수행하였다. IPG strip은 1차 안정화 용액 (6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) and 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1% (w/v) dithiolthreitol (DTT))에 15분, 2차 안정화 용액 (6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) and 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 4% (w/v) iodoacetamide)에 15분 처리한 후 12.5% SDS-polyacrylamide gel에 올려 전기영동을 실시하였다.

[0038] 전기영동 후 단백질 젤은 고정용액(12% (v/v) acetic acid, 50% (v/v) ethanol)에 2시간 처리한 후, 50% (v/v) ethanol로 20분간 세 번 씻어내고, 0.02% (w/v) sodium thiosulfate로 sensitizing 처리를 하고, 다시 물로 세 번 씻어 내었다. 이 후 단백질 젤을 20분 동안 염색용액(0.2% (w/v) silver nitrate, 0.02% (v/v)

formaldehyde) 처리를 하고 물로 1분간 씻어낸 뒤 인화용액 (6% (w/v) sodium carbonate, 0.05% (v/v) formaldehyde, 0.0004% (w/v) sodium thiosulfate)으로 염색된 단백질 점들을 시각화 하였다. 최종적으로 정지 용액 (50% (v/v) methanol, 12% (v/v) acetic acid)으로 염색과정을 종료하였다.

[0039] 실버 염색을 한 단백질 젤에서 단백질 점의 염색 강도를 비교하여 세균성 마름병 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 잎의 단백질과 건전한 식물 잎의 단백질의 발현 차이를 확인하여 도 1에 나타내었다.

[0040] **[단계 2]**

[0041] 단백질 동정을 위하여 단계 1에서 새로이 전기영동을 실시한 단백질 젤을 한 시간 동안 고정 용액(7% (v/v) acetic acid, 40% (v/v) methanol)에 처리하고 24시간 동안 염색 용액 (17% (w/v) ammonium sulfate, 3% (v/v) phosphoric acid, 1% (w/v) Coomassie brilliant blue G-250)으로 염색하였다. 단계 1에서 찾아낸 단백질 점들 단계 2에서 염색한 젤에서 찾아 젤에서 분리한 후 트립신(trypsin)으로 잘라낸 뒤 MALDI-TOF을 통하여 단백질 펩타이드의 질량을 분석하고 ProFound 웹사이트 (http://129.85.19.192/profound_ bin/WebProFound.exe)를 통해서 단백질 동정을 실시하였다. 동정된 단백질에 해당하는 단백질 점들을 확대하여 도 2에 나타내었고 이미지 분석프로그램 ImageMaster™ 2D Platium 6.0 (GE healthcare)을 통하여 단백질 발현 차이를 분석하여 도 3에 나타내었다. 이 과정에서 니트릴라아제2가 비병원성 균주 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*avrRpm1*)에 접종 후에 차별적으로 발현하는 것을 확인하였다.

[0042] **[실시예 2] 세균성 마름병균에 감염된 애기장대 식물에서 유전자 발현 변화 분석**

[0043] **[단계 1]**

[0044] 상기 실시예 1에서 수득한 동정된 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 확인하기 위하여, 애기장대 식물 잎에 세균성 마름병 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 0, 1, 5, 10, 20시간 후에 잎을 수거한 뒤 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하여 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 분석으로 관심 있는 유전자의 발현 여부를 확인한 결과 *NIT2* 유전자의 발현이 병접종 후 빠르고 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (도 4 참조). 또한 네 개의 알려진 니트릴라아제 isoform의 유전자 발현을 확인한 결과 *NIT3*, *NIT4* 유전자 역시 세균성 마름병균 접종 후 차별적으로 발현이 나타나는 것을 확인하였다 (도 5 참조). 사물기생체인 잿빛곰팡이 병원균 *Botrytis cinerea*를 접종하고 0~8일 동안 매일 잎을 수거하고 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하여 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 분석 한 결과 네 개의 유전자 모두 병감염 후 발현이 증가되는 양상을 보였다 (도 6 참조). 그러므로 니트릴라아제는 세균병 및 곰팡이병에 대한 방어 반응에 관련하는 것으로 확인되었다.

[0045] **[실시예 3] 니트릴라아제2 RNAi 돌연변이체 식물 제조와 그에 따른 병 감수성 증가**

[0046] **[단계 1]**

[0047] Salk Institute Genome Analysis Laboratory로 부터 *NIT1, NIT3, NIT4*의 발현이 억제된 T-DNA 삽입 돌연변이체 종자를 수득할 수 있었으나 *NIT2*에 대한 돌연변이체 종자는 제공되지 않았다. *NIT2* 유전자가 억제된 식물을 제조하기 위하여 RNAi 억제 기술을 도입하였다. *NIT2* 유전자에 특이적인 프라이머(primer) forward 5'-AATTCTGGATGTTGTGTTACCCTACATTCT-3'(서열번호 1) 와 reverse 5'-GTATGTGGAAATACAGTAACTTAATTAT-3'(서열번호 2)를 이용하여 PCR로 증폭한 뒤에 pENTR/D-TOPO 벡터에 삽입하였다. LR 반응을 이용하여 RNAi gateway 벡터 pB7GWIWG로 *NIT2* 유전자를 삽입하였다 (도 7 참조). 재조합 벡터 pB7GWIWG:*NIT2*는 전기천공법을 통하여 아그로박테리움(Agrobacterium tumefaciens strain GV3101)에 형질전환시킨 후 애기장대 식물에 플로랄 딥핑 방법을 통해 도입하여 형질전환식물을 제조하였다. 바람직한 형질전환식물을 선발하기 위하여 발아하는 식물에 phosphinothricin herbicide (0.04%)를 살포하여 살아남는 개체에 세균성 마름병균 비병원성 균주를 접종하고 *NIT2*의 발현 감소를 확인하였다 (도 8 참조).

[0048] **[단계 2]**

[0049] *NIT2*가 식물호르몬 옥신(IAA) 생성에 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에 또 다른 병저항성 호르몬인 살리실산

과 영향을 알아보기 위하여 살리실산을 분해하는 돌연변이체 *nahG* (Mol. Plant Microbe Interact. 1995. 8: 763-870; John Innes Centre), 살리실산 생성이 억제된 *sid2* 돌연변이체(Plant Cell1999. 11: 1393-1404, John Innes Centre), 살리실산 신호 전달 경로가 방해되는 돌연변이체 *npr1*(Cell 1997. 88: 57-63, John Innes Centre)과 *NIT2* RNAi 형질전환식물을 교잡(crossing)하여 이중 돌연변이체를 제조하였다. 니트릴라이제 돌연변이체 (*nit1*, *nit2i*, *nit3*), 살리실산 관련 돌연변이체 (*nahG, sid2, npr1)*, 그리고 이중 돌연변이체 (*nit2i nahG*, *nit2 sid2*, *nit2i npr1*)에 세균성 마름병 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 세균 생장을 검정한 결과 니트릴라아제 돌연변이체와 살리실산 관련 돌연변이체 모두 대조구보다 병감수성을 보였으며, 단일 살리실산 관련 돌연변이체보다 이중 돌연변이체의 세균 생장이 증가한 것으로 보아 *nit2i* 식물에서의 병감수성은 살리실산보다는 옥신 생성 신호전달 과정의 억제가 보다 더 관련이 있음을 시사한다(도 9 참조).

[0050] **[단계 3]**

[0051] 단계 1에서의 식물에서 대표적인 돌연변이체를 선발하여 옥신(IAA)을 정량하였다. 각각의 계통에서 1g를 액체질소에서 갈아내어 10 mL의 메탄올(MeOH)을 첨가하였다. 저온에서 두 시간 동안 추출한 뒤 원심분리로 잔재물을 제거하고 상등액을 evaporation으로 기화시켜 날려 농축시키고 물을 첨가하여 약 30%의 MeOH 농도로 맞추었다. 1M의 ammonium hydroxide를 첨가하여 pH를 8~9로 조정하고 Sep-pak C18 cartridge는 100%, 70%, 30% 순으로 MeOH를 흘려 준비한 후에 cartridge에 로딩하였다. 70% MeOH로 elution하고 다시 100% MeOH로 elution하여 합치고 전체 MeOH 농도가 50% 이하가 되도록 물을 첨가하였다. 같은 용량의 diethyl ether로 층분리를 두 번 수행한 후에 상등액을 evaporation 하여 날리고 최종산물을 100% MeOH로 녹여 낸 뒤 IAA ELISA KIT를 이용하여 정량하였다. 그 결과 *NIT2* 유전자가 억제된 단일 *nit2i* 돌연변이체와 이중 돌연변이체 *nit2i nahG*에서만 IAA 생성이 감소되었다 (도 10 참조).

[0052] **[단계 4]**

[0053] 단계 1, 2에서 살리실산의 영향을 알아보기 위하여 각각의 계통에서 살리실산을 정량하였다. 수득한 잎을 액체질소에서 갈아내어 90% MeOH로 추출하고 internal stadard 물질로 3-hydroxybenzoic acid를 첨가하였다. 원심분리를 통하여 얻는 상층액을 수득하여 evaporation한 뒤에 5% (v/v) trichloroacetic acid (TCA)에 녹이고 ethylacetate:cyclopentance:isopropanol (50:50:1)을 넣어 층을 분리하여 상층액을 수거하여 다시 evaporation하여 용매를 날리고 40% MeOH에 녹여 0.2 μM 필터에 걸러내었다. 층분리하여 남은 하층액에는 염산을 첨가하여 pH를 1로 맞추고 30분간 고열처리하여 salicylic acid β-glucoside (SAG)를 추출하였다. 추출된 살리실산은 high pressure liquid chromatohraphy (HPLC)에서 C18 column을 이용하여 분석하였다. HPLC 다텍터 조건은 형광 excitation 305 nm, emission 405 nm로 실시하였다. 살리실산 정량 결과 살리실산을 분해하는 단일/이중 *nahG* 돌연변이체에서만 살리실산이 감소한 것을 관찰하였다. 그러므로 *NIT2*의 억제로 인한 병감수성은 살리실산에 영향을 받은 것이 아님을 확인하였다 (도 11 참조).

[0054] **[단계 5]**

[0055] 니트릴라아제 돌연변이체에 노균병균 *Hyaloperonospora arabidopsidis* isolate Noco2를 5 x 10^4 spores/mL 농도로 접종하고 7일에 관찰한 결과 야생형 식물보다 더 많은 수의 포자경 형성을 관찰하였다 (도 12 참조). 떡잎을 수거하여 각각의 포자경 형성을 검정한 결과 니트릴라아제 돌연변이체에서 포자경 형성이 증가하였다(도 13 참조). 그러므로 니트릴라아제의 억제가 노균병에 대한 감수성을 부여한다는 것을 알 수 있었다.

[0056] **[실시예 4] *NIT2* 유전자 과발현 형질전환 식물체의 제조 및 병저항성 탐색**

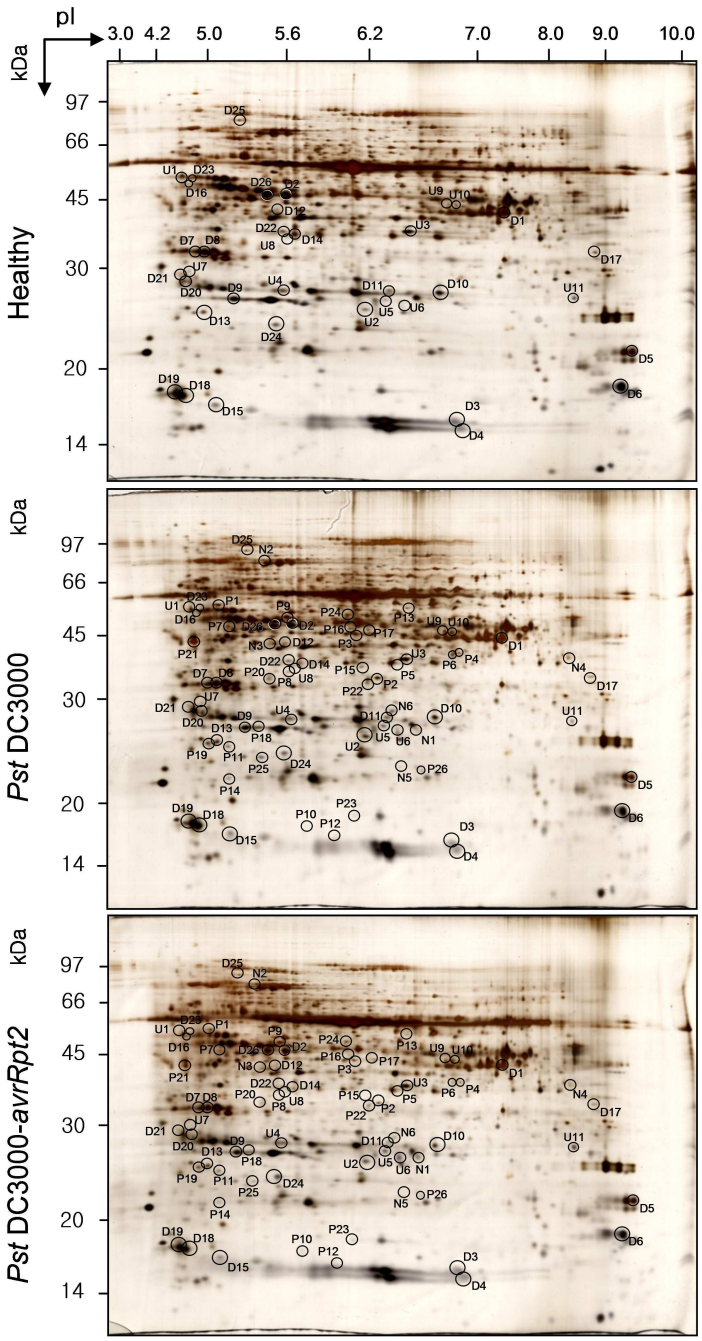
[0057] **[단계 1]**

[0058] pBIN35S 벡터에 *NIT2* 유전자를 삽입하여 만든 재조합벡터 pBIN35S:*NIT2*를 아그로박테리움에 형질전환시킨 후 플로랄 딥핑(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물체에 *NIT2* 유전자의 과발현을 유도하였다. *NIT2*가 과발현된 형질전환식물에 세균성 마름병 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*와 이 병원균의 비병원성 균주 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato (avrRpm1)* 균주를 5 x 10^4 cfu/mL 농도로 접종하고 0, 3일에 잎을 수거하여 잎의 세균 증식을 측정한 결과 *NIT2* 유전자가 과발현한 식물들에서 병원성 균주와 비병원성 균주의 증식이 모두 야생형 식물(Col-0)에서 보다 억제되었다 (도 14 참조). 그러므로 *NIT2* 유전자가 세균성 마름병균에 대한 저항성을 부여함을 알 수 있었다.

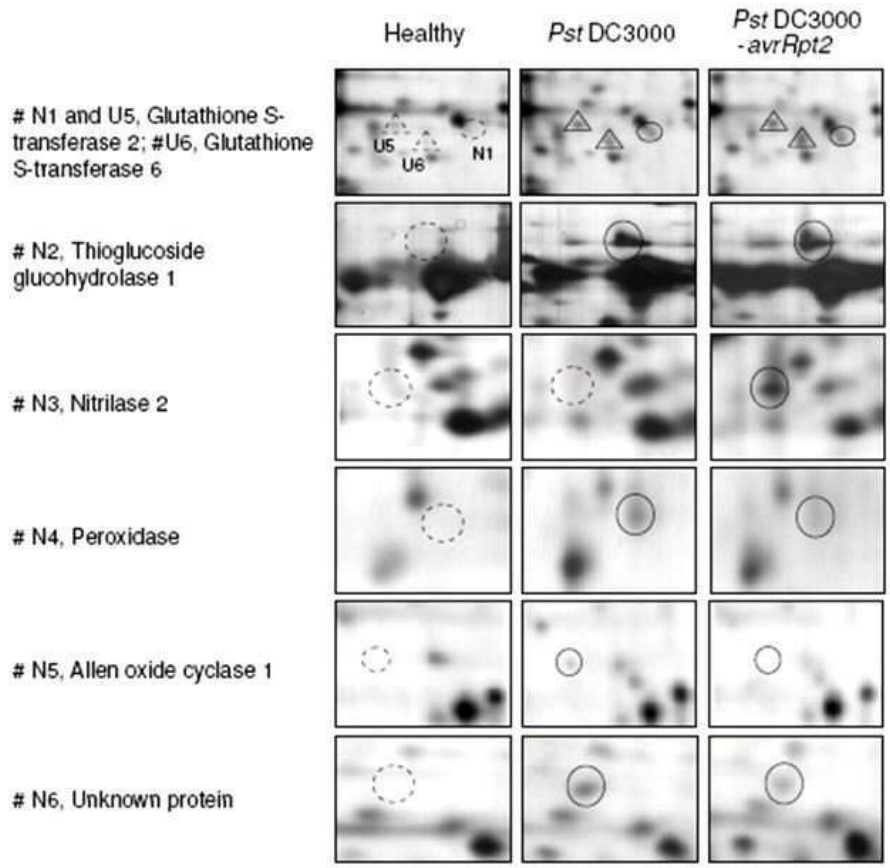
[0059] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

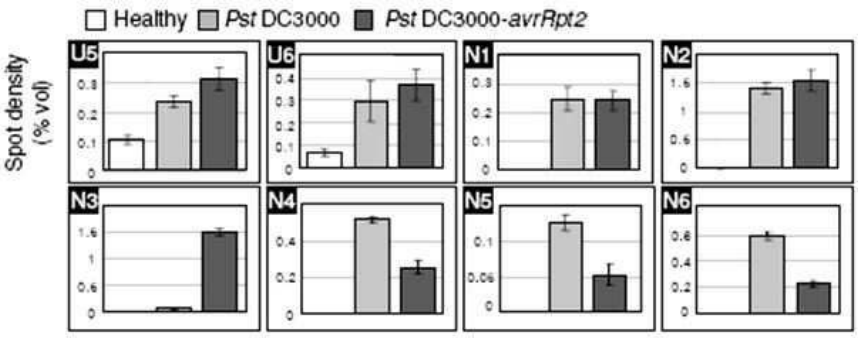
도면1



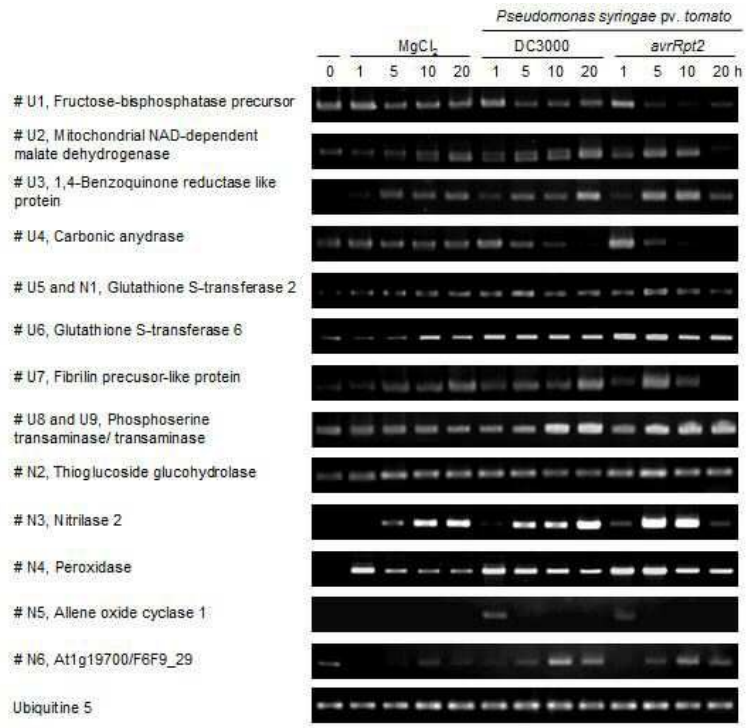
도면2


Healthy
Pst DC3000
Pst DC3000 -avrRpt2
N1 and U5, Glutathione S-transferase 2; #U6, Glutathione S-transferase 6
U5
U6
N1
N2, Thioglucoside glucohydrolase 1
N3, Nitrilase 2
N4, Peroxidase
N5, Allen oxide cyclase 1
N6, Unknown protein

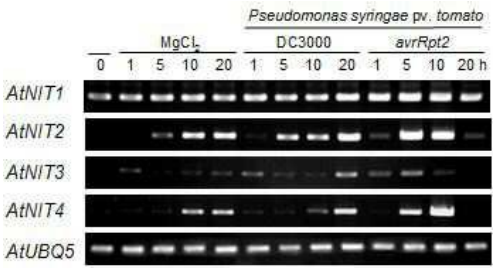
도면3


Healthy
Pst DC3000
Pst DC3000-avrRpt2
Spot density (% vol)
U5
U6
N1
N2
N3
N4
N5
N6

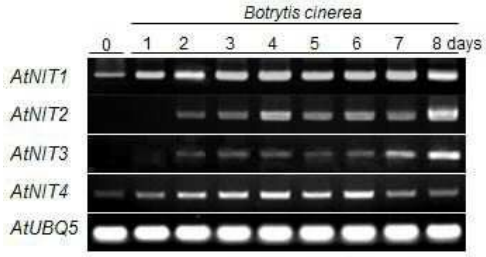
도면4



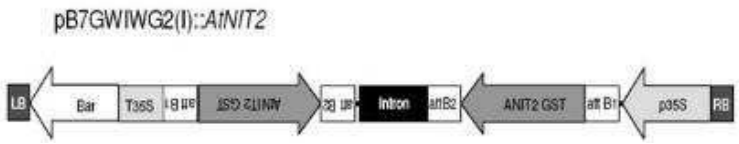
도면5



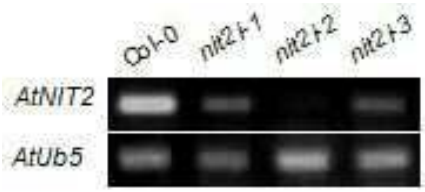
도면6



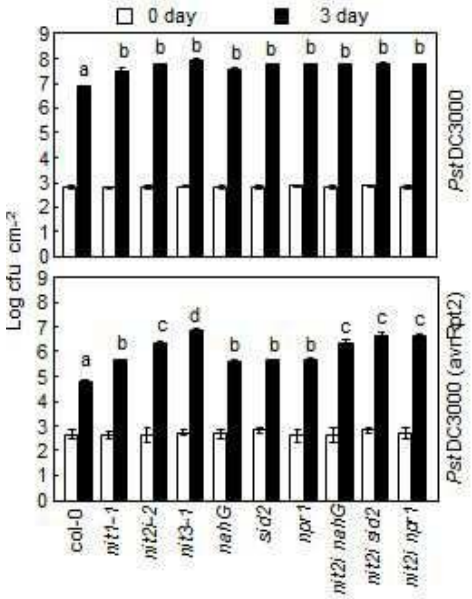
도면7



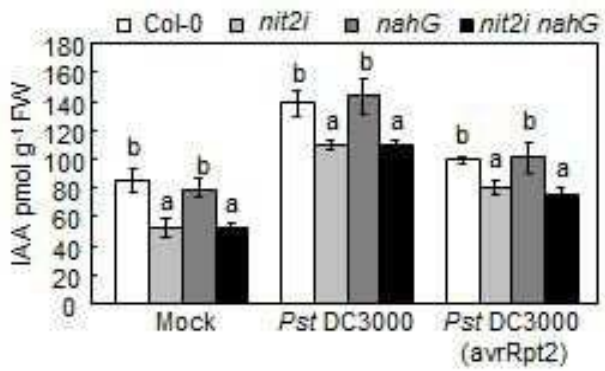
도면8


Col-0
nit2-1
nit2-2
nit2-3
AtNIT2
AtUb5

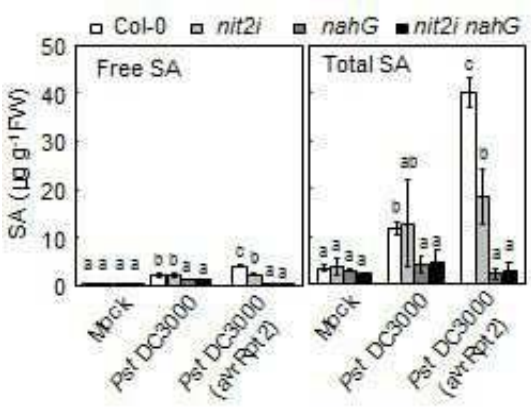
도면9


0 day
3 day
Log cfu cm-2
Pst DC3000
Pst DC3000 (avrRpt2)
col-0
nit1-1
nit2-2
nit3-1
nahG
sid2
npr1
nit2i nahG
nit2i sid2
nit2i npr1

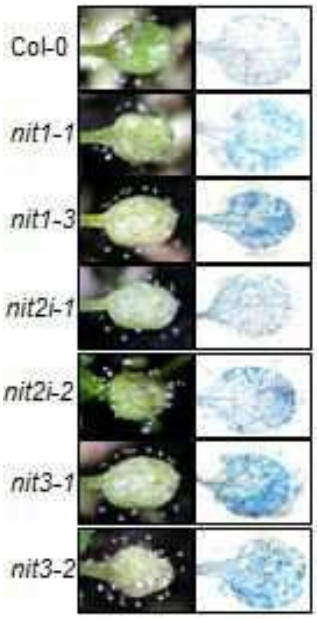
도면10


Col-0
nit2i
nahG
nit2i nahG
IAA pmol g-1 FW
Mock
Pst DC3000
Pst DC3000 (avrRpt2)

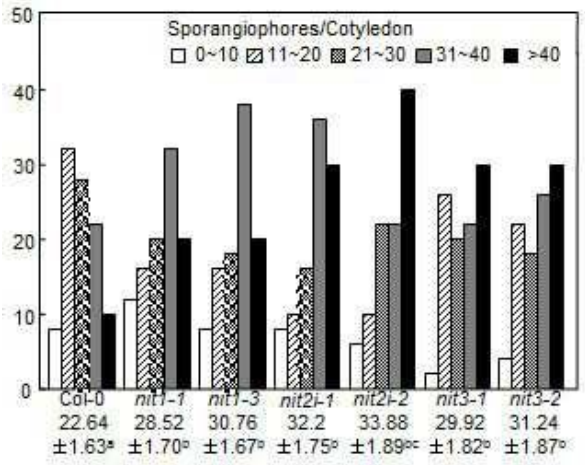
도면11



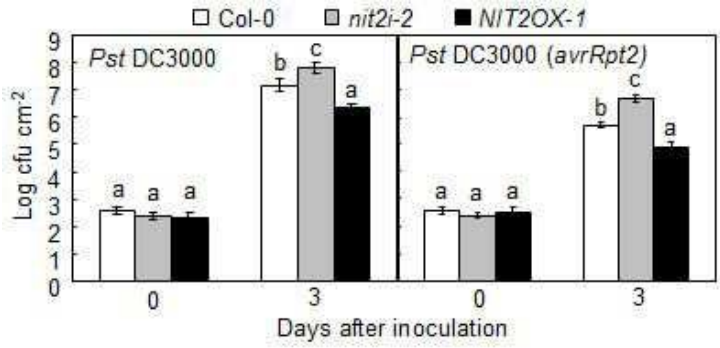
도면12



도면13



도면14



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부