(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0017784
(43) 공개일자 2009년02월19일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0082196
(22) 출원일자 2007년08월16일
심사청구일자 2007년08월16일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
백경희
서울 강남구 대치동 쌍용아파트 3-1411
임지혁
충북 청주시 상당구 영운동 삼일아파트 103-608
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이문섭, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 7 항

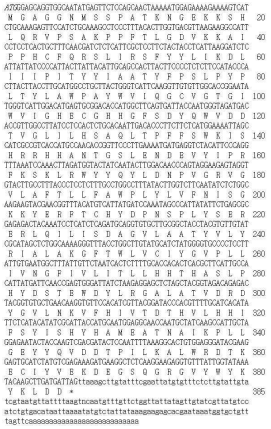
(54) 식물의 방어반응에 관여하는 고추식물 유래 CaFAD1유전자 및 그 용도

(57) 요 약

본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 고추식물 유래의 CaFAD1 (*Capsicum annuum* fatty acid desaturase 1) 유전자에 관한 것이다. 구체적으로는, 고추식물의 병원체에 대한 방어반응에 관여하는 CaFAD1 유전자에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 고추식물로부터 cDNA 마이크로어레이를 이용하여 FAD1을 코딩하는 cDNA 클론을 분리하였으며, VIGS(virus-induced gene silencing) 기술을 이용하여 CaFAD1이 TMV 및 Xcv에 대한 병 저항성을 유도하는 것을 밝혔다. 따라서 상기 유전자를 이용할 경우 고추식물의 방어반응을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

김기정

서울 용산구 한남2동 729-9번지 101호

최수복

서울 성북구 안암동5가 151-18 301

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 고추식물 유래의 CaFAD1 (Capsicum annuum fatty acid desaturase 1) 유전자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 염기서열은 서열번호 1인 것을 특징으로 하는 CaFAD1 유전자.

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 고추식물 유래의 CaFAD1 단백질.

청구항 4

제 3항에 있어서, 식물에서 병원체에 대한 과민반응에 특이적으로 발현이 증가되는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 CaFAD1 단백질.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항의 CaFAD1 유전자를 포함하는 재조합벡터.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항의 CaFAD1 유전자 또는 그로부터 발현되는 CaFAD1 단백질을 유효성분으로 함유하는 식물의 질병 저항성 증가용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 질병 저항성은 TMV 또는 Xcv로 유발되는 것을 특징으로 하는 식물의 질병 저항성 증가용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 식물의 방어반응에 관여하는 고추식물 유래 CaFAD1 유전자 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 고추식물 유래의 CaFAD1 (*Capsicum annuum* fatty acid desaturase 1) 유전자에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 식물은 국부의 생물적 및 비생물적 스트레스에서 살아남기 위해 다양한 방어기작을 발전시켜왔다. 식물의 방어반응은 일반적으로 복수유전자 (multiple genes)의 조화된 전사활성화 (orchestrated transcriptional activation)와 2차 대사산물의 축적을 일반적으로 포함하고, 종종 과민반응(HR)의 활성화와 전신획득저항성 (systemic acquired resistance)의 발달을 수반한다 (Ryals et al., 1996 Systemic Acquired Resistance. The Plant Cell 8:1809-1819; Dangl and Jones, 2001 Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411:826-833). 이들 유도된 반응이 주어진 식물-병원체 상호작용 동안 신속하고 대등하게 일어날 때, 식물은 질병에 대한 저항성을 가지게 된다. 감염되기 쉬운 식물은 방어기작의 개시가 병원체 감염에 대해 더 느리게 반응한다. 따라서 침입하는 미생물을 적시에 인식하는 것, 그리고 신속하고 효과적으로 방어반응들을 유도하는 것은 저항성의 식물과 감염되기 쉬운 식물사이에서 주요 차이점을 만드는 것으로 보인다 (Yang et al., 1997 Signal perception and transduction in plant defecse responses. Genes Dev. 1;11(13):1621-39).

<3> 담배 모자이크 바이러스 (Tobacco mosaic virus, TMV)는 매우 폭넓은 숙주 범위를 가지는 침입자 중의

하나이다. 감염된 고추식물로부터 분리된 TMV는 저항성 유전자들과 그들의 상호작용에 기초로 하여 증가한 병원성(pathogenecity)의 4개의 하위그룹(subgroups)인 병원형 P_0, P_1, $P_{1.2}$, $P_{1.2.3}$ 로 분류되어 왔다 (Boukema et al., 1982 Resistance to TMV in Capsicum chacoense in Capsicum L. Euphytica 29:433-439). 그러나 발병-관련 (pathogenesis-related, PR) 단백질들은 병을 일으키는 원인균에 의해 또는 이와 관련된 유사한 발병 환경 상태에서 유도되는 식물단백질로 정의되었고 (Van Loon et al., 1994 Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Mol Biol Reporter 12:245-264), 저항성 식물이 무독성 병원체에 의해 감염 (challenge)되는 부적합한 상호작용 (incompatible interaction)에서 활성의 식물 방어 레퍼토리의 구성 요소로써 더욱 신속하게 대부분이 발현되었다 (Dong et al., 1991 Induction of Arabidopsis Defense Genes by Virulent Pseudomonas symgae Strains and by a Cloned Avirulence Gene. The Plant Cell 3:61-72).

<4> 방어반응과 관련된 유전자의 동정과 분석은 식물 방어반응 이면에서 전체 개요를 이해하는데 필수단계이며, 이러한 것은 병-저항성 식물의 생성(generation)을 도와줄 수 있다. 본 발명에서는, 고추(Capsicum annuum)로부터 얻은 cDNA 라이브러리의 differential screening에 의해 CaFAD1 cDNA 클론을 분리하였다. 클론된 이 유전자는 담배 모자이크 바이러스 (TMV) 병원형 P_0 및 *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* (Xcv) 감염에 대한 저항성 반응에서 유도되었다.

<5> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 본 발명의 CaFAD1 유전자가 식물의 병 저항성에 관여함을 밝혀내어, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 고추식물에서 병원체에 대한 병 저항성에 관여하는 CaFAD1 유전자 및 그 단백질을 제공하는 데 있다.

<7> 본 발명의 다른 목적은 상기 CaFAD1 유전자 및 그 단백질을 이용한 식물의 병 저항성 증가용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<8> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 고추식물 유래의 CaFAD1 (*Capsicum annuum* fatty acid desaturase 1) 유전자를 제공한다.

<9> 본 발명의 CaFAD1 유전자에서, 상기 염기서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 어떠한 염기서열일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1인 것이 바람직하다.

<10> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 고추식물 유래의 CaFAD1 단백질을 제공한다. 상기 CaFAD1 단백질의 full-length cDNA는 55kD를 가진 385개의 아미노산의 폴리펩타이드를 코딩한다 (도 2).

<11> 본 발명의 CaFAD1 단백질에서, 식물에서 병원체에 대한 과민반응에 특이적으로 발현이 증가되는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서 CaFAD1 단백질은 병원체 (TMV 및 Xcv)에 감염된 잎에서 다량 축적되었으며, 과민반응 동안에 특이적으로 유도됨을 확인하였다 (도 5).

<12> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 CaFAD1 유전자를 포함하는 재조합벡터를 제공한다. 본 발명의 CaFAD1 유전자를 이용하여 식물체의 형질전환용 제조합 벡터를 제조할 수 있다. 상기 CaFAD1 유전자를 발현하는 재조합 벡터는 공지의 식물 발현용 벡터를 기본 벡터로 하여 제조될 수 있으며, 일반적인 바이너리 벡터(binary vector), 코인테그레이션 벡터(cointegration vector) 또는 T-DNA 부위를 포함하지는 않지만 식물에서 발현될 수 있도록 디자인된 일반 벡터가 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에 이용될 수 있는 바이너리 벡터는 *A. tumefaciens*의 Ti 플라스미드와 함께 존재 시 식물체를 형질전환 시킬 수 있는 T-DNA의 BR과 BL을 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으며, 예컨대, pGA 계열, pCG 계열, pCIT 계열, pGPTV 계열, pBECK2000 계열, BiBAC 계열, 및 pGreen 계열 벡터 등을 사용할 수 있다.

<13> 상기 발현용 벡터는 CaFAD1 유전자가 도입된 식물체를 효과적으로 선발하기 위한 선발인자로 하이그로마이신 내성 유전자 (hygromycin resistant gene) 등의 항생제 내성 유전자, bar 유전자 등의 제초제 저항성 유전자, 및 GUS, GFP (green fluorescent protein) 및 LUX (luciferase) 등의 표지유전자 등을 포함할 수 있으며, 식물세

포에서 목적유전자의 RNA 염기서열을 생산하게 하는 프로모터(promoter), 목적으로 하는 유전자의 정보를 가지고 있는 구조 DNA 염기서열 및 식물세포에서 RNA 염기서열의 3' 말단에 폴리아데닐화된 뉴클레오타이드(polyadenylated nucleotide)를 생산하는 기능을 하는 3' 비전사(nontranslated) DNA 염기서열 등으로 이루어진 구조를 적어도 하나 이상을 포함한다. 또한, 상기 벡터는 리포터 분자 (예, 루시퍼라아제 및 β-글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가로 포함할 수 있다.

<14> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 CaFAD1 유전자 또는 그로부터 발현되는 CaFAD1 단백질을 유효성분으로 함유하는 식물의 질병 저항성 증가용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 CaFAD1 유전자, 단백질 또는 재조합 벡터 외에 식물제제에 일반적으로 사용되는 안정화제 또는 부형제를 유효성분으로서 더 포함할 수 있다. 구체적으로, CaFAD1 단백질을 제제로 만들어 식물체에 직접 투여하거나, CaFAD1 유전자를 상기 공지의 식물 발현용 벡터에 클로닝하여 재조합 벡터를 만든 후, 아그로박테리움(*A. tumefaciens*)을 통하여 식물체에 형질전환시킴으로써, 식물체 내에서 CaFAD1 단백질을 발현시켜서 이로 인해 질병 관련 유전자들(예컨대 CaPR-1, CaPR-2, 및 CaPR-5)의 발현을 증가시킴으로써, 궁극적으로 고추식물의 저항성을 증가시킬 수 있다.

<15> 본 발명의 식물의 질병 저항성 증가용 조성물에서, 상기 질병은 TMV 또는 Xcv 병원체로 유발되는 것을 특징으로 한다. 본 발명에서 TMV 및 Xcv에 대한 병 저항성 반응 동안 CaFAD1의 발현이 크게 증가하는 것을 확인하였다(도 5).

<16> 본 발명의 조성물은 질병 저항성이 약화된 식물체에 투여할 때 큰 효과를 볼 수 있다. 유전적 요인 또는 환경적 요인으로 인해 식물체 자신의 CaFAD1 유전자의 발현이 저하되어 병 저항성이 약화된 식물체의 빠른 회복을 유도할 수 있으며, 일정 투여량 이상에서는 투여량 효과(dose effect)에 의해 정상상태, 즉 야생형보다 더 높은 질병 저항성 효과를 유도할 수 있다.

<17> 본 발명에서는 역유전학적인 접근방법으로, TRV에 기초한 VIGS 방법 (Chung et al., 2004 A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper(*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). Mol Cells 17:377-380)을 사용하였다. 이 때 고추 CaFAD1의 억제(suppression)는 식물체에서 TMV-P_0를 처리하였을 때, 대조군 식물체와 비교하여 현저히 높은 TMV-CP(coat protein)의 축적량을 나타내었다. 이러한 결과는 CaFAD1이 식물체에서 저항성 반응에 관여하고 있다는 것을 의미하며, 이를 이용하여 병충해가 많은 고추의 저항성을 증진시킬 수 있는 유전자로서 CaFAD1가 유용하게 사용될 수 있음을 증명하는 것이다.

<18> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

효 과

<19> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 지금까지 연구가 거의 되어있지 않은 유전자인 FAD가 식물의 병저항성 반응에서도 발현이 특이적으로 증가되고 바이러스 유도 유전자 억제(VIGS)를 통해 CaFAD1이 저항성 기능을 수행함을 밝히고 앞으로 CaFAD1 유전자가 식물체 내 병저항성 반응을 연구하는데 높은 가지가 있을 것이라는 가능성을 보여주었다. 또한 이 CaFAD1 유전자를 이용하여 식물의 방어반응이 증가된 형질전환 식물을 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<20> **실시예 1. 식물 재배 및 병원균 접종**

<21> 실험에서 사용된 고추 부강 품종(hot pepper(*Capsicum annuum L.*) cv. Bugang plants)은 파종하여 25℃ 온실, 혹은 식물 배양실에서 재배되었다 (photo period cycle- 16h light and 8h dark). 부강은 TMV(Tobacco mosaic virus)의 병원형(pathotype)인 P_0에 저항성을 보이나 이와 반대로 $P_{1.2}$에는 감수성을 보인다. 또 TMV에 감수성을 보이는 고추의 다른 재배종인 Early Calwonder (ECW)는 Xcv(*Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*)에 감수성을 보이며, ECW의 자매계통(near-isogenic line)인 ECW20R은 같은 병원균(bacteria)에 저항성을 보이므로 병원체 접종(pathogen inoculation)과정에서 이들을 이용하였다.

<22> 파종 뒤 2달 정도 자란 고추의 잎에 TMV와 Xcv를 처리하였다. TMV는 적당량의 카보런덤(carbolandum)과 섞어 붓을 이용하여 문질러주었으며, Xcv는 바늘을 뺀 주사기를 이용하여 침투(infiltration)시켰다.

<23> **실시예 2. RT-PCR 분석**

<24> RT-PCR을 수행하기 위하여, 각각을 처리한 후 고추 잎들로부터 총 RNAs를 분리하였다. 그 후 QuantumRNA™ Universal 18s Internal Standard (Ambion, USA)에 따라 RT-PCR 반응을 수행하였다. cDNA 단편들을 증폭하기 위하여, RT-PCR에 사용된 프라이머는 다음과 같다.

<25> 5'-GAG GGA TAC GAA GGA GTG-3'

<26> 5'-GAT GGA CAT AAC GAT AC-3'

<27> **실시예 3. VIGS를 이용한 CaFAD1의 발현억제**

<28> VIGS(virus-induced gene silencing)는 바이러스에 대항하여 RNA가 매개하는 식물방어 기작의 일종으로 도 1과 같은 원리로 작용한다. VIGS는 전사-후 유전자 억제(Post-transcriptional gene silencing, PTGS)의 일종으로 전사-후(post-transcriptional), RNA 턴-오버(RNA turnover), 뉴클레오티드 서열-특이적(nucleotide sequence-specific) 이라는 특징들을 가진다. VIGS 벡터(vector)로는 PVX (Potato virus X) amplicon이나 TRV (Tobacco rattle virus)에 식물 유전자를 클로닝하여 사용하는데, 이 실험에서는 Liu, Y., et al., (2002) [Virus-induced gene silencing in tomato. Plant J. 31(6)]에 보고된 pTRV1과 pTRV2 vector를 사용하였다.

<29> 아그로박테리움 침투(Agrobacterium infiltration)를 위해 pTRV1과 pTRV2, 그리고 억제(silencing)하고자 하는 목적(target) 유전자인 CaFAD1이 VIGS vector인 pTRV2의 *BamH*I 제한효소 부위에 연결(ligation)된 재조합 플라스미드(recombinant plasmid) (pTRV2-CaFAD1, 도 7)를 준비하였다. 이들을 급속 냉-해동법(freeze-thaw method, An et al. 1988)을 통해 *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 strain에 형질전환(transformation)한 뒤 각 strain을 50 mg/ml의 카나마이신(kanamycin)과 50 mg/ml의 리팜피신(rifampicin)이 들어간 5 ml YEP에서 28℃, 밤새(overnight) 배양하였다. 배양된 세포들은 원심분리(centrifugation; 3000rpm, 15분)를 거쳐 침투버퍼(infiltration buffer; 20 mM citric acid, 2% sucrose, 및 200 μm acetosyringone, pH 5.2)로 resuspension 한 뒤, $O.D_{600}$ = 0.3의 값을 갖도록 침투버퍼(infiltration buffer)로 농도를 조절하였다. 약 1:1.5의 비율로 pTRV1에 pTRV2와 pTRV2-CaFAD1을 각각 혼합(mix)한 뒤 바늘이 없는 1 ml 주사기를 이용하여 고추의 떡잎 뒤에 주입해준다. 이 때 사용하는 고추는 18℃, 습도 30%에서 발아시켜 이용하였다.

<30> 성공적인 VIGS를 확인하기 위하여 광합성 관련 유전자인, PDS 유전자(phytoene desaturase gene)를 마커로 사용하였고, 이 마커에 의한 표현형(phenotype)은 처리 후 7일부터 잎에서 관찰할 수 있었다. 유전자의 억제를 확인하기 위하여 특이 프라이머(specific primer)(5'-GAG GGA TAC GAA GGA GTG-3', 5'-GAT GGA CAT AAC GAT AC-3')를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

<31> **실시예 4. ELISA를 이용한 TMV 검출**

<32> TMV를 접종 후 이틀 뒤, 접종한 잎의 상부 잎 조직을 코팅버퍼(coating buffer)(15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9.6; 1 ml buffer per 100 mg 조직)에 넣고 빻은 뒤, 상온에서 6분간 7,000rpm으로 원심분리 하였다. 결과로 생기는 상층액에서 100 μl를 추출해 양성 및 음성 대조군(positive and negative control)과 함께 각각의 웰(well)에 들어있는 두 개의 microtiter plate의 표면에 발라주었다. 이어 0.05% Tween-20 (PBST)을 포함하고 있는 200 μl의 phosphate-buffer saline으로 3번 씻어준 후에, 200 μl 의 blocking buffer (0.5%의 무지방 건조 분말우유를 함유한 PBST)를 각각의 웰에 첨가하고, 4℃에서 하룻밤을 두었다. 이어 전과 같은 방법으로 씻어준 후에, Plate를 37℃에서 1시간 배양하고, Polyclonal anti-TMV antibody (100 μl/well, 0.2%의 bovine serum albumin (BSA)을 포함한 PBST로 1/2000 비율로 희석해준다)와 함께 다시 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 3번 세척 후 alkaline-phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma, USA; 100 μl per well, PBST/0.2% BSA로 1/4000비율로 희석)를 첨가하고, plate를 37℃에서 1시간 동안 배양한 뒤 PBST로 4번 씻어준 후에 Fast p-Nitrophenyl Phosphate Tablet Set (Sigma, USA)으로 색의 발현을 알아보았다. 흡광도 계수는 405nm이고, ELISA reader (Bio-Rad, USA)를 사용하였다.

<33> **실험결과 1. CaFAD1의 동정**

<34> 바이러스 혹은 박테리아 병원체 (pathogen)에 대한 과민반응(hypersensitive response, HR) 동안에 유도되는 고추의 유전자들을 분리해 내기 위하여, TMV와 Xcv에 감염된 고추의 잎에서 RNA를 분리하여 cDNA microarray를 수행하였다. 증가-조절된 유전자들 중 하나의 유전자가 다른 여러 가지 식물체의 FAD1의 서열과 유사성이 있음을 확인하였으며, 본 발명의 full-length CaFAD1 cDNA가 385개의 아미노산의 폴리펩타이드를 코딩하고 있음을 확인하였다 (도 2).

<35> **실험결과 2. 병원균 침입시 증가된 CaFAD1의 발현**

<36> 고추의 한 재배종으로 분류되는 부강은 TMV의 pathotype인 P_0과 P_1에는 HR등의 저항성을 보이나, $P_{1.2}$에는 감수성을 보인다 (Park et al. 2002 Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to Tobacco mosaic virus. Plant Mol Biol 48:243-254). TMV에 대한 질병 저항성 반응 중 유도되는 CaFAD1을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과, TMV-P_0의 접종 이후 약 36시간이 지난 후 눈에 띄게 CaFAD1의 전사체(transcript) 양이 증가함을 확인할 수 있었다. 그러나 TMV-$P_{1.2}$를 처리하였을 때에는 CaFAD1 전사체 양에서의 큰 변화를 확인 할 수 없었다 (도 3). 이러한 결과는 CaFAD1의 발현이 TMV 접종에 대한 HR 반응에 특이적으로 유도된다는 것을 예측할 수 있게 한다.

<37> CaFAD1의 유도가 TMV 이외에 다른 병원체에 대한 방어기작에도 관여하는 가를 알아보기 위하여 박테리아인 Xcv(*Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*)로 동일한 실험을 수행하였다. 이에 감수성을 가지고 있는 고추의 재배종 ECW는 Bs2 유전자를 가지고 있지 않으며, 이에 대한 isogenic line인 ECW20R은 Xcv의 avr gene인 avrBs2에 대해 저항성을 보이는 Bs2의 dominant allele를 지닌다 (Tai et al. 1999 Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. Proc Natl Acad Sci USA 96:14153-14158). CaFAD1의 전사체는 TMV에 대한 저항성을 보이는 잎에 다량 축적되었으며, 박테리아 감염에 대한 HR 동안에도 발현되는 것이 확인되었다 (도 3). CaFAD1 전사체는 ECW20R에서 12시간 이내에 모두 발견되었고, ECW에서는 24시간에서 발견되었다. 그리고 ECW 20R에서 훨씬 강한 발현 패턴을 보이는 것으로 볼 때, CaFAD1이 바이러스와 박테리아에 대한 저항성 반응에 모두 유도되는 유전자일 것으로 예상할 수 있다.

<38> **실험결과 3. 고추에서 VIGS를 실시한 CaFAD1의 표현형**

<39> VIGS는 고추를 포함하는 다양한 식물에서 기능 유전자(functional gene)의 특성연구에 있어 널리 이용되는 방법이다 (도 1참조). 1,158 bp open reading frame을 지닌 full CaFAD1 cDNA를 이용해, 이를 pTRV2에 연결하여 VIGS를 수행하였다. VIGS 결과, TRV2-CaFAD1에 감염된 식물체는 야생형(wild type) 또는 TRV2를 감염시킨 식물체와 눈에 띄는 표현형의 차이를 보이지 않았다 (도 4). 그러나 병원체-관련 유전자(Pathogen-Related gene, PR gene)들 중 CaPR-1, 2, 5의 전사체 수준이 약해지는 것을 보였다 (도 5).

<40> **실험결과 4. CaFAD1의 발현이 저하된 고추 식물의 TMV에 대한 약화된 저항성**

<41> TMV에 대한 병 저항성 반응 중 CaFAD1의 발현이 크게 증가하는 것을 본 것에 이어 (도 6), VIGS를 통해 CaFAD1이 억제된 식물체를 이용하여 다시 한번 CaFAD1의 기능을 확인하고자 하였다. VIGS 이후 1달 정도가 지난 뒤에 TMV-P_0을 처리하고 접종 후 48시간이 지나 이를 샘플링 하였다.

<42> 고추 잎의 TMV에 대한 저항성에 CaFAD1 유전자가 관여함을 확인하기 위해, TMV의 coat protein (CP)을 이용하여 ELISA를 수행하였다 (실시예 4). 잎에 축적된 TMV-CP는 바이러스 증식(viral replication)의 표지(indicator)로 작용할 수 있다 (Holzem et al., 2001). 대조군 식물에서 TMV-CP가 축적되는 양상을 확인하기 위해서, TRV2를 감염시킨 식물체에 TMV-P_0을 처리하여 이용하였다. CaFAD1이 억제된 고추의 잎에서도 역시 TMV-P_0을 처리하여 샘플링한 뒤 잎의 단백질을 분리해 내어 ELISA를 이용해 TMV-CP가 축적된 양을 측정하였다. CaFAD1이 억제된 식물체에서의 TMV-CP 축적량은, TRV2 대조군 식물에 비하여 현저히 높게 나타났다. 이를 통해 TMV의 증식이 CaFAD1이 억제되었을 경우 더 높게 나타난다는 것을 확인할 수 있었다 (도 6).

도면의 간단한 설명

<43> 도 1은 본 발명에 사용된 RNA silencing mechanism(VICS)을 나타낸 것이다.

<44> 도 2는는 CaFAD1의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸다.

<45> 도 3는 TMV 또는 Xcv를 처리했을 때 CaFAD1의 RT-PCR 결과를 나타낸 것이다.

<46> 도 4은 TRV2와 TRV2-CaFAD1을 VIGS 수행한 고추식물의 표현형을 나타낸 것이다.

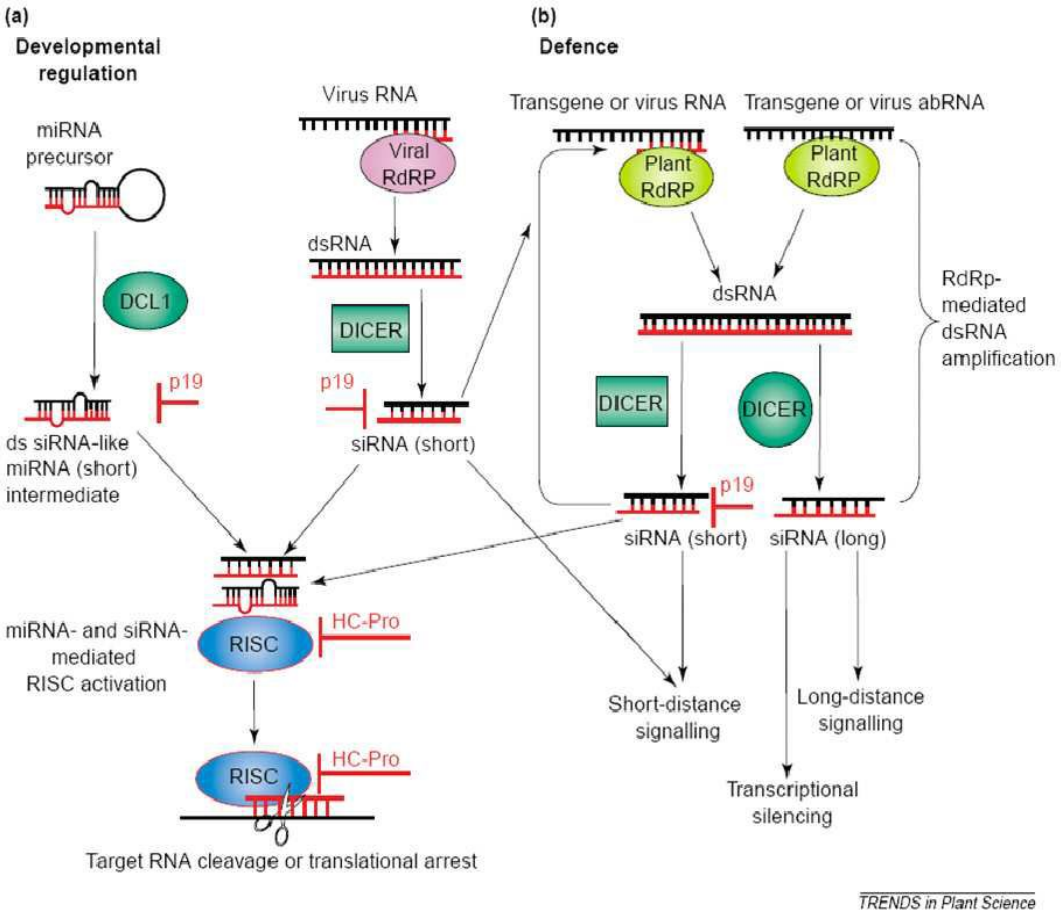
<47> 도 5은 CaFAD1-억제된 고추식물에서 다양한 PR 유전자들의 발현 수준을 나타낸 것이다.

<48> 도 6은 VIGS-수행한 고추식물의 TMV 저항성을 비교한 것이다.

<49> 도 7은 본 발명에 따른 재조합 플라스미드 pTRV2-CaFAD1의 개열지도이다.

도면

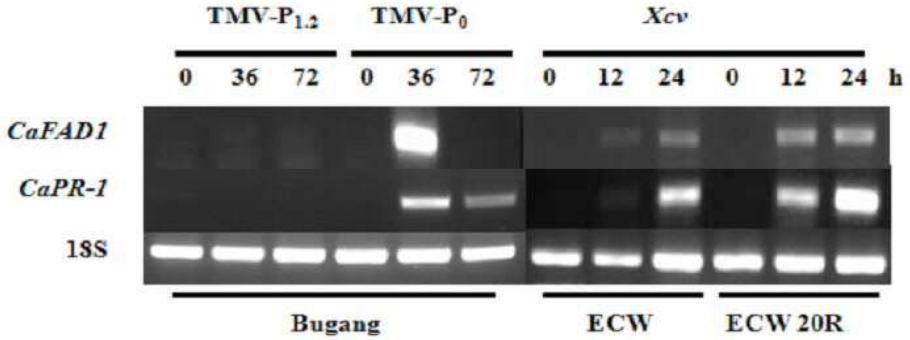
도면1


(a)
Developmental regulation
miRNA precursor
DCL1
p19
ds siRNA-like miRNA (short) intermediate
Virus RNA
Viral RdRP
dsRNA
DICER
p19
siRNA (short)
miRNA- and siRNA-mediated RISC activation
RISC
HC-Pro
RISC
HC-Pro
Target RNA cleavage or translational arrest
(b)
Defence
Transgene or virus RNA
Transgene or virus abRNA
Plant RdRP
Plant RdRP
dsRNA
RdRp-mediated dsRNA amplification
DICER
DICER
p19
siRNA (short)
siRNA (long)
Short-distance signalling
Long-distance signalling
Transcriptional silencing
TRENDS in Plant Science

도면2

```
ATGGGAGCAGGTGGCAATATGAGTTCTCCAGCAACTAAAAATGGAGAAAAGAAAAGTCAT
 M  G  A  G  G  N  M  S  S  P  A  T  K  N  G  E  K  K  S  H   20
CTGCAAAGAGTTCCATCTGCAAAGCCTCCCTTTACACTTGGTGACGTTAAGAAGGCCATT
 L  Q  R  V  P  S  A  K  P  P  F  T  L  G  D  V  K  K  A  I   40
CCTCCTCACTGCTTTCAACGATCTCTCATTCGCTCCTTCTACTACCTCATTAAGGATCTC
 P  P  H  C  F  Q  R  S  L  I  R  S  F  Y  Y  L  I  K  D  L   60
ATTATTATCCCCATTACTTATTACATTGCAGCCACTTACTTCCCCTCTCTTCCATACCCA
 I  I  I  P  I  T  Y  Y  I  A  A  T  Y  F  P  S  L  P  Y  P   80
CTTACTTACCTTGCATGGCCTGCTTACTGGGTCATTCAAGGTTGTGTTGGCACCGGAATA
 L  T  Y  L  A  W  P  A  Y  W  V  I  Q  G  C  V  G  T  G  I  100
TGGGTCATTGGACATGAGTGCGGACACCATGGCTTCAGTGATTACCAATGGGTAGATGAC
 W  V  I  G  H  E  C  G  H  H  G  F  S  D  Y  Q  W  V  D  D  120
ACCGTTGGCCTTATCCTCCACTCTGCACAATTGACACCCTTCTTCTCATGGAAAATTAGC
 T  V  G  L  I  L  H  S  A  Q  L  T  P  F  F  S  W  K  I  S  140
CATCGCCGTCACCATGCCAACACCGGTTCCCTTGAAAATGATGAGGTCTACATTCCCAGG
 H  R  R  H  H  A  N  T  G  S  L  E  N  D  E  V  Y  I  P  R  160
TTTAAATCCAAACTTAGATGGTACTATCAATACTTGGACAACCCAGTAGGAAGAGTAGGT
 F  K  S  K  L  R  W  Y  Y  Q  Y  L  D  N  P  V  G  R  V  G  180
GTACTTGCCTTTACCCTCCTCTTTGCCTGGCCTTTATACTTGGTCTTCAATATCTCTGGC
 V  L  A  F  T  L  L  F  A  W  P  L  Y  L  V  F  N  I  S  G  200
AAGAAGTACGAACGGTTTACATGTCATTATGATCCAAATAGCCCATTATATTCTGAGCGC
 K  K  Y  E  R  F  T  C  H  Y  D  P  N  S  P  L  Y  S  E  R  220
GAGAGACTACAAATCCTCATCTCAGATGCAGGTGTGCTTGCGGCTACCTACGTGTTGTAT
 E  R  L  Q  I  L  I  S  D  A  G  V  L  A  A  T  Y  V  L  Y  240
CGCATAGCTCTGGCAAAAGGGTTTACCTGGCTTGTATGCATCTATGGGGTGCCCCTCCTT
 R  I  A  L  A  K  G  F  T  W  L  V  C  I  Y  G  V  P  L  L  260
ATTGTGAATGGCTTTATTGTTCTAATCACTCTTTTGCACCACACTCACGCTTCATTGCCA
 I  V  N  G  F  I  V  L  I  T  L  L  H  H  T  H  A  S  L  P  280
CATTATGATTCAACCGAGTGGGATTATCTAAGAGGAGCTCTAGCTACGGTAGACAGAGAC
 H  Y  D  S  T  E  W  D  Y  L  R  G  A  L  A  T  V  D  R  D  300
TACGGTGTGCTGAACAAGGTGTTCCACATCGTTACGGATACCCACGTTTTGCATCACATA
 Y  G  V  L  N  K  V  F  H  I  V  T  D  T  H  V  L  H  H  I  320
TTCTCATACATATCGCATTACCATGCAATGGAGGCAACCAATGCTATCAAGCCATTGCTA
 F  S  Y  I  S  H  Y  H  A  M  E  A  T  N  A  I  K  P  L  L  340
GGAGAATACTACCAAGTCGACGATACTCCAATTTTAAAGGCACTGTGGAGGGATACGAAG
 G  E  Y  Y  Q  V  D  D  T  P  I  L  K  A  L  W  R  D  T  K  360
GAGTGCATCTATGTCGAGAAAGATGAAGGCTCTCAAGGAAGAGGTGTTTATTGGTATAAA
 E  C  I  Y  V  E  K  D  E  G  S  Q  G  R  G  V  Y  W  Y  K  380
TACAAGCTTGATGATTAGttaaagcttgtatttcgaattatgtgtttctcttgtattgta
 Y  K  L  D  D  *                                              385
tcgtaatgttattttaagtncaatgtttgttctggttattatagttgtatcgttatgtcc
atctgtgacataattaaaatatgtctattataaagaagagcacgaataaatggtgctgtt
tagttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

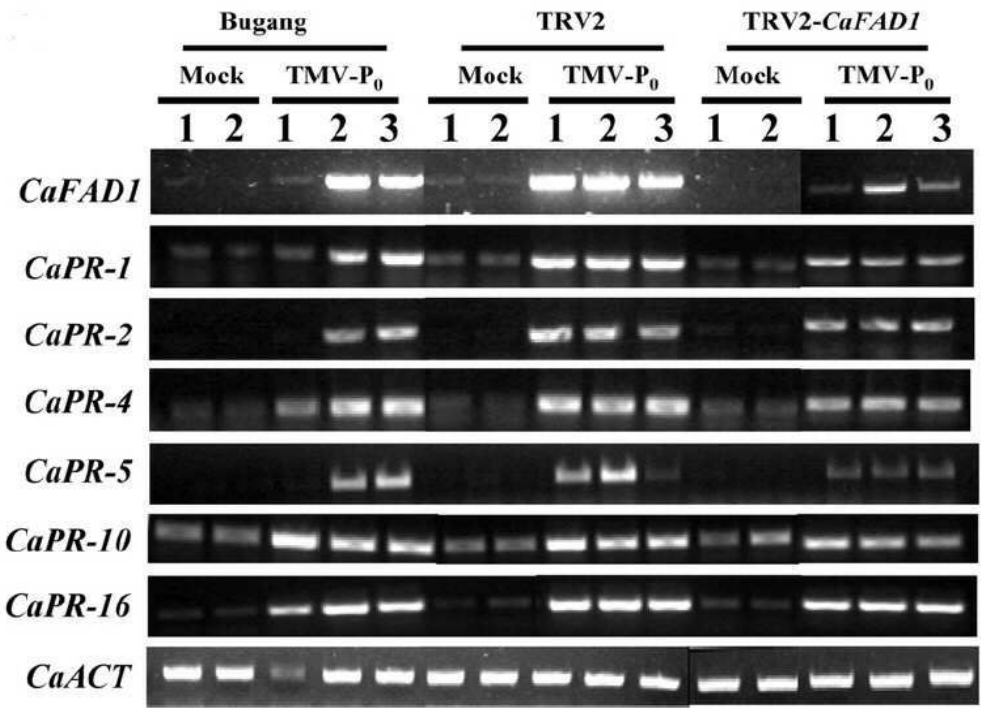
도면3



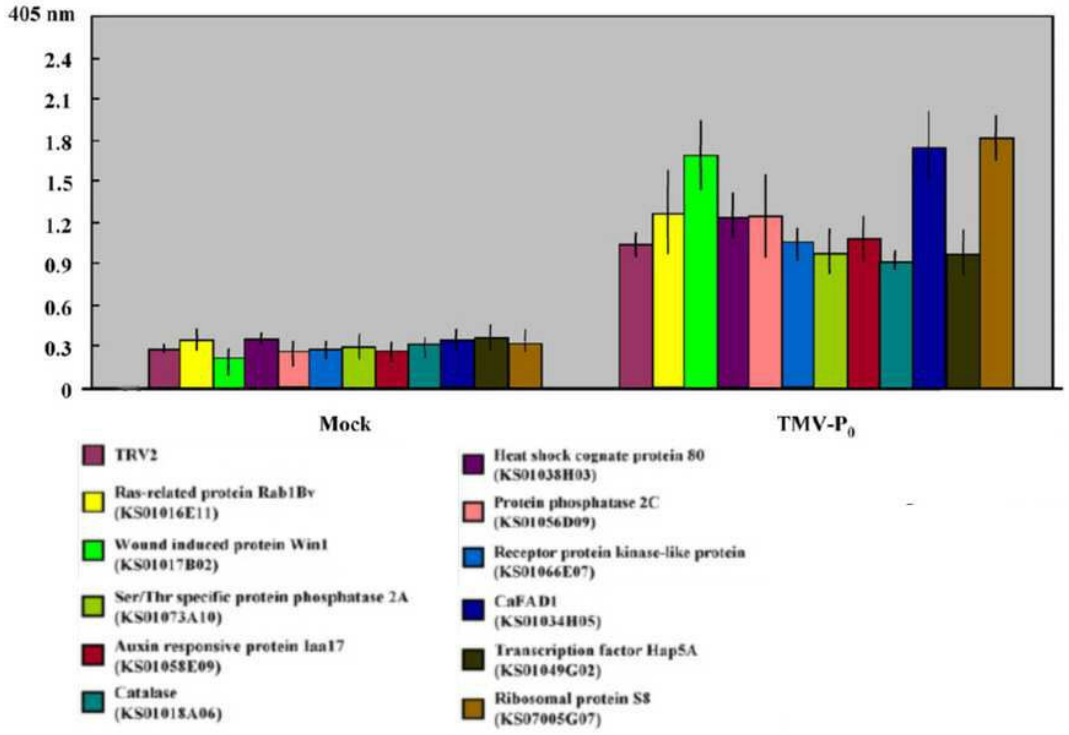
도면4


TRV2
TRV2-CaFAD1

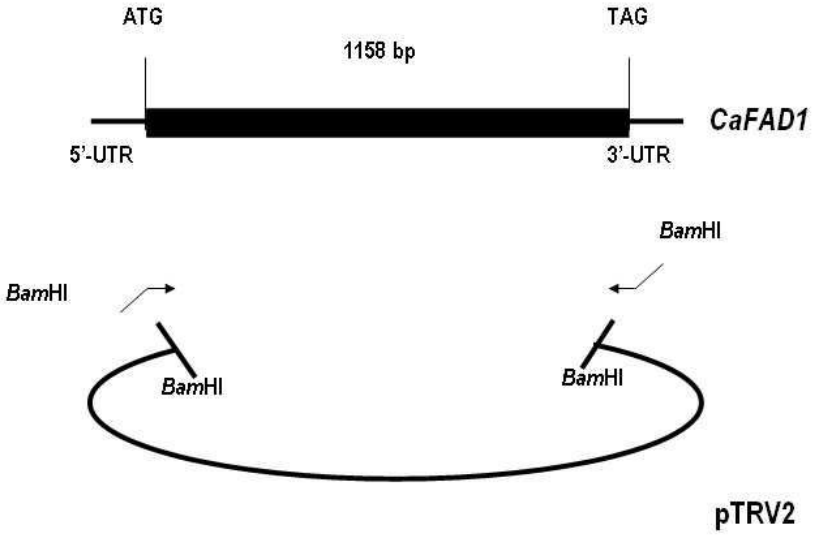
도면5


Bugang
TRV2
TRV2-CaFAD1
Mock
TMV-P0
1 2 1 2 3 1 2 1 2 3 1 2 1 2 3
CaFAD1
CaPR-1
CaPR-2
CaPR-4
CaPR-5
CaPR-10
CaPR-16
CaACT

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> Korea University industry-Academy Cooperation Foundation

<120> CaFAD1 gene from hot pepper concerned in defense response and development of plants and use thereof

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 1155
<212> DNA
<213> Capsicum annuum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1155)

<400> 1

```
atg gga gca ggt ggc aat atg agt tct cca gca act aaa aat gga gaa          48
Met Gly Ala Gly Gly Asn Met Ser Ser Pro Ala Thr Lys Asn Gly Glu
  1               5                  10                  15

aag aaa agt cat ctg caa aga gtt cca tct gca aag cct ccc ttt aca          96
Lys Lys Ser His Leu Gln Arg Val Pro Ser Ala Lys Pro Pro Phe Thr
             20                  25                  30

ctt ggt gac gtt aag aag gcc att cct cct cac tgc ttt caa cga tct         144
Leu Gly Asp Val Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser
         35                  40                  45

ctc att cgc tcc ttc tac tac ctc att aag gat ctc att att atc ccc         192
Leu Ile Arg Ser Phe Tyr Tyr Leu Ile Lys Asp Leu Ile Ile Ile Pro
     50                  55                  60

att act tat tac att gca gcc act tac ttc ccc tct ctt cca tac cca         240
Ile Thr Tyr Tyr Ile Ala Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Leu Pro Tyr Pro
 65                  70                  75                  80

ctt act tac ctt gca tgg cct gct tac tgg gtc att caa ggt tgt gtt         288
Leu Thr Tyr Leu Ala Trp Pro Ala Tyr Trp Val Ile Gln Gly Cys Val
                 85                  90                  95

ggc acc gga ata tgg gtc att gga cat gag tgc gga cac cat ggc ttc         336
Gly Thr Gly Ile Trp Val Ile Gly His Glu Cys Gly His His Gly Phe
            100                 105                 110

agt gat tac caa tgg gta gat gac acc gtt ggc ctt atc ctc cac tct         384
Ser Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Leu His Ser
        115                 120                 125
```

```
gca caa ttg aca ccc ttc ttc tca tgg aaa att agc cat cgc cgt cac          432
Ala Gln Leu Thr Pro Phe Phe Ser Trp Lys Ile Ser His Arg Arg His
    130                 135                 140

cat gcc aac acc ggt tcc ctt gaa aat gat gag gtc tac att ccc agg          480
His Ala Asn Thr Gly Ser Leu Glu Asn Asp Glu Val Tyr Ile Pro Arg
145                 150                 155                 160

ttt aaa tcc aaa ctt aga tgg tac tat caa tac ttg gac aac cca gta          528
Phe Lys Ser Lys Leu Arg Trp Tyr Tyr Gln Tyr Leu Asp Asn Pro Val
                165                 170                 175

gga aga gta ggt gta ctt gcc ttt acc ctc ctc ttt gcc tgg cct tta          576
Gly Arg Val Gly Val Leu Ala Phe Thr Leu Leu Phe Ala Trp Pro Leu
            180                 185                 190

tac ttg gtc ttc aat atc tct ggc aag aag tac gaa cgg ttt aca tgt          624
Tyr Leu Val Phe Asn Ile Ser Gly Lys Lys Tyr Glu Arg Phe Thr Cys
        195                 200                 205

cat tat gat cca aat agc cca tta tat tct gag cgc gag aga cta caa          672
His Tyr Asp Pro Asn Ser Pro Leu Tyr Ser Glu Arg Glu Arg Leu Gln
    210                 215                 220

atc ctc atc tca gat gca ggt gtg ctt gcg gct acc tac gtg ttg tat          720
Ile Leu Ile Ser Asp Ala Gly Val Leu Ala Ala Thr Tyr Val Leu Tyr
225                 230                 235                 240

cgc ata gct ctg gca aaa ggg ttt acc tgg ctt gta tgc atc tat ggg          768
Arg Ile Ala Leu Ala Lys Gly Phe Thr Trp Leu Val Cys Ile Tyr Gly
                245                 250                 255

gtg ccc ctc ctt att gtg aat ggc ttt att gtt cta atc act ctt ttg          816
Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Ile Val Leu Ile Thr Leu Leu
            260                 265                 270

cac cac act cac gct tca ttg cca cat tat gat tca acc gag tgg gat          864
His His Thr His Ala Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp Asp
        275                 280                 285

tat cta aga gga gct cta gct acg gta gac aga gac tac ggt gtg ctg          912
Tyr Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Val Leu
    290                 295                 300
```

```
aac aag gtg ttc cac atc gtt acg gat acc cac gtt ttg cat cac ata          960
Asn Lys Val Phe His Ile Val Thr Asp Thr His Val Leu His His Ile
305                 310                 315                 320

ttc tca tac ata tcg cat tac cat gca atg gag gca acc aat gct atc         1008
Phe Ser Tyr Ile Ser His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Asn Ala Ile
                325                 330                 335

aag cca ttg cta gga gaa tac tac caa gtc gac gat act cca att tta         1056
Lys Pro Leu Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Val Asp Asp Thr Pro Ile Leu
            340                 345                 350

aag gca ctg tgg agg gat acg aag gag tgc atc tat gtc gag aaa gat         1104
Lys Ala Leu Trp Arg Asp Thr Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Lys Asp
        355                 360                 365

gaa ggc tct caa gga aga ggt gtt tat tgg tat aaa tac aag ctt gat         1152
Glu Gly Ser Gln Gly Arg Gly Val Tyr Trp Tyr Lys Tyr Lys Leu Asp
    370                 375                 380

gat                                                                    1155
Asp
385
```

<210> 2
<211> 385
<212> PRT
<213> Capsicum annuum

<400> 2

```
Met Gly Ala Gly Gly Asn Met Ser Ser Pro Ala Thr Lys Asn Gly Glu
  1               5                  10                  15

Lys Lys Ser His Leu Gln Arg Val Pro Ser Ala Lys Pro Pro Phe Thr
             20                  25                  30

Leu Gly Asp Val Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser
         35                  40                  45

Leu Ile Arg Ser Phe Tyr Tyr Leu Ile Lys Asp Leu Ile Ile Ile Pro
     50                  55                  60
```

```
Ile Thr Tyr Tyr Ile Ala Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Leu Pro Tyr Pro
 65                  70                  75                  80

Leu Thr Tyr Leu Ala Trp Pro Ala Tyr Trp Val Ile Gln Gly Cys Val
                 85                  90                  95

Gly Thr Gly Ile Trp Val Ile Gly His Glu Cys Gly His His Gly Phe
            100                 105                 110

Ser Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Leu His Ser
        115                 120                 125

Ala Gln Leu Thr Pro Phe Phe Ser Trp Lys Ile Ser His Arg Arg His
    130                 135                 140

His Ala Asn Thr Gly Ser Leu Glu Asn Asp Glu Val Tyr Ile Pro Arg
145                 150                 155                 160

Phe Lys Ser Lys Leu Arg Trp Tyr Tyr Gln Tyr Leu Asp Asn Pro Val
                165                 170                 175

Gly Arg Val Gly Val Leu Ala Phe Thr Leu Leu Phe Ala Trp Pro Leu
            180                 185                 190

Tyr Leu Val Phe Asn Ile Ser Gly Lys Lys Tyr Glu Arg Phe Thr Cys
        195                 200                 205

His Tyr Asp Pro Asn Ser Pro Leu Tyr Ser Glu Arg Glu Arg Leu Gln
    210                 215                 220

Ile Leu Ile Ser Asp Ala Gly Val Leu Ala Ala Thr Tyr Val Leu Tyr
225                 230                 235                 240

Arg Ile Ala Leu Ala Lys Gly Phe Thr Trp Leu Val Cys Ile Tyr Gly
                245                 250                 255

Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Ile Val Leu Ile Thr Leu Leu
            260                 265                 270

His His Thr His Ala Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp Asp
        275                 280                 285

Tyr Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Val Leu
    290                 295                 300
```

```
Asn Lys Val Phe His Ile Val Thr Asp Thr His Val Leu His His Ile
305                 310                 315                 320

Phe Ser Tyr Ile Ser His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Asn Ala Ile
                325                 330                 335

Lys Pro Leu Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Val Asp Asp Thr Pro Ile Leu
            340                 345                 350

Lys Ala Leu Trp Arg Asp Thr Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Lys Asp
        355                 360                 365

Glu Gly Ser Gln Gly Arg Gly Val Tyr Trp Tyr Lys Tyr Lys Leu Asp
    370                 375                 380

Asp
385
```