

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0013338 (43) 공개일자 2009년02월05일
(51) Int. Cl. ⁹ <i>C12N 15/29</i> (2006.01) <i>C12N 15/09</i> (2006.01) <i>C12N 15/10</i> (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내	
(21) 출원번호 10-2007-0077377 (22) 출원일자 2007년08월01일 심사청구일자 2007년08월01일	(72) 발명자 백경희 서울 강남구 대치동 쌍용아파트 3-1411 김기정 서울 용산구 한남2동 729-9번지 101호 (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 이문섭, 윤여강	

전체 청구항 수 : 총 9 항

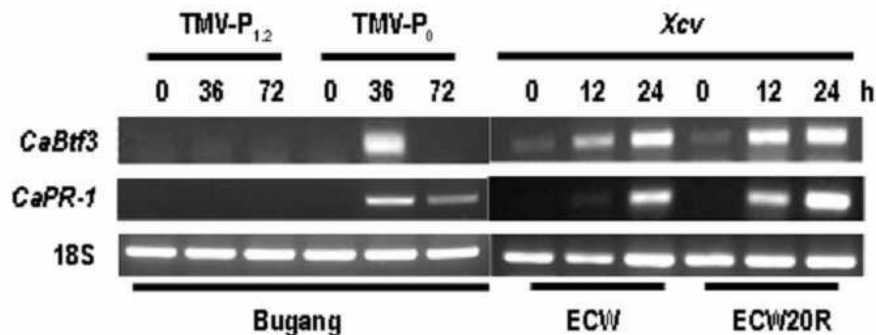
(54) 식물의 방어반응 및 성장과정에 관여하는 고추식물 유래CaBt f3 유전자 및 그 용도

(57) 요약

본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 고추식물 유래의 CaBtf3 (Capsicum annuum basic transcription factor 3) 유전자에 관한 것이다. 구체적으로는, 고추식물의 병원체에 대한 방어반응 및 발달과정에 관여하는 CaBtf3 유전자에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 고추식물로부터 cDNA 마이크로어레이를 이용하여 Bt f3를 코딩하는 cDNA 클론을 분리하였으며, VIGS(virus-induced gene silencing) 기술을 이용하여 잎의 성장과 기관의 발달에 관여하고 있음을 밝혔다. 또한 고추식물의 Btf3 유전자가 TMV 및 Xcv에 대한 병 저항성을 유도하는 것을 밝힘으로써, 상기 유전자를 이용할 경우 고추식물의 방어반응을 증가시키고, 식물의 성장을 촉진할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

최수복

서울 성북구 안암동5가 151-18 301

임지혁

충북 청주시 상당구 영운동 삼일아파트 103-608

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R11-2003-008-04001-0

부처명 한국과학재단

연구사업명

연구과제명 역유전학 및 상호작용에 의한 식물 방어조절 신호전달 연구

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2007년 03월 01일~2008년 02월 29일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 고추식물 유래의 CaBtf3 (Capsicum annuum basic transcription factor 3) 유전자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 염기서열은 서열번호 1인 것을 특징으로 하는 CaBtf3 유전자.

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 고추식물 유래의 CaBtf3 단백질.

청구항 4

제 3항에 있어서, 식물에서 병원체에 대한 과민반응에 특이적으로 발현이 증가되는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 CaBtf3 단백질.

청구항 5

제 3항에 있어서, 식물체의 성장과 개화를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 CaBtf3 단백질.

청구항 6

제 1항의 CaBtf3 유전자를 포함하는 재조합백터.

청구항 7

제 1항의 CaBtf3 유전자 또는 그로부터 발현되는 CaBtf3 단백질을 유효성분으로 함유하는 식물의 질병 저항성 증가용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 질병 저항성은 TMV 또는 Xcv 병원체로 유발되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 1항의 CaBtf3 유전자 또는 그로부터 발현되는 CaBtf3 단백질을 유효성분으로 함유하는 식물체의 성장 및 개화 촉진용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 식물의 방어반응 및 성장과정에 관여하는 고추식물 유래 CaBtf3 유전자 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 고추식물 유래의 CaBtf3 (Capsicum annuum basic transcription factor 3) 유전자에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 식물은 병원체에 반응할 때 감염부분에 대한 저항성 반응을 이끌어 내기 위해 여러 가지 방법들을 이용한다. 특히 병저항성을 나타내기 위해 분자적인 반응이 수반되는데, 이것에 관련된 특징이 바로 전신획득저항성(systemic acquired resistance, SAR)이다. 이는 병원체에 대한 반응으로 인해 SA (Salicylic acid)와 PR (Pathogenesis-related gene)의 축적을 일으키는 것이다 (Durrant and Dong 2004). 지금까지 Btf3는 초기 이식 후 마우스에서 일어나는 반응을 이끄는 전사인자(transcription factor)로서 알려져 있었다 (Deng and Behringer, 1995). Btf3는 사람에 있어서 상처를 지휘하고 세포자살(apoptosis)에 관여하며 빠른 염증

(inflammation)에 관여하는 유전자이다 (Munz et al., 1999; Brockstedt et al., 1999; Warton et al., 2004). 그러나 확실한 Btf3의 기능에 대해서는 아직 알려진 바가 없다.

- <3> Btf3는 처음 RNA polymerase II의 활성화에 필요한 전사인자로서 헤라세포 (HeLa cell)에서 발견되었다 (Zheng et al., 1990). Btf3a에서 발현되는 단백질은 정제된 Btf3와 같은 특성을 가지며 전사 (transcription)를 촉진한다(Zheng et al., 1990). Btf3 mRNA는 불완전한 모양의 Btf3a를 암호화한다. Btf3a는 전사를 촉진하는 반면, Btf3b는 NAC의 subunit인 β NAC으로서 확인되었다. 그러나 식물의 경우에는 포유류의 Btf3a 형태에서 나타나는 N-말단(N-terminal)의 확장이 보이지 않았다. 게다가 식물에서 타겟팅 위치(targeting site)는 여전히 알려지지 않고 있다.
- <4> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 본 발명의 CaBtf3 유전자가 식물의 병 저항성 및 발달과정에 관여함을 밝혀내어, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <5> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 고추식물에서 병원체에 대한 병 저항성 및 식물체의 발달과정에 관여하는 CaBtf3 유전자 및 그 단백질을 제공하는 데 있다.
- <6> 본 발명의 다른 목적은 상기 CaBtf3 유전자 및 그 단백질을 이용한 식물의 병 저항성 증가용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

- <7> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 고추식물 유래의 CaBtf3 (Capsicum annuum basic transcription factor 3) 유전자를 제공한다. 본 발명에서는 바이러스 또는 박테리아 병원체에 대한 과민반응(hypersensitive response, HR) 동안에 유도되는 고추식물의 유전자들을 분리하였고, 그 중 하나의 유전자가 다른 여러 식물체의 Btf3와 큰 유사성을 보이는 것을 확인하고 이 유전자를 CaBtf3라고 명명하였다.
- <8> 본 발명의 CaBtf3 유전자에서, 상기 염기서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 어떤 염기서열일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1인 것을 특징으로 한다.
- <9> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 고추식물 유래의 CaBtf3 단백질을 제공한다. 상기 CaBtf3 단백질의 full-length CaBtf3 cDNA는 예상 분자량 18kD을 가진 165개의 아미노산의 폴리펩타이드를 코딩한다 (도 1의 A와 B). CaBtf3는 Arabidopsis thaliana (AJ242970), Nicotiana glauca (YNPY09106), Oryza sativa (AA072645), 및 Homo sapiens (CAA37375)와 아미노산 수준에서 91%, 85%, 86%, 85%, 및 57%의 현저한 유사성을 나타내었다.
- <10> 본 발명의 CaBtf3 단백질에서, 바람직하게는 식물에서 병원체에 대한 과민반응에 특이적으로 발현이 증가되는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서 CaBtf3 단백질은 병원체 (TMV 및 Xcv)에 감염된 잎에서 다량 축적되었으며, 과민반응 동안에 특이적으로 유도됨을 확인하였다 (도 2).
- <11> 본 발명의 CaBtf3 단백질에서, 바람직하게는 식물체의 성장과 개화를 촉진시키는 것을 특징으로 한다. 본 발명에서는 CaBtf3의 발현이 저하된 고추 식물의 발달 표현형을 확인함으로써 CaBtf3 단백질이 식물체의 성장 및 개화에 관련되어 있음을 밝혔다. 본 발명의 실시예에서는 CaBtf3가 발현 억제된 식물체에서 좁고 찌그러진 기형적인 형태의 잎 모양을 확인하였으며 (도 7과 8a 참조), 또한 꽃이 피지 않거나 정상적이지 않은 형태의 꽃을 피우는 것을 확인할 수 있었다 (도 8b와 8c 참조). 이러한 결과로부터 CaBtf3 단백질이 고추식물에서 식물의 성장 및 개화를 촉진시키는 역할을 한다는 것을 알 수 있다.
- <12> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 CaBtf3 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 본 발명의 CaBtf3 유전자를 이용하여 식물체의 형질전환용 재조합 벡터를 제조할 수 있다. 상기 CaBtf3 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 형질전환시킬 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 CaBtf3 유전자가 도입된 식물체를 효과적으로 선별하기 위한 선별인자로 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, 식물세포에서 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, 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가로 포함할 수 있다.

<14> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 고추식물 유래의 CaBtf3 유전자 또는 그로부터 발현되는 CaBtf3 단백질을 유효성분으로 함유하는 식물의 질병 저항성 증가용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 CaBtf3 유전자, 단백질 또는 재조합 벡터 외에 식물체계에 일반적으로 사용되는 안정화제 또는 부형제를 유효성분으로서 더 포함할 수 있다. 구체적으로, CaBtf3 단백질을 제제로 만들어 식물체에 직접 투여하거나, CaBtf3 유전자를 상기 공지의 식물 발현용 벡터에 클로닝하여 재조합 벡터를 만든 후, 아그로박테리움(*A. tumefaciens*)을 통하여 식물체에 형질전환 시킴으로써 (실시에 5 참조), 식물체 내에서 CaBtf3 단백질을 발현시켜서 이로 인해 질병 관련 유전자들(CaPR-1, CaPR-2, CaPR-4, CaPR-5, CaPR-10, 및 CaPR-16)의 발현을 증가시킴으로써, 궁극적으로 고추식물의 저항성을 증가시킬 수 있다 (실험결과 7 참조).

<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 CaBtf3의 발현이 크게 증가하는 것을 볼 수 있었으며 (도 2), 특히 CaBtf3가 억제된 식물체에서 TMV-P₀ 처리 후, 야생형과 비교하여 TMV-P₀에 대한 잎의 손상이 현저함을 관찰하였다.

<16> 또한, 상기 질병은 화학제인 SA(Salicylic acid) 또는 MeJA(methyl jasmonate)로 유발되는 것일 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 SA 또는 MeJA 처리에 의해 CaBtf3 mRNA의 축적이 증가되는 것을 확인하였으며 (도 4a와 4b 참조), 이를 이용하여 화학제 처리에 대하여 저항성이 증가된 형질전환 식물체를 제조할 수 있으며, 나아가 화학제에 대한 저항성이 약화된 식물에 사용할 경우 저항성 회복을 유도할 수 있다.

<17> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 CaBtf3 유전자 또는 그로부터 발현되는 CaBtf3 단백질을 유효성분으로 함유하는 식물체의 성장 및 개화 촉진용 조성물을 제공한다. 본 발명의 실시예에서, CaBtf3-억제된 식물체에서는 잎의 노화가 지연되고 꽃이 피지 않거나 정상적이지 않은 형태의 꽃을 피우는 것을 확인함으로써, 식물체의 성장 및 개화를 유도하는데 CaBtf3가 관여한다는 것을 밝혔다. 따라서 본 발명의 CaBtf3 단백질을 투여함으로써, 시기적으로는 식물체의 성장 및 개화를 조절할 수 있으며 또한, 상기 조성물을 정상적인 성장을 보이지 않는 식물에 사용할 경우 성장 촉진을 유도할 수 있다.

<18> 본 발명의 조성물들은 또한 질병 저항성 및 식물체의 성장이 약화된 식물체에 투여할 때 큰 효과를 볼 수 있다. 유전적 요인 또는 환경적 요인으로 인해 식물체 자신의 CaBtf3 유전자의 발현이 저하되어 병 저항성 및 성장이 약화된 식물체의 빠른 회복을 유도할 수 있으며, 일정 투여량 이상에서는 투여량 효과(dose effect)에 의해 정상상태, 즉 야생형보다 더 높은 질병 저항성 및 성장 효과를 유도할 수 있다.

<19> 본 발명에서는 역유전학적인 접근방법으로, TRV에 기초한 VIGS 방법 (Chung et al., 2004)을 사용하였다. 이 때 고추 CaBtf3의 억제(suppression)는 식물체의 표현형에 심각한 변화를 초래하였다. 이러한 결과는 Btf3가 각 식물체에서 매우 보존적이며 이것이 식물의 발달에 연관되어 있다는 것을 시사한다. 또한 CaBtf3의 억제가 TMV-P₀에 대한 HR(과민반응)을 억제시킨다는 것을 통해 TMV에 관련한 방어기작에 중요한 역할을 하고 있음을 예측할 수 있다.

<20> 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

<21> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 고추식물의 Btf3 유전자가 TMV 및 Xcv에 대한 병 저항성을 유도하고, 잎의 성장과 식물체의 발달에 관여함을 밝힘으로써, 고추식물의 방어반응이 증가되고, 식물의 성장

이 촉진된 형질전환된 식물을 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<22>

실시예 1. 식물 재배 및 병원균 접종

<23>

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 P₀에 저항성을 보이거나 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.

<24>

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

<25>

병원체 접종 및 다양한 화학제(chemicals) 처리에 사용된 방법은 Park et al., 2002에 기술되어 있다. 접종 및 처리 후, 각 실험에서 지시된 시점에서 잎들을 수확하였다.

<26>

실시예 2. RT-PCR 분석

<27>

RT-PCR을 수행하기 위하여, 각각을 처리한 후 고추 잎들로부터 총 RNAs를 분리하였다. 그 후 QuantumRNA™ Universal 18s Internal Standard (Ambion, USA)에 따라 RT 반응을 수행하였다. cDNA 단편들을 증폭하기 위하여, RT-PCR에는 하기 표 1에 기재된 올리고뉴클레오티드 프라이머가 사용되었다.

<28>

실시예 3. DNA 및 RNA blot 분석

<29>

32-표지된 프로브들로 southern 및 northern blot 혼성화를 수행하였다. blots의 혼성화는 본질적으로 Park et al., 2002에 기술된 바와 같이 수행하였다. 프로브에 사용된 프라이머 세트들은 하기 표 1에 기재하였다.

<30>

[표 1]. cDNAs의 설명 및 그들의 프라이머. 추가 벡터 구성체에 사용된 BamHI 제한효소 부위는 언더라인 하였다.

Gene name (Accession no.)	Purpose	Primer sequences
<i>CaBtf3</i>	RT-PCR (hot pepper)/Probe	5'-GCTGCAAACACGTGGGTAGTTAGTGG-3' 5'-CTTCAGGAAGTGTGAC-3'
<i>CaBtf3</i>	RT-PCR (tobacco)/Localization/VIGS	5'-GGATCCATGAATGTAGAAAAGTTG-3' 5'-GGATCCGAAGTGTGACCCCTCCTCAGCAG-3'
<i>CaBtf3ΔN</i>	Localization	5'-GGATCCATGGGTCTGATAATTGGAG-3' 5'-GGATCCGAAGTGTGACCCCTCCTCAGCAG-3'
<i>CaPin II</i> (AF221097)	Probe	5'-CCCTCGGTATTGTGATACAAGAATTGCC-3' 5'-GTGAATAGGCAATAATTGGATCACAATTCC-3'
<i>CaPR-1</i> (AF053343)	RT-PCR/Probe	5'-GACATGGGACAATAGGCTAGCAGCC-3' 5'-CAGTTGGAAGTTCCAATTGGAATC-3'
<i>CaPR-2</i> (AF208832)	Probe	5'-ACTCTTTTCCACCATCACAGGGTTC-3' 5'-GTTGAGGTTGCATTATTATTTCAG-3'
<i>CaPR-4</i> (AF244122)	Probe	5'-CGGCGCAGAGTGCTACGAACGTGAG-3' 5'-GTCATTGCAGTTGACAAATTCATAG-3'
<i>CaPR-5</i> (AY262059)	Probe	5'-TGGTGCTGGTAGAGGTTGGTGCCAG-3' 5'-CTTCATGTGTACTTGTAGGCAACTC-3'
<i>CaPR-10</i> (AF244121)	RT-PCR/Probe	5'-GTCGAAGGTGGTCCAATAAAGTACATG-3' 5'-GAAAAGTTCTTTCCATGACAAACCAATTG-3'
<i>CaPR-16</i> (AY391748)	Probe	5'-GTCTCAAAGCATATAGTTAAAGGTGAAGTG-3' 5'-CACAAATCCCTATCAATTAACGAGCTCACC-3'
<i>CaACT</i> (AY572427)	RT-PCR	5'-GGCTGTTCTTTCTTGTATGCTAGTGGTC-3' 5'-TCAACATCACACTTCATAATGGAGTTG-3'
<i>NiPR-1</i> (DQ837218)	RT-PCR	5'-CATTGAGATTCTGGAGCAAGCAGAAAGAGAG-3' 5'-CTCCCTAGATGTAAGGAACAAGATGAGG-3'
<i>NbACT</i> (AY594294)	RT-PCR	5'-TCGTGACCTCACTGATGTTTGATGAAGATCC-3' 5'-CATCTGTTGGAAGGTGCTGAGGGAAG-3'

실시예 4. CaBtf3의 세포내 위치 확인

PCR로 증폭된 CaBtf3 산물(product)과 soluble-modified green fluorescent protein (smGFP)과 연결하여 만든 구성체(construct)를 PEG-매개 형질전환법(PEG-mediated transformation method)을 통해 애기장대 (*Arabidopsis*)의 원형질(protooplast)에 도입하였다 (Abel and Theologis 1994). 대조군(Control) 벡터와 융합 구성체(Fusion construct)의 발현을 확인하기 위하여 Zeiss Zxioplan (Jena) 형광현미경을 이용하였고, cooled CCD 카메라(cooled charge-coupled device camera)를 통해 이미지를 찍었다. GFP의 관찰에 이용된 필터(filter)는 XF116 (exciter, 474AF20; dichroic, 500DRLP; emitter, 510AF23), 클로로필(chlorophyll)은 XF137 (exciter, 540AF30; dichroic, 570DRLP; emitter, 585ALP)이다. 핵의 염색에는 10 g/ml 4p-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)이 이용되었다.

실시예 5. VIGS를 이용한 CaBtf3의 발현억제

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.

<37> 아그로박테리움 침투(Agrobacterium infiltration)를 위해 pTRV1과 pTRV2, 그리고 억제(silencing)하고자 하는 목적(target) 유전자인 CaBtf3가 VIGS vector인 pTRV2의 BamHI 제한효소 부위에 연결(ligation)된 재조합 플라스미드(recombinant plasmid) (pTRV2-CaBtf3, 도 6a)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 °C, 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, pTRV1은 OD₆₀₀ = 0.2, pTRV2와 pTRV2-CaBtf3는 OD₆₀₀ = 0.3의 값을 갖도록 침투버퍼(infiltration buffer)로 농도를 조절하였다. 약 1:1.5의 비율로 pTRV1에 pTRV2와 pTRV2-CaBtf3를 각각 혼합(mix)한 뒤 바늘이 없는 1 ml 주사기를 이용하여 고추의 떡잎 뒤에 주입해준다. 이 때 사용하는 고추는 18°C, 습도 30%에서 발아시켜 이용하였다.

<38> 성공적인 VIGS를 확인하기 위하여 광합성 관련 유전자인, PDS 유전자(phytoene desaturase gene)를 마커로 사용하였고, 이 마커에 의한 표현형(phenotype)은 처리 후 7일부터 앞에서 관찰할 수 있었다. 유전자의 억제를 확인하기 위하여 특이 프라이머(specific primer)(표 1)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

<39> 실시예 6. ELISA를 이용한 TMV 검출

<40> TMV를 접종 후 이를 뒤, 접종한 잎의 상부 잎 조직을 코팅버퍼(coating buffer)(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6; 1 ml buffer per 100 mg 조직)에 넣고 뺀 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 µl의 blocking buffer (0.5%의 무지방 건조 분말우유를 함유한 PBST)를 각각의 웰에 첨가하고, 4°C에서 하룻밤을 두었다. 이어 전과 같은 방법으로 씻어준 후에, Plate를 37°C에서 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°C에서 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°C에서 1시간 동안 배양한 뒤 PBST로 4번 씻어준 후에 Fast p-Nitrophenyl Phosphate Tablet Set (Sigma, USA)으로 색의 발현을 알아보았다. 흡광도 계수는 450nm이고, ELISA reader (Bio-Rad, USA)를 사용하였다.

<41> 실시예 7. Pto와 AvrPto의 담배 식물체 내에서의 과발현

<42> 식물체의 resistance (R) gene/ avirulence (avr) gene system중 하나로서 토마토에서 발현되는 R gene인 Pto와 그에 상응하는 avr gene인 avrPto를 이용하여 Btf3가 plant R gene과 pathogen avr gene 사이에서 어떤 기능을 하는지 알아보려고 하였다. pBTEX를 벡터로 하여 pto와 avrPto의 recombinant를 제작하고 이를 전기천공법(electroporation)을 이용해 *Agrobacterium tumefaciens* GV2260에 형질전환한 뒤 LB medium에서 배양시키고, 이를 induction medium (50 mM MES, pH 5.6, 0.5% glucose, 1.7 mM NaH₂PO₄, 20 mM NH₄Cl, 1.2 mM MgSO₄, 2 mM KCl, 17 µM FeSO₄, 70 µM CaCl₂, 및 200 µM acetosyringone)으로 희석하였다 (O.D.600에서 흡광도 0.5). 이 pBTEX::Pto와 pBTEX::AvrPto는 1:1로 섞어 3ml을 바늘 없는 주사기를 이용하여 담배 잎에 주입하였다.

<43> 실험결과 1. CaBtf3의 동정

<44> 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 Btf3의 서열과 큰 유사성을 보였다. full-length CaBtf3 cDNA는 예상 분자량 18kD을 가진 165개의 아미노산의 폴리펩타이드를 코딩한다 (도 17a). CaBtf3는 *Arabidopsis thaliana* (AJ242970), *Nicotiana glauca* (YNPY09106), *Oryza sativa* (AA072645), 및 *Homo sapiens* (CAA37375)와 아미노산 수준에서 91%, 85%, 86%, 85%, 및 57%의 현저한 유사성을 나타내었다 (도 17b와 17c).

<45> 도 17a에서 밑줄 친 부분은 nascent polypeptide-associated complex(NAC) domain이다. 도 17b에서 CaBtf3,

Arabidopsis thaliana (AJ242970), *Nicotiana plumbaginifolia* (YNPY09106), *Oryza sativa* (AA072645), 및 *Homo sapiens* (CAA37375)의 서열을 Multalin program(INRA-Toulouse)을 사용하여 비교하였다. 회색 부분은 NAC domain을 나타낸다. 짧은 human Btf3b isoform은 Btf3 서열의 아미노산 50 위치에서 시작한다. 도 17c는 아미노산 서열 유사성에 기초한, CaBtf3와 다른 Btf3의 예상된 진화적 관련성을 보여주는 계통발생수(phylogenetic tree)를 나타낸다. 가로선의 길이는 서열들 사이의 부동성(dissimilarity)을 나타낸다. 계통발생수는 UPGMA 알고리즘을 사용하는 MegAlign Program(Intelligenetics)에 의해 확정되었다.

<46> **실험결과 2. 병원균 침입시 증가된 CaBtf3의 발현**

<47> 고추의 한 재배종으로 분류되는 부강은 TMV의 pathotype인 P₀과 P₁에는 HR등의 저항성을 보이거나, P_{1,2}에는 감수성을 보인다 (Park et al. 2002). TMV에 대한 병 저항성 반응 중 유도되는 CaBtf3를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과, TMV-P₀의 접종 이후 약 36시간이 지난 후 눈에 띄게 CaBtf3의 전사체(transcript) 양이 증가함을 확인할 수 있었다. 그러나 TMV-P_{1,2}를 처리하였을 때에는 CaBtf3 전사체 양에서의 큰 변화를 확인 할 수 없었다 (도 2). 이러한 결과는 CaBtf3의 발현이 TMV 접종에 대한 HR반응에 특이적으로 유도된다는 것을 예측할 수 있게 한다.

<48> CaBtf3의 유도가 TMV 이외에 다른 병원체에 대한 방어기작에도 관여하는 가를 알아보기 위하여 박테리아인 Xcv로 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). CaBtf3의 전사체는 TMV에 대한 저항성을 보이는 잎에 다량 축적되었으며, 박테리아 감염에 대한 HR 동안에도 발현되는 것이 확인되었다 (도 2). CaBtf3 전사체는 ECW와 ECW20R에서 12시간 이내에 모두 발견되었으나, ECW 20R에서 훨씬 강한 발현 패턴을 보이는 것으로 볼 때, CaBtf3가 바이러스와 박테리아에 대한 저항성 반응에 모두 유도되는 유전자일 것으로 예상할 수 있다.

<49> **실험결과 3. CaBtf3의 기관-특이적 발현**

<50> full-length CaBtf3를 프로브(probe)로 하여 수행한 Southern blot 분석의 결과를 통해, 고추 게놈(genome)에서 약 2~3 copy의 CaBtf3 유전자가 존재함을 알 수 있었다 (도 3a). 이어서 고추의 여러 가지 기관에서 CaBtf3의 정상상태 전사체 수준(steady state transcript level)을 알아보기 위해 Northern blot 분석을 수행하였다. 먼저 뿌리와 줄기, 잎, 꽃, 미성숙(green fruits), 성숙 과실(red fruits)에서 total RNA를 분리하여 이들 각각에 CaBtf3-특이 프로브(CaBtf3-specific 3' UTR cDNA probe)를 이용해 혼성화한 결과, 뿌리와 줄기, 미성숙 과실에서 특히 강하게 검출되었고, 꽃과 성숙 과실에서는 미량 검출되었으며, 잎에서는 전사체가 검출되지 않았다 (도 3b).

<51> **실험결과 4. 다양한 자극에 유도되는 CaBtf3의 발현패턴**

<52> CaBtf3가 다른 자극에도 유도되는 지를 조사하기 위하여, 식물에서 방어반응의 유도인자로 알려진 다양한 화학제(chemicals)를 식물에 처리하였다. 100 μM MeJA(methyl jasmonate)와 10 mM SA(salicylic acid)의 용액으로 처리된 고추식물의 잎을 처리 후 지시된 시점에서 각각 수확하였다. 도 4의 northern blot 분석은 MeJA 또는 SA 처리에 의해 CaBtf3 mRNA의 축적됨을 보여주었다. MeJA가 뿌려진 고추 잎에서, CaBtf3 유전자와 MeJA 처리에 대한 양성대조군인 CaPinII 유전자 (Green and Ryan 1972) 둘 다 발현이 증가되었다 (도 4a). CaBtf3 전사체는 처리 후 6시간 내에 유도되었으며, 48시간에서 가장 높은 발현 수준에 도달하였다. 그리고 SA 처리에 대한 양성대조군인 CaPR-10 (Park et al., 2004)과 비교하여 약하게 검출되었지만 CaBtf3 유전자 발현 역시 SA 처리로 증가되었다 (도 4b).

<53> **실험결과 5. CaBtf3의 핵에서의 위치 확인**

<54> full-length CaBtf3 유전자와 green fluorescent protein (GFP) 유전자가 융합된 구성체(construct)를 이용하여 CaBtf3의 세포내 위치(subcellular localization)를 알아보았다. CaBtf3::smGFP DNA 구성체는 *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter에 의하여 조절되도록 하고, 이를 애기장대(*Arabidopsis*)에서 분리된 원형질체(protoplast)에 도입하였다 (도 5a). 또한, CaBtf3의 핵 타겟팅(nuclear targeting)에서 N-말단 서열이 역할을 하는 지를 알아보기 위하여, CaBtf3의 N-말단 삭제 형태(N-terminal deletion form)를 사용하여 CaBtf3ΔN의 위치를 확인하였다.

<55> 형광현미경으로 관찰한 결과, CaBtf3::smGFP 융합 단백질이 핵에 위치하는 것을 볼 수 있었으며, DAPI signal과도 오버랩핑(overlapping)됨을 확인할 수 있었다. 반면, CaBtf3ΔN::GFP의 GFP signal은 더 이상 DAPI signal

과 오버랩되지 않았으며, 그 단백질이 더 이상 핵에서 타겟팅 되지 않았음을 나타낸다 (도 5b). 이러한 결과는 N-말단 서열이 CaBtf3의 핵에서 위치에 필요하다는 것을 나타낸다.

<56> **실험결과 6. 고추에서 VIGS 조건잡기**

<57> VIGS는 고추를 포함하는 다양한 식물에서 기능 유전자(functional gene)의 특성연구에 있어 널리 이용되는 방법이다 (Chung et al., 2004)(도 1참조). 495 bp open reading frame을 지닌 full CaBtf3 cDNA를 이용해, 이를 pTRV2에 연결하여 VIGS를 수행하였다 (도 6a). 고추에서 VIGS의 효율을 확인하기 위해서, 비교적 뚜렷한 표현형을 가지고 있는 Capsicum annuum phytoene desaturase (CaPDS) 유전자를 아그로박테리움(strain GV2260) 바이너리 벡터인 T-DNA를 포함하는 TRV2 cDNA에 사용하여, 먼저 억제(silencing) 시켜보면서 적당한 조건을 맞추었다. PDS 유전자는 카로티노이드 생합성(carotenoid biosynthesis)에 관여하는 효소를 코딩하고 있어, 이 유전자가 억제(silencing)되는 경우 식물 잎의 백화(photo-bleaching)현상을 관찰할 수 있다 (Chung et al., 2004). CaPDS가 억제된 식물체의 잎과 열매에서 뚜렷한 백화현상을 볼 수 있었다 (도 6b).

<58> **실험결과 6. CaBtf3의 발현이 저하된 고추 식물의 발달 표현형**

<59> VIGS 결과, TRV2-CaBtf3에 감염된 식물체는 야생형(wild type) 또는 TRV2를 감염시킨 식물체와는 눈에 띄는 표현형의 차이를 보였다 (도 7). VIGS 이후 초기단계(early stage)에서는 좁고 쭉그려진 기형적인 형태의 잎 모양에서 큰 차이를 보였으며, 식물체의 크기 또한 대조군(control)에 비하여 작았다 (도 8a). 시간이 지남에 따라 TRV2-CaBtf3에서 더 심각한 표현형을 나타내었다. CaBtf3-억제된 식물에서 잎들의 수는 줄기의 아래에서 위로 점점 증가하였다 (도 8b). 2달 정도 지난 뒤, TRV2-CaBtf3에서 다수의 잎이 줄기 전체에 분포하는 것을 관찰할 수 있었으며, 잎의 노화 또한 크게 지연되었다. 또 CaBtf3-억제된 식물체에서는 꽃이 피지 않거나 정상적이지 않은 형태의 꽃을 피우는 것을 확인할 수 있었다 (도 8c).

<60> **실험결과 7. CaBtf3의 발현이 저하된 고추 식물의 TMV에 대한 약화된 저항성**

<61> TMV에 대한 병 저항성 반응 중 CaBtf3의 발현이 크게 증가하는 것을 본 것에 이어 (도 2), VIGS를 통해 CaBtf3가 억제된 식물체를 이용하여 다시 한번 CaBtf3의 기능을 확인하고자 하였다. VIGS 이후 1달 정도가 지난 뒤에 TMV-P₀을 처리하고 접종 후 48시간이 지나 이를 샘플링 하였다. CaBtf3가 억제(suppression)된 식물체의 경우, TRV2만이 주입된 대조군 식물(control plant)에 비하여 TMV-P₀에 대한 잎의 손상이 현저함이 관찰되었다 (도 9).

<62> 고추 잎의 TMV에 대한 저항성에 CaBtf3 유전자가 관여함을 확인하기 위해, TMV의 coat protein (CP)을 이용하여 ELISA를 수행하였다. 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-P₀을 처리하여 이용하였다. CaBtf3가 억제된 고추의 잎에서도 역시 TMV-P₀을 처리하여 샘플링한 뒤 잎의 단백질을 분리해 내어 ELISA를 이용해 TMV-CP가 축적된 양을 측정하였다. CaBtf3가 억제된 식물체에서의 TMV-CP 축적량은, TRV2 대조군 식물에 비하여 현저히 높게 나타났다. 이를 통해 TMV의 증식이 CaBtf3가 억제되었을 경우 더 높게 나타난다는 것을 확인할 수 있었다 (도 10).

<63> 도 10은 VIGS-수행된 고추식물의 TMV 저항성을 나타낸 것이다. 바이러스 접종 48시간 후 TRV 벡터 대조군과 함께 VIGS 식물의 흡광도를 나타낸 것이다. TMV는 anti-TMV-IgG를 사용하여 indirect ELISA를 통해 검출하였다.

<64> 분자 수준에서 CaBtf3 억제(suppression)를 확인하기 위하여, RT-PCR을 수행하였다. 도 11은 CaBtf3 유전자가 고추 식물에서 잘 억제되었음을 보여준다. 증가된 HR 장애가 TMV-P₀에 감염된 CaBtf3-억제된 식물 잎에서 관찰되었기 때문에, CaBtf3의 억제가 PR 유전자들의 발현 수준에 영향을 줄 수 있는 지를 시험하였다 (도 12). 사용된 PR 유전자들(CaPR-1, CaPR-2, CaPR-4, CaPR-5, CaPR-10, 및 CaPR-16)의 전사체 수준은 TRV2-CaBtf3에서 감소-조절되었다. 이러한 결과는 CaBtf3 유전자가 RP 유전자들보다 up-stream에 위치한다는 것과 HR에 대한 효과를 가지는 PR 유전자들의 수준을 조절할 수 있음을 나타낸다.

<65> **실험결과 8. Btf3의 발현이 억제된 담배 식물의 표현형**

<66> CaBtf3의 억제를 통해서 나타나는 표현형들이 단지 고추에서 제한적으로만 나타나는지를 확인하기 위하여, 고추와 가까운 다른 가지과 식물 중 적합한 종으로 담배를 선택하였다. 담배(*N. benthamiana*)를 이용한 VIGS의 기술이 널리 알려져 있고, 고추와 *N. benthamiana*사이의 평균 서열(average sequence)이 90% 일치하므로 (Kim et al., 2006), *N. benthamiana* Btf3 (NbBtf3)와 CaBtf3의 서열에서 유사성을 알아보았다. NbBtf3 (DQ4476646)와

CaBtf3 유전자를 비교하여 92%의 뉴클레오티드 서열이 일치함을 확인하였다 (도 13).

<67> 고추에서와 마찬가지로, 담배에서 또한 야생형(wild type) 또는 TRV2를 감염시킨 대조군 식물과 TRV2-CaBtf3 담배 식물 사이의 현저한 표현형의 차이를 볼 수 있었다. TRV2-CaBtf3 담배 식물의 경우 잎의 주그러짐, 성장과 개화의 지연이 관찰되었다 (도 14). 이러한 비정상적인 표현형은 VIGS 이후 6개월 이후에도 지속되었으며, 고추에서처럼 잎의 노화 또한 거의 관찰되지 않았다 (도 15). CaBtf3가 억제된 고추와, 외부에서 TRV2-CaBtf3를 통해 CaBtf3 전사체가 도입된 고추 잎의 유사한 표현형을 통해서 *N. benthamiana*의 system에서도 CaBtf3의 VIGS가 제대로 작동되고 있다고 결론내릴 수 있다.

<68> TMV에 대한 저항 반응 시 Btf3 유전자의 유도가 전신적으로 일어나는 지를 조사하기 위하여, TMV-P₀ 접종 후 TRV2-CaBtf3 담배 식물의 처리되지 않은 상부 잎으로부터 TMV-P₀ total RNA를 분리하였다. PR-1의 유도는 여러 식물들에서 SAR(systemic acquired resistance)의 특징이다 (Bonasera et al., 2006). 더욱이, PR-1 단백질은 TMV-감염된 조직에서 전체 잎 단백질의 1%를 차지할 수 있다 (Bonasera et al., 2006). *N. tabacum* PR-1(NtPR-1) 전사체는 접종 후 7일째에서 3개의 개체(Btf3-억제된 담배 식물)에서 약하게 검출되었다 (도 16, NbACT: loading control). 이러한 데이터는 CaBtf3가 바이러스에 대한 국부 및 전신 방어반응 둘 다와 관련이 있음을 나타낸다.

<69> 실험결과 9. 식물의 저항 유전자와 병원균의 비병원 유전자 간의 상호작용시 Btf3의 기능

<70> 식물의 방어 기작을 설명하는 gene-for-gene model에 의하면, 식물의 병 저항성 기작은 병원체(pathogen)의 Avr protein을 식물체의 R protein이 인식하는 것으로부터 시작된다 (Schofield et al., 1996). CaBtf3가 Pto-mediated PCD pathway(Pto-mediated programmed cell death pathway)에 관여하는지 알아보기 위하여, Btf3가 억제(silencing)된 *N. benthamiana*에서 AvrPto와 Pto protein을 co-expression시켜 보았다. 접종 후 이틀이 지난 뒤 야생형과 TRV2를 주입한 식물체에서는 AvrPto/Pto-mediated PCD가 관찰된 반면 (도 17a), Btf3가 억제된 담배에서 PCD는 접종 뒤 7일이 지난 뒤에도 관찰되지 않았다 (도 17b). 이러한 결과들로 미루어볼 때, Btf3 유전자는 R-gene mediated PCD pathway에 관여하는 것으로 예상된다.

<71>

[참고문헌]

- Abel, S., and Theologis, A. (1994). Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J.* **5**, 421-427.
- Ahn, J.-W., Kim, M., Lim, J.H., Kim, G.-T., and Pai, H.-S. (2004). Phytocalpain controls the proliferation and differentiation fates of cells in plant organ development. *Plant J.* **38**, 969-981.
- An, G., Ebert, P.R., Mitra, A., and Ha, S.B. (1998). Binary vector: *Plant Mol. Biol. Manual* A3, Gelvin, B., Schilperoort, R.A., and Verma, D.P.S. (eds.) 1-19 Kluwer Academic Publishers
- Bonasera, J.M., Kim, J.F., and Beer, S.V. (2006). *PR* genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biol.* **9**, 6-23.
- Brockstedt, E., Otto, A., Rickers, A., Bommert, K., Wittmann-Liebold, B. (1999). Preparative high-resolution two-dimensional electrophoresis enables the identification of RNA polymerase B transcription factor 3 as an apoptosis-associated protein in the human BL60-2 Burkitt lymphoma cell line. *J. Protein Chem.* **18**, 225-231.
- Chung, E., Seong, E., Kim, Y.C., Chung, E.J., Oh, S.K., Lee, S., Park, J.-M., Joung, Y.H., and Choi, D. (2004). A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Mol. Cells* **17**, 377-380.
- Davis, S.J., and Viestra, R.D. (1998). Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol. Biol.* **36**, 521-528.
- Deng, J.M., Behringer, R.R. (1995). An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early post-implantation lethality in mice. *Transgenic Res.* **4**, 264-269.
- Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 185-209.
- Flores, O., Lu, H., and Reinberg, D. (1992). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIH. *J. Biol. Chem.* **267**, 2786-2793.
- Freire, M.A. (2005). Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex. *Gene* **345**, 271-277.
- Green, T.R., and Ryan, C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves. *Science* **175**, 776-777.
- Holzem, A., Nahring, J.M., and Fischer, R. (2001). Rapid identification of a *Tobacco mosaic virus* epitope by using a coat protein gene-fragment-pVIII fusion library. *J. Gen. Virol.* **82**,

<72>

9-15.

- Kanno, M., Chalut, C., and Egly, J.M. (1992). Genomic structure of the putative BTF3 transcription factor. *Gene* **15**, 219-228.
- Karrer, E.E., Beachy, R.N., and Holt, C.A. (1998). Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. *Plant Mol. Biol.* **36**, 681-690.
- Kim, G.T., Tsukaya, H., and Uchimiya, H. (1998). The *ROTUNDIFOLIA3* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells. *Genes Dev.* **12**, 2381-2391.
- Kim, K.J., Park, C.J., An, J.M., Ham, B.K., Lee, B.J., and Paek, K.H. (2005). CaAlaAT1 catalyzes the alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase reaction during the resistance response against *Tobacco mosaic virus* in hot pepper. *Planta* **221**, 857-867.
- Kim, M., Lee, S., Park, K., Jeong, E.-J., Ryu, C.-M., Choi, D., and Pai, H.-S. (2006). Comparative microarray analysis of programmed cell death induced by proteasome malfunction and hypersensitive response in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 514-521.
- Leopold, A.C. (1961). Senescence in plant development. *Science* **134**, 1727-1732.
- Mitchell, P.J., and Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**, 371-375.
- Munz, B., Wiedmann, M., Lochmuller, H., and Werner, S. (1999). Cloning of novel injury-regulated genes. Implications for an important role of the muscle-specific protein skNAC in muscle repair. *J. Biol. Chem.* **274**, 13305-13310.
- Oughan, H.J., Morris, P., and Thomas, H. (2005). The colors of autumn leaves as symptoms of cellular recycling and defenses against environmental stresses. *Curr. Top Dev. Biol.* **66**, 135-160.
- Park, C.-J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G.-J., You, J.S., and Paek, K.-H. (2002). Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to *Tobacco mosaic virus*. *Plant Mol. Biol.* **48**, 243-254.
- Park, C.-J., Kim, K.-J., Shin, R., Park, J.-M., Shin, Y.-C., and Paek, K.-H. (2004). Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J.* **37**, 186-198.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., and van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1571-1580.
- Quirino, B.F., Normanly, J., and Amasino, R.M. (1999). Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of

<73>

- defense-related genes. *Plant Mol. Biol.* **40**, 267-278.
- Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W., and Staskawicz, B.J. (1996). Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274**, 2063-2065.
- Tai, T.H., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M.C., Stall, R.E., and Staskawicz, B.J. (1999). Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14153-14158.
- van Loon, L.C., and van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, 85-97.
- Warton, K., Foster, N.C., Gold, W.A., and Stanley, K.K. (2004). A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. *Gene* **342**, 85-95.
- Weaver, L.M., Himelblau, E., and Amasino, R.M. (1997). Leaf senescence: gene expression and regulation. *Genet. Eng. (NY)* **19**, 215-234.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T.A., and Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* **370**, 434-440.
- Zhao, J., Davis, L. C., and Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **23**, 283-333.
- Zheng, X.M., Moncollin, V., Egly, J.M., and Chambon, P. (1987). A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). *Cell* **50**, 361-368.
- Zheng, X.M., Black, D., Chambon, P., and Egly, J.M. (1990). Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3. *Nature* **340**, 556-559.

<74>

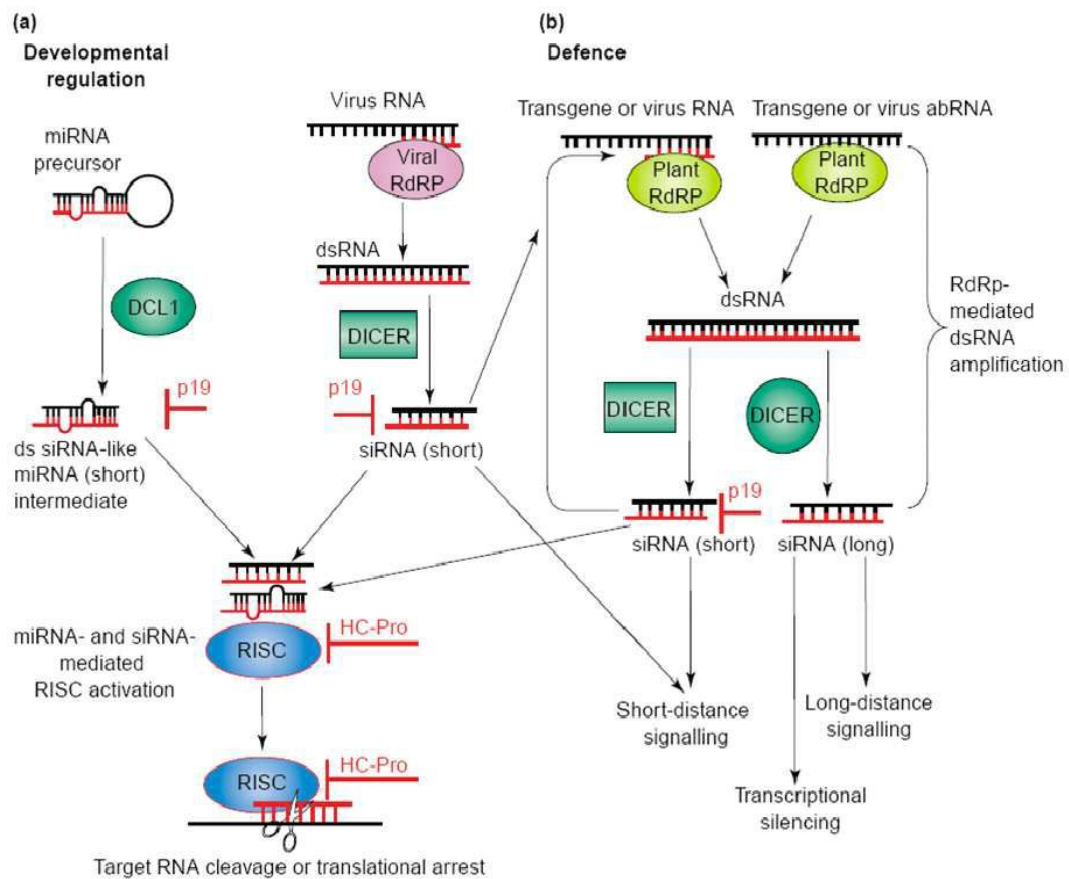
도면의 간단한 설명

- <75> 도 1은 본 발명에 사용된 RNA silencing mechanism(VICS)을 나타낸 것이다.
- <76> 도 2는 TMV 또는 Xcv를 처리했을 때 CaBtf3의 RT-PCR 결과를 나타낸 것이다.
- <77> 도 3a는 CaBtf3의 Southern blot 분석을 나타낸 것이고, 도 3b는 고추 식물체 각 기관에서 CaBtf3 mRNA의 Northern blot 분석을 각각 나타낸 것이다.
- <78> 도 4a와 4b는 MeJA와 SA 처리에 의한 CaBtf3 유전자의 발현패턴을 각각 나타낸 것이다.
- <79> 도 5a는 CaBtf3::smGFP 융합 유전자의 구성체를 나타낸 것이고, 도 5a는 CaBtf3::smGFP 융합 단백질의 세포내 위치를 나타낸 것이다.
- <80> 도 6a는 VIGS에 이용된 fragment와 full-length CaBtf3 cDNA의 도식화를 나타낸 것이고, 도 6b는 VICS 조건 (Silencing conditioning)을 위한 실험결과를 나타낸 것이다.
- <81> 도 7은 CaBtf3가 발현 억제된 고추의 표현형을 나타낸 것이다.
- <82> 도 8a, 8b, 8c는 CaBtf3가 발현 억제된 고추의 표현형과 꽃의 모양을 나타낸 것이다.
- <83> 도 9는 CaBtf3가 발현 억제된 고추에 TMV-P₀ 접종 뒤 48 시간 후 잎의 표현형을 나타낸 것이다.
- <84> 도 10은 VIGS를 수행한 고추의 TMV에 대한 저항성을 나타낸 것이다.
- <85> 도 11은 CaBtf3-억제된 고추식물에서 CaBtf3 유전자가 억제되었음을 나타낸 것이다.
- <86> 도 12는 CaBtf3-억제된 고추식물에서 다양한 PR 유전자들의 발현 수준을 나타낸 것이다.
- <87> 도 13는 CaBtf3와 NbBtf3의 서열을 비교한 것이다.
- <88> 도 14은 담배에서 Btf3의 VIGS-수행할 때 성장이 지연되는 표현형과 비정상적인 개화를 나타낸 것이다.
- <89> 도 15는 Btf3가 발현 억제된 담배의 표현형을 나타낸 것이다.
- <90> 도 16은 Btf3-억제된 담배식물에서 NtPR-1의 감소된 발현 수준을 나타낸 것이다.

- <91> 도 17a는 pBTEx::Avr과 pBTEx::Pto를 *N. benthamiana* (왼쪽)와 TRV2를 감염시킨 *N. benthamiana* (오른쪽)에서 coexpression 시킨 결과이고, 도 17b는 Btf3가 발현 억제된 담배에서 AvrPto-mediated PCD pathway가 저해됨을 보여주는 사진이다.
- <92> 도 18a는 CaBtf3의 서열 및 아미노산 서열을 나타낸다.
- <93> 도 18b는 Btf3 단백질의 서열을 비교한 것이다.
- <94> 도 18c는 짧은 human Btf3b isoform이 Btf3 서열에서 아미노산 위치 50에서 시작됨을 나타낸다.

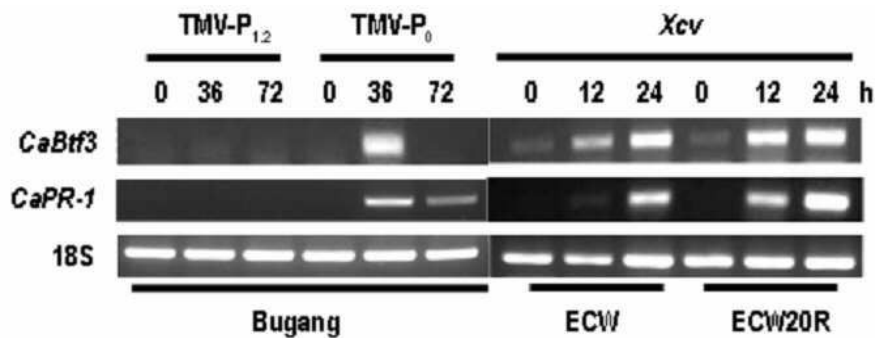
도면

도면1

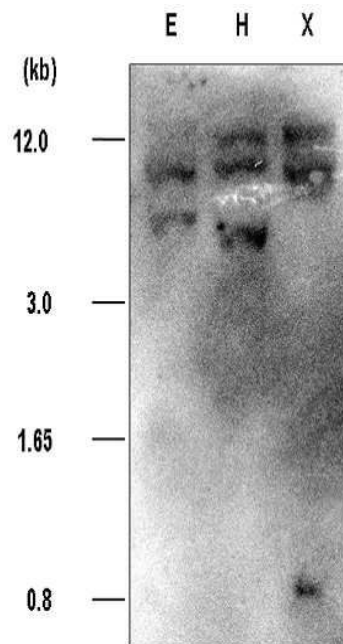


TRENDS in Plant Science

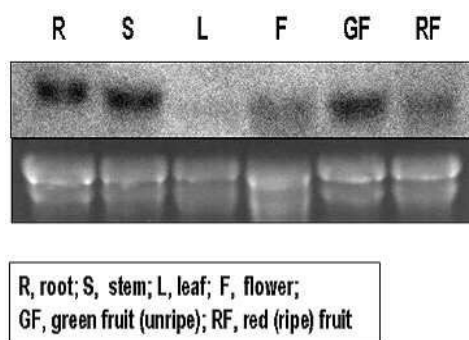
도면2



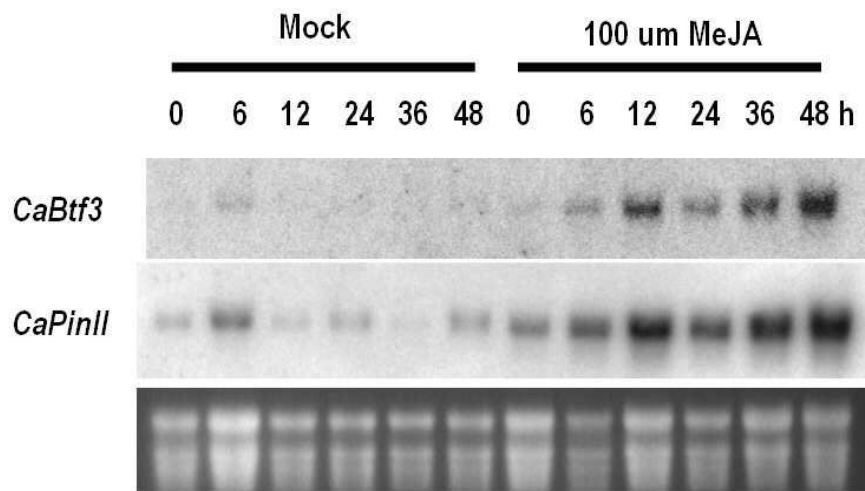
도면3a



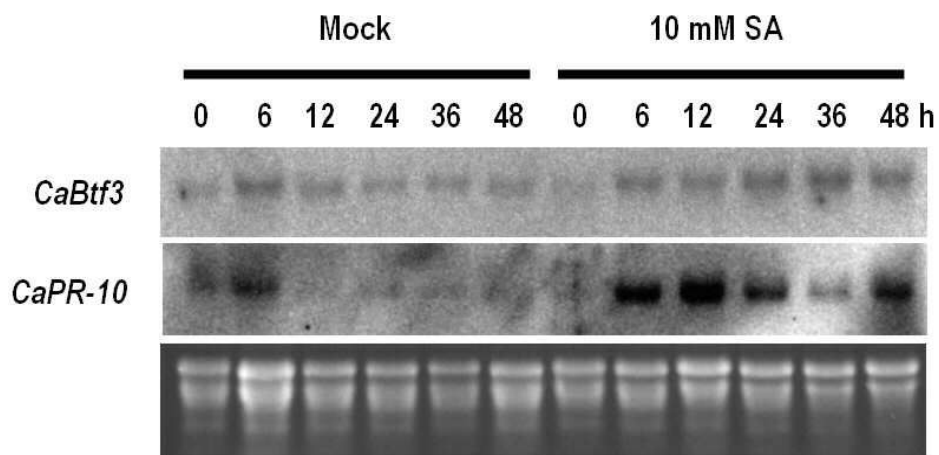
도면3b



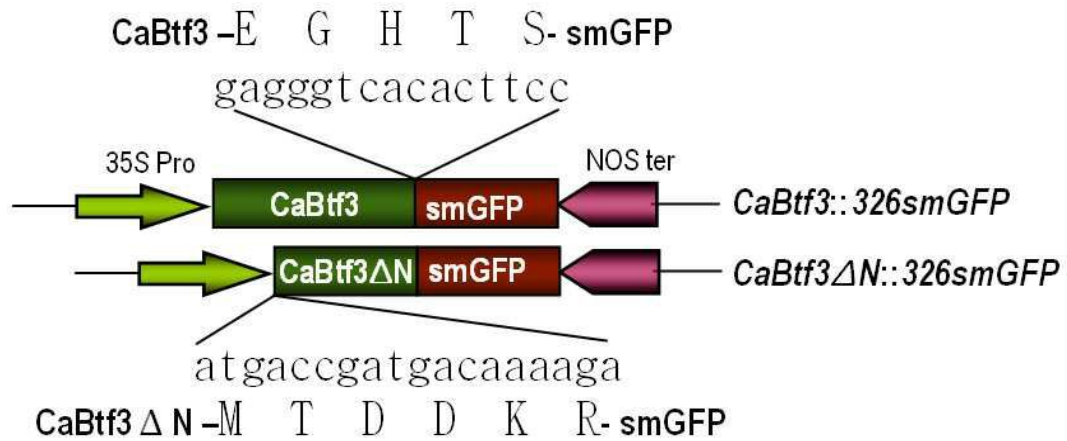
도면4a



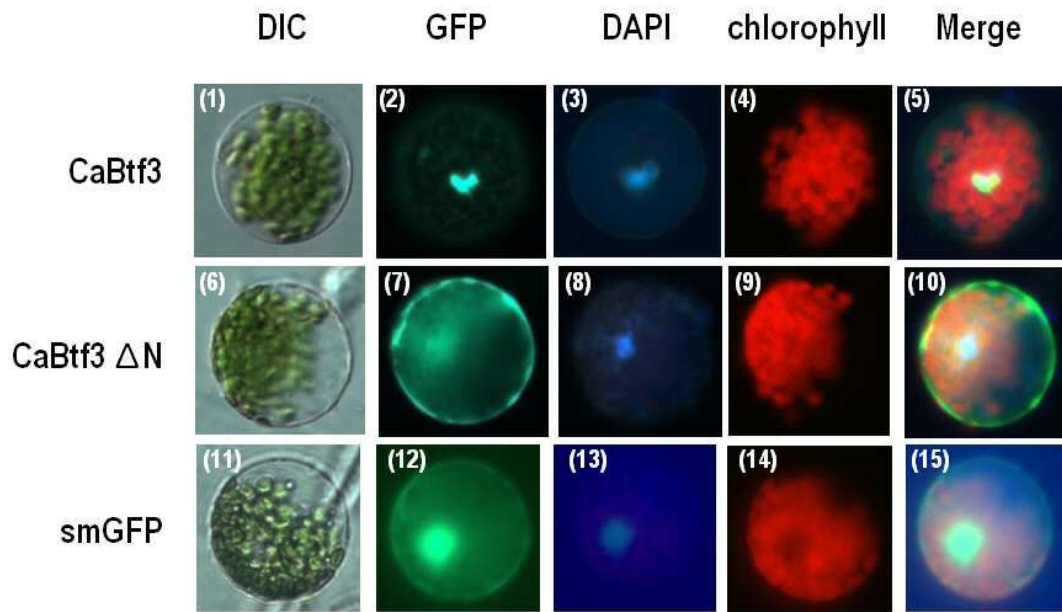
도면4b



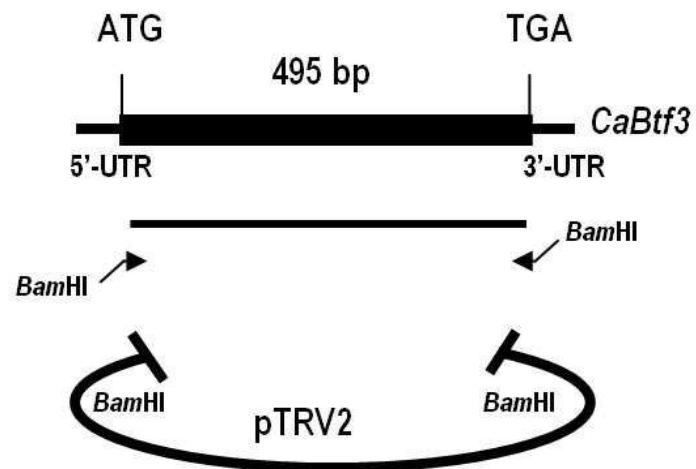
도면5a



도면5b



도면6a



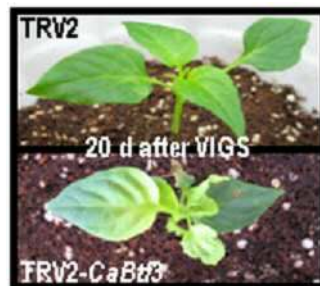
도면6b



도면7



도면8a



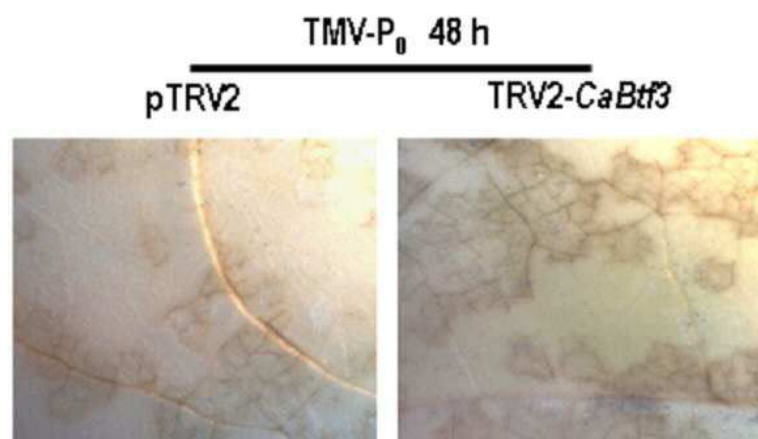
도면8b



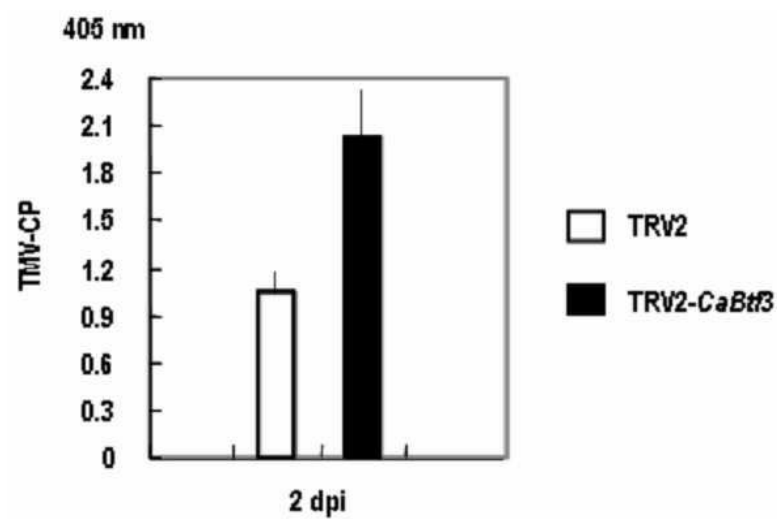
도면8c



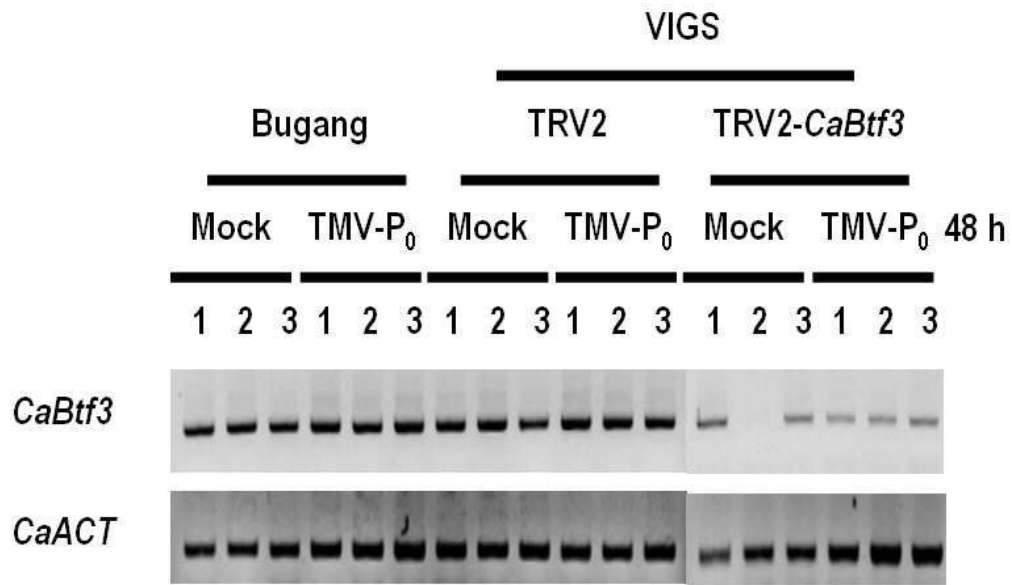
도면9



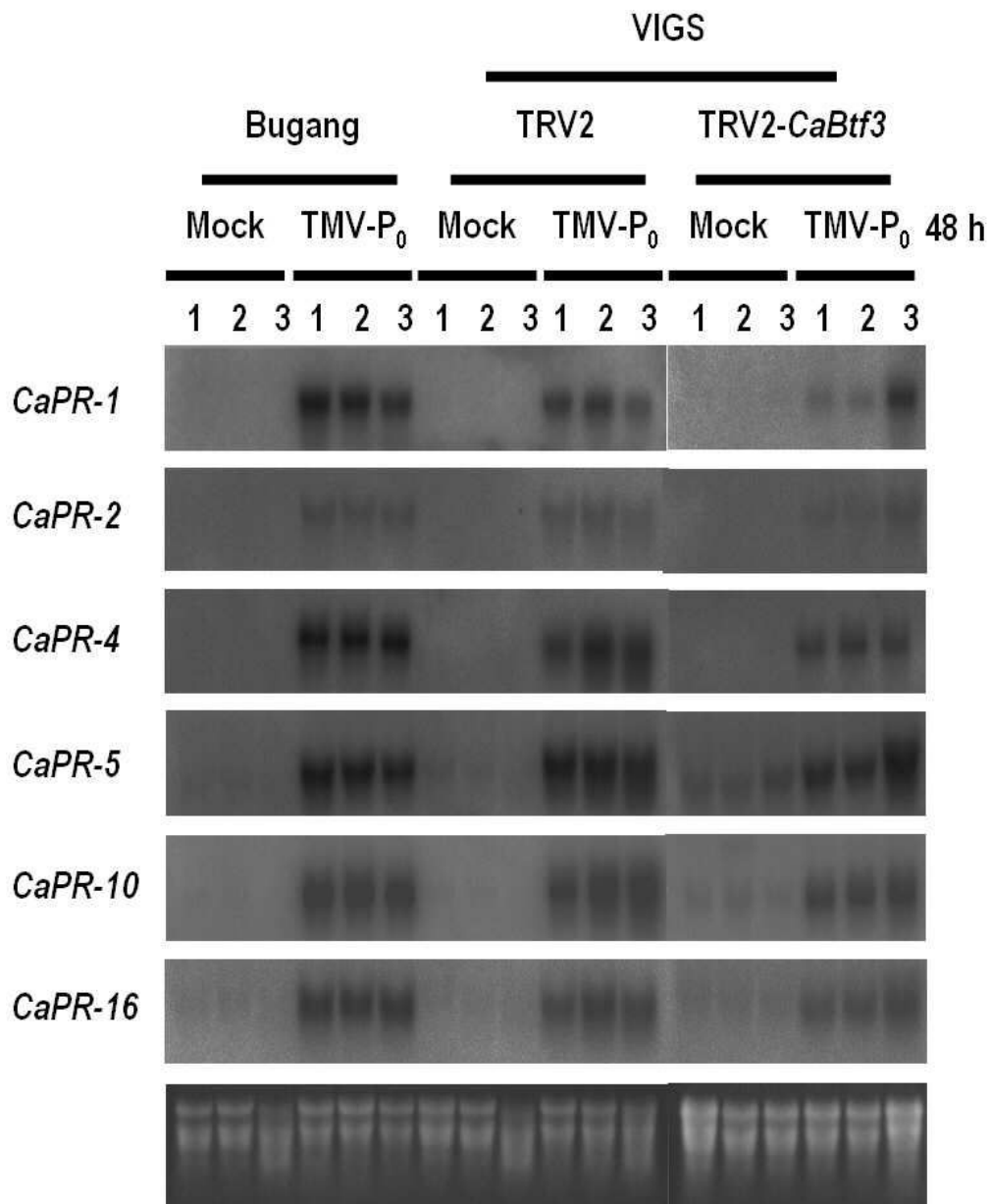
도면10



도면11



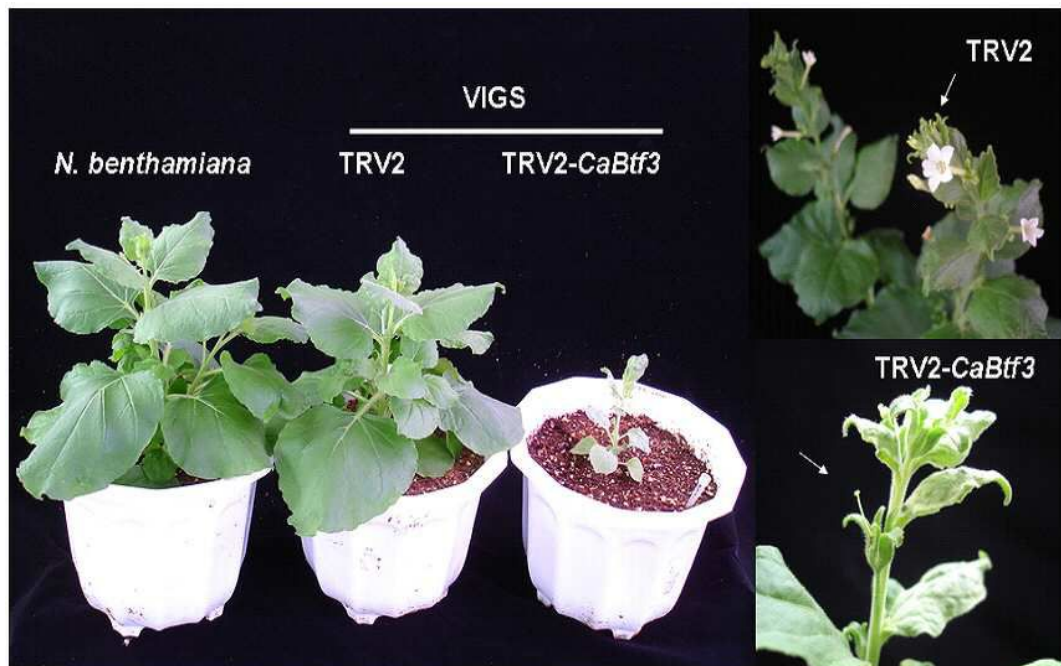
도면12



도면13

<i>CaBt f3</i>	1	ATGAATGTAGAAAAGTTGCAAAAGATGGCTGGTTCGGTCAGAACTGGTGAAAGGGTACC	60
<i>NbBtf3</i>	1	ATGAATGTAGAAAAGCTGCGTAAGATGGCCGGTTCGGTCAGAACCGGTGAAAGGGTACC	60
<i>CaBt f3</i>	61	ATGAGAAGAAAGAAGAAGGCTGTACACAAGCAACTACAACCGATGACAAAAGACTACAG	120
<i>NbBtf3</i>	61	ATGAGAAGAAAGAAGAAGCGGTTACAAAACAACTACAACCGATGACAAAAGACTACAG	120
<i>CaBt f3</i>	121	AGCACCTTGAAAAGAATAGGTGTCAATGCCATTCTGCTATTGAAGAAGTCAACATTTTC	180
<i>NbBtf3</i>	121	AGCACCTTGAAAAGAATAGGTGTCAATGCCATTCTGCTATTGAAGAAGTCAACATTTTC	180
<i>CaBt f3</i>	181	AAGGAGGACGTTGTTATCCAATTCATTAATCCCAAAGTCCAAGCATCAATTGCTGCAAAC	240
<i>NbBtf3</i>	181	AAGGAGGATGTGTTATCCAATTCATTAATCCCAAAGTCCAAGCATCTATTGCTGCAAAC	240
<i>CaBt f3</i>	241	ACGTGGGTAGTTAGTGGTACCCCCAGACAAAGAAATTGCAGGATATTCTTCCTCAGATT	300
<i>NbBtf3</i>	241	ACATGGGTGTTAGTGGTTCCCCCAGACAAAGAAATTGCAGGATATCCTTCCTCAAATT	300
<i>CaBt f3</i>	301	ATCACCAGCTGGGTCCTGATAATTGGAGAACTGAAGAAATTGGCTGAGCAGTTCCAG	360
<i>NbBtf3</i>	301	ATTCACCAATTGGGTCCTGATAATTGGAGAAATTGAAGAAGTTGGCTGAGCAGTTCCAG	360
<i>CaBt f3</i>	361	AAGCAGGCACCTGGTGCTGCTGCAGGTACAG	391
<i>NbBtf3</i>	361	AAGCAG-----GGTGCTGCTGCAGGTACAG	385

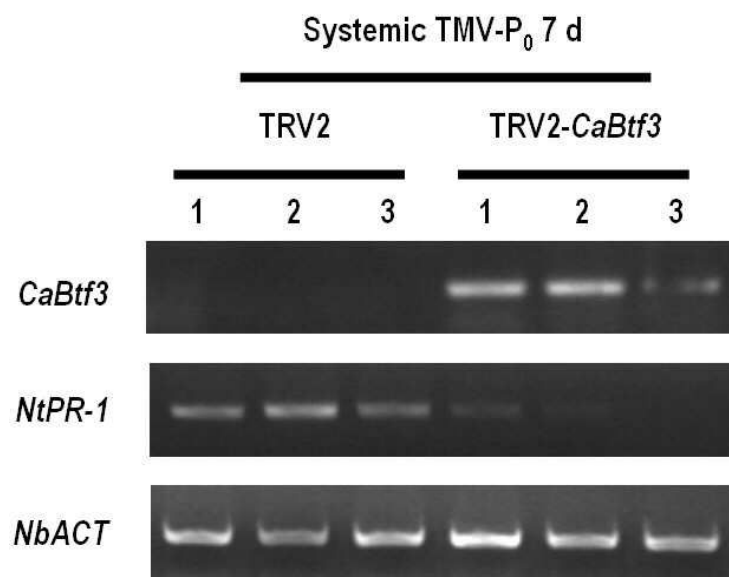
도면14



도면15



도면16



도면17a



도면17b



도면18a

```

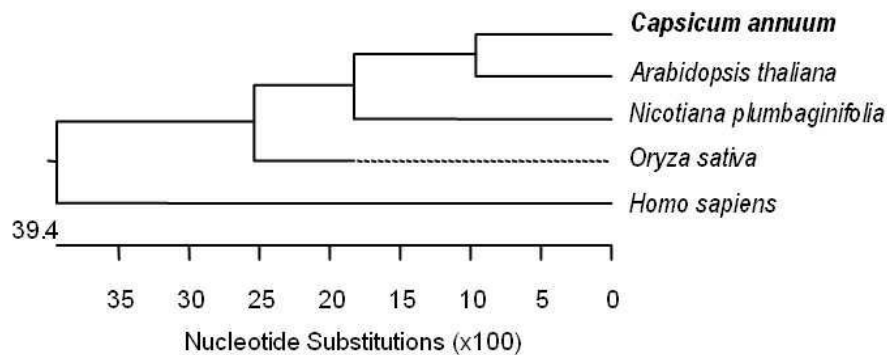
atgaatgtagaaaagttgcaaaagatggctggttcggtcagaactggtggaaagggtacc
M N V E K L Q K M A G S V R T G G K G T 20
atgagaagaaagaagaaggctgtacacaagacaactacaaccgatgacaaaagactacag
M R R K K K A V H K T T T T D D K R L Q 40
agcaccttgaaaagaataggtgtcaatgccattcctgctattgaagaagtcaacatttc
S T L K R I G V N A I P A I E E V N I F 60
aaggaggacgttggttatccaattcattaaccccaagtcgaagcatcaattgctgcaaac
K E D V V I Q F I N P K V Q A S I A A N 80
acgtgggtagttagtggtacccccagacaaagaaattgcaggatatttctcctcagatt
T W V V S G T P Q T K K L Q D I L P Q I 100
attcaccagctgggtcctgataatttggagaacttgaagaaattggctgagcagttccag
I H Q L G P D N L E N L K K L A E Q F Q 120
aagcaggcacctggtgctgctgcaggtacagatgcggccgcaggtgctgttgcagcacag
K Q A P G A A A G T D A A A G A V A A Q 140
gaagatgatgatgatgtaccagaactcgtggctggtgaaacttttgaagctgctgctgag
E D D D D V P E L V A G E T F E A A A E 160
gagggtcacacttctgaagttttgttgaaatttcctactttcaatgttctgatatca
E G H T S * 165
gattttacottagcttctgagtggtatatttcatgttatctcaaaagaattcttaaatg
cttttaatagtaagccactctttgcocctcaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

도면18b

<i>Capsicum annuum</i>	M-----1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	M-----1
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	M-----1
<i>Oryza sativa</i>	M-----1
<i>Homo sapiens</i>	MRRTGAPAQADSRGRGRARGGCPGGEATLSQPPPRGGTRGQEPQMKETIM 50
<i>Capsicum annuum</i>	NVEKIQKMAGSVRTGGKGTMRKKKAVHKTTTDDKRLQSTLKRIGVNAT 51
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NFEKIMKMAINTVRTGGKGTMRKKKAVHKTTTDDKRLQSTLKRIGVNST 51
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	NVEKIFKMAGSVRTGGKGTMRKKKAVHKTTTDDKRLQSTLKRIGVNAT 51
<i>Oryza sativa</i>	NMIKIKMAGZVRTGGKGSMRKKKAVHKTTTDDKRLQSTLKRIGVNNT 51
<i>Homo sapiens</i>	NQEKIAKLAQVFIIGGKGTARRKKFVHFTATADDDKRLQFSLKKLGVNNT 100
<i>Capsicum annuum</i>	PAIEEVNIFKED-VVIQFINFKVCASIAANTWVVSQTPTKKLQDILEQI 100
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PAIEEVNIFKDD-VVIQFINFKVCASIAANTWVVSQSPQTKKLQDILEQI 100
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	PAIEEVNIFKED-VVIQFINFKVCASIAANTWVVSQSPQTKKLQGYSSSN 100
<i>Oryza sativa</i>	EGIEEVNIFKDD-VVIQFINFKVCASIGANTWVVSQTPTKKLQDILEQI 100
<i>Homo sapiens</i>	SGIEEVNMTNQGTVIHFNNFKVCASLAANTFTITGHAEKQITTEMLPSI 150
<i>Capsicum annuum</i>	IHQLGPDNLENIKKLAEQFQKQAPGAAAGTIAAFGAVAAQEDDDDVPELV 150
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ISQLGPDNMDNIKKLAEQFQKQAFEGNFAASATI----QEDDDDVPELV 146
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	YSPVGPDNIESLFEASRAVPESRAPSAAGAPEGAPAL-QEDDDIEVPELV 149
<i>Oryza sativa</i>	INQLGPDNLDNLFLLAEQFQKQVPGAFAGASAGN----AQDDDDDVPELV 146
<i>Homo sapiens</i>	LNQLGALSITSLFPLAFALFKQSVDGKAPLATG----EDDDIEVHILV 194
<i>Capsicum annuum</i>	AGETFEAAAEFGH-----TS 165
<i>Arabidopsis thaliana</i>	-GETFEIAAEKAPAAA-----ASS 165
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	AGCTFEAGRSEFE-----RHTS 165
<i>Oryza sativa</i>	EGETFEAAAEKEPEEKKEAEVEEKKESS 175
<i>Homo sapiens</i>	--ENEDEAS-----KNEAN 206

도면18c



서열 목록

- <110> Korea University Industry-Academy Cooperation Foundation
- <120> CaBtf3 gene from hot pepper concerned in defense response and development of plants and use thereof

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 495

<212> DNA

<213> Capsicum annuum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(495)

<400> 1

atg aat gta gaa aag ttg caa aag atg gct ggt tcg gtc aga act ggt 48
Met Asn Val Glu Lys Leu Gln Lys Met Ala Gly Ser Val Arg Thr Gly
1 5 10 15

gga aag ggt acc atg aga aga aag aag aag gct gta cac aag aca act 96
Gly Lys Gly Thr Met Arg Arg Lys Lys Lys Ala Val His Lys Thr Thr
20 25 30

aca acc gat gac aaa aga cta cag agc acc ttg aaa aga ata ggt gtc 144
Thr Thr Asp Asp Lys Arg Leu Gln Ser Thr Leu Lys Arg Ile Gly Val
35 40 45

aat gcc att cct gct att gaa gaa gtc aac att ttc aag gag gac gtt 192
Asn Ala Ile Pro Ala Ile Glu Glu Val Asn Ile Phe Lys Glu Asp Val
50 55 60

gtt atc caa ttc att aac ccc aaa gtc caa gca tca att gct gca aac 240
Val Ile Gln Phe Ile Asn Pro Lys Val Gln Ala Ser Ile Ala Ala Asn
65 70 75 80

acg tgg gta gtt agt ggt acc ccc cag aca aag aaa ttg cag gat att 288
Thr Trp Val Val Ser Gly Thr Pro Gln Thr Lys Lys Leu Gln Asp Ile
85 90 95

ctt cct cag att att cac cag ctg ggt cct gat aat ttg gag aac ttg 336
Leu Pro Gln Ile Ile His Gln Leu Gly Pro Asp Asn Leu Glu Asn Leu
100 105 110

aag aaa ttg gct gag cag ttc cag aag cag gca cct ggt gct gct gca 384

Lys Lys Leu Ala Glu Gln Phe Gln Lys Gln Ala Pro Gly Ala Ala Ala
115 120 125

ggt aca gat gcg gcc gca ggt gct gtt gca gca cag gaa gat gat gat 432
Gly Thr Asp Ala Ala Ala Gly Ala Val Ala Ala Gln Glu Asp Asp Asp
130 135 140

gat gta cca gaa ctc gtg gct ggt gaa act ttt gaa gct gct gct gag 480
Asp Val Pro Glu Leu Val Ala Gly Glu Thr Phe Glu Ala Ala Ala Glu
145 150 155 160

gag ggt cac act tcc 495
Glu Gly His Thr Ser
165

<210> 2
<211> 165
<212> PRT
<213> Capsicum annuum

<400> 2
Met Asn Val Glu Lys Leu Gln Lys Met Ala Gly Ser Val Arg Thr Gly
1 5 10 15

Gly Lys Gly Thr Met Arg Arg Lys Lys Lys Ala Val His Lys Thr Thr
20 25 30

Thr Thr Asp Asp Lys Arg Leu Gln Ser Thr Leu Lys Arg Ile Gly Val
35 40 45

Asn Ala Ile Pro Ala Ile Glu Glu Val Asn Ile Phe Lys Glu Asp Val
50 55 60

Val Ile Gln Phe Ile Asn Pro Lys Val Gln Ala Ser Ile Ala Ala Asn
65 70 75 80

Thr Trp Val Val Ser Gly Thr Pro Gln Thr Lys Lys Leu Gln Asp Ile
85 90 95

Leu Pro Gln Ile Ile His Gln Leu Gly Pro Asp Asn Leu Glu Asn Leu
100 105 110

Lys Lys Leu Ala Glu Gln Phe Gln Lys Gln Ala Pro Gly Ala Ala Ala

115	120	125
Gly Thr Asp Ala Ala Ala Gly Ala Val Ala Ala Gln Glu Asp Asp Asp		
130	135	140
Asp Val Pro Glu Leu Val Ala Gly Glu Thr Phe Glu Ala Ala Ala Glu		
145	150	155
		160
Glu Gly His Thr Ser		
	165	