



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년12월10일
(11) 등록번호 10-0784165
(24) 등록일자 2007년12월04일

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0055110

(22) 출원일자 2006년06월19일

심사청구일자 2006년06월19일

(56) 선행기술조사문헌

US 5959180A (1999.09.28)

US 6713295B2 (2004.05.30)

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

백경희

서울 강남구 대치동 선경아파트 1-804

김성규

서울 강남구 도곡2동 렉슬아파트 205-1902

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현, 윤여강, 이문섭

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 조경주

(54) 고추식물 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제의 프로모터

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 프로모터를 제공에 관한 것이다. 구체적으로는 고추식물의 병원체 감염에 대한 저항성과 고추열매의 숙성과정에 관여하는 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제를 조절하는 프로모터에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 상기 프로모터는 고추식물의 UDP-글루코실트랜스퍼라제의 발현의 프로파일링 (profiling)을 연구하는데 중요하며, 상기 프로모터를 포함하는 재조합백터를 이용할 경우, 목표유전자를 열매조직-특이적으로 발현시키는 유전자 도입 식물을 제조할 수 있다.

대표도 - 도3a

```
CCTCATTCTCATTITGGATCGTAACATGATATGAGGATCCAACACCTTCTT
TATCTTCCTCACGTTCCITGGTATAAACACAGTATGATCCTTAACTTTTA
ATACCTCGTTGCATGAAACACCAATTCTGTCTGTCGCCTCATTCTGGAAG
GGATCAAACTTTGGAAATCCTTCTGGATATGAAATAAGAGTGCAGCATCG
TGCTTTGACAACTTCTTCGATGGTGTGTGTTTTIATTTCTIATTTTTAGGAC
CCAACATTTCAAACACAGAAGTCTTGTGTTGATTCTCTAAGTCGATCAA
ATACGAAGGGTCTTTTATAATGACAGTGGATTCTTTTCGATGGTGTGTA
ATTATTGACTGCCTTTCTTATGGATATGCGAATTGGAGGTGGTTGTGCATA
TCCTAGTCCCTTCACATTTCTTTAGTTTTACCCCTTCGACGAAATTTTCC
CAACCTTGATGGCTCATTAGGATTGTATCCAGCCTTTACAAATAACTTATA
TGCATTGGATCAAAGCCCTCTTTGTACACTTCATAGGGAGTGCCATAATC
TTATGGAAAAATTTGAGCCACAGATTCTCTAAGTGGCCTTGAGGATTGATT
TGTTACTTCAACCTTCTGATAGGTAAAGTTAACCCTTTATCATTATATC
TTGGGCATTAGGTGAGTGATTTTCTTTCTTTACCTTTGGCATGTAGCAA
AGAATAGGAGATGTCTTTCTTTTCATAGGAGCGACTTTCTTTATTCGAA
GTAAAGAAGGGCTTCATGTTGTGAATTTTTGTIATGTCACCTTGACCTTCT
TAGATGCAAGATCGTCACACTTGGTCTTGGTGACATCTCAATCCTTTCT
CATCTACAATATGATTTCTTAAGTAGAATTTGCATCGGCAAAAATGTGAC
TCAGCTTCAGTAAATGGCTGTGATCGGCGACTATCATTTTCCACTTCG
TTTTGAGGCACTTCAAGCATTGATAGTAAGAGGACGAGATAATTTTGTTT
```

(72) 발명자

이부자

대구 달서구 월성동 영남아파트 101-1201

김기정

경북 안동시 서부동 77-3

최수복

서울 성북구 안암동5가 151-18

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 프로모터.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 프로모터는 열매조직-특이적인 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 프로모터.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 프로모터는 병원체 감염-특이적인 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 프로모터.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항의 프로모터를 포함하는 재조합벡터.

청구항 6

제 5항에 있어서, 도 6의 계열지도를 갖는 pBI101::CaUGT1 벡터인 것을 특징으로 하는 재조합벡터.

청구항 7

제 5항의 재조합벡터로 형질전환된 식물체.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 고추식물 유래의 프로모터에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제의 프로모터에 관한 것이다.
- <8> 식물은 국부의 생물적 및 비생물적 스트레스에서 살아남기 위해 다양한 방어기작을 발전시켜왔다. 식물의 방어 반응은 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; Dangl and Jones 2001). 이들 유도된 반응이 주어진 식물-병원체 상호작용 동안 신속하고 조화롭게 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).
- <9> 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(pathogenicity)의 4개의 하위그룹(subgroups)인 병원형 P₀, P₁, P_{1.2}, P_{1.2.3} 로 분류되어 왔다 (Boukema et al., 1982). 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), 저항성 식물이 무독성 병원체에 의해 감염 (challenge)되는 부적합한 상호작용 (incompatible interaction)에서 활성의

식물 방어 레퍼토리의 구성요소으로써 더욱 신속하게 대부분이 발현되었다 (Dong et al., 1991).

<10> 방어반응과 관련된 유전자의 동정과 분석은 식물 방어반응 이면에서 전체 개요를 이해하는데 필수단계이며, 이러한 것은 병-저항성 식물의 생성(generation)을 도와줄 수 있다. 본 발명자는 differential screening을 사용하여 부강 고추식물 (Capsicum annuum cv. Bugang) 과 TMV-P₀ 사이의 부적합한 상호작용 동안 특이적으로 발현되는 몇몇의 cDNA를 분리하였고, UDP-글루코실트랜스퍼라제를 코딩하는 상기 cDNA 클론을 얻었다.

<11> UDP-글루코실트랜스퍼라제는 특이 공여체(specific donor)로부터 기질/수용체(acceptor)로 글리코실기(glycosyl group)의 전달을 촉진하는 효소의 큰 과(large family)를 구성한다 (Mackenzie et al., 1997). UDP-갈락토스(UDP-galactose)와 UDP-람노스(UDP-rhamnose)가 어떤 UDP-글루코실트랜스퍼라제에 의해 역시 사용된다고 하더라도, 보통의 glycosyl donor는 UDP-글루코스(UDP-glucose) 와 UDP-글루쿠로네이트(UDP-glucuronate)를 포함한다. 애기장대(Arabidopsis) genome은 UDP-글루코실트랜스퍼라제 family의 120 members 미만을 코딩한다. 그러나, 지금까지 단지 작은 수만이 클론되고 특성화되어 왔다. UDP 클루코스를 코딩하는 옥수수(maize) Bronze-1 locus : 플라보놀 3-O-글루코실트랜스퍼라제 (flavonol 3-O-glucosyltransferase)는 transposon tagging에 의해 주로 클론되었고 (Fedoroff et al., 1984; Harborne and Williams 1988), 그때부터, 다른 식물 종으로부터 몇몇 유전자들이 상동성(homology)에 기초하여 클론되어 왔다 (Sparvoli et al., 1994; Boss et al., 1996; Ford et al., 1998). 다양한 대사산물의 glycosylation과 관련된 몇몇의 UGTs는 다양한 기술들을 사용하여 분리되어 왔다 (Szerszen et al., 1994; Moehs et al., 1997; Warnecke et al., 1997; Lee and Raskin 1999; Martin et al., 1999; Yamazaki et al., 1999). 이러한 지식에도 불구하고, UDP-글루코실트랜스퍼라제가 고추에서 병원체 공격 또는 식물 발달과 관련이 있는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

<12> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 프로모터가 고추식물의 방어반응과 열매조직-특이적으로 목표유전자의 발현을 유도할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<13> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 고추식물에서 방어반응과 열매조직-특이적으로 목표유전자의 발현을 유도할 수 있는 고추식물 유래의 프로모터를 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

<14> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 프로모터를 제공한다. 본 발명의 프로모터는 고추열매에 특이적으로 발현하는 방어반응과 열매숙성 관련 유전자인 UDP-글루코실트랜스퍼라제 (CaUGT1으로 명명)의 프로모터에서 유래하였다.

<15> 본 발명의 고추식물 유래의 프로모터에서, 상기 프로모터는 열매조직-특이적인 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 프로모터인 것이 바람직하다. 본 발명의 프로모터는 CaUGT1 유전자의 프로모터로써, 열매-특이적 CaUGT1의 발현을 유도하는 프로모터에서 유래하였다. 본 발명에서는 상기 프로모터의 열매-특이적인 발현 유도를 확인하기 위해, GUS 리포터 유전자를 이용하여 고추식물에 입자 충격(particle bombardment) 실험을 이용하였다. CaUGT의 프로모터는 CaMV 35S 프로모터를 포함하는 pBI121 T-DNA 벡터와 같이 높은 활성을 나타냈다.

<16> 본 발명의 고추식물 유래의 프로모터에서, 상기 프로모터는 병원체 감염-특이적인 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 프로모터인 것이 바람직하다. 병원체 감염-특이적인 발현을 하는 CaUGT1 유전자는 본 발명의 프로모터에 의해 조절되기 때문에, 본 발명의 프로모터가 고추식물에서 병원체 감염-특이적인 발현을 유도하는 것은 자명하다.

<17> 본 발명의 고추식물 유래의 프로모터에서, 상기 프로모터는 시스-작용(cis-acting) 조절요소로써, 옥신(auxin)-, 지베렐린(giberellin)-, 앱시식산(ABA, abscisic acid)-, 살리실산(SA, salicylic acid)-, 에틸렌(ethylene)-, 메틸자스몬산(MeJA, methyl jasmonic acid)-, 및 엘리시터(elicitor)-반응성의 요소들을 포함하는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 프로모터인 것이 바람직하다. 각 반응성 요소들의 위치는 도 4에 도시되어 있다.

<18> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 프로모터를 포함하는 재조합벡터를 제공한다. 상기 프로모터의 전장 영역(full region)을 GUS 리포터 유전자를

가진 pBI101 T-DNA 벡터 (promoter-less GUS expression vector)에 넣어 그 활성을 분석한 결과, 고추열매에서 그 활성이 매우 높았다.

- <19> 본 발명의 재조합벡터에서, 상기 재조합벡터는 도 6의 계열지도를 갖는 pBI101::CaUGT1 벡터인 것을 특징으로 하는 재조합벡터인 것이 바람직하다. 상기 재조합벡터에는 GUS 리포터 유전자 대신에 발현을 원하는 목표유전자를 삽입시킬 수 있다.
- <20> 본 발명의 고추열매의 특이적 발현 벡터는 상기 프로모터가 바이너리(binary) 벡터의 외래 유전자 앞에 삽입될 수 있다. 본 발명에 이용될 수 있는 바이너리 벡터는 *A. tumefaciens*의 Ti 플라스미드와 함께 존재시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 BR과 BL을 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으므로, 예컨대, pGA 계열, pCG 계열, pCIT 계열, pGPTV 계열, pBECK2000 계열, BiBAC 계열, 및 pGreen 계열 벡터 등을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 용이하게 입수가 가능한 pBI101 (Clontech, 미국)를 사용하는 것이 좋다.
- <21> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 도 6의 계열지도를 갖는 pBI101::CaUGT1 벡터인 것을 특징으로 하는 열매조직-특이적 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다. 상기 고추열매 특이적-발현벡터가 바이너리벡터인 경우에는 Floral dip 방법 (Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journal)에 따라 식물체를 형질전환시키고, 트랜잭트 발현벡터인 경우에는 입자 충격(Particle bombardment) 방법(Lacorte et al., 1997, Plant Cell Reports)에 따라 식물체를 형질전환시킬 수 있다. 본 발명의 고추열매 특이적발현벡터는 쌍자엽 혹은 단자엽 식물, 유성생식 혹은 무성생식 식물에 상관없이 어떤 식물체도 형질전환 시킬수 있으나, 본 발명에서는 그 예로서 고추식물의 형질전환만을 실시하였다.
- <22> 고등 식물에서 과민반응 (hypersensitive response, HR)은 병원체 감염에 대항하는 방어반응의 효율적인 형태중의 하나이다. 부강 고추 식물체 (*Capsicum annuum* cv. Bugang)는 담배 모자이크 바이러스 (Tobacco mosaic virus, TMV) 병원형 P₀에 의한 감염에 대해 과민반응을 나타낸다. TMV 및 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv)에 대항하는 방어 기작과 관련 있는 유전자를 분리하기 위해 마이크로어레이 (5 K 칩)분석을 수행하였다. 이러한 처리에 의해 차등 조절된 클론들에 있어서, RNA-blot 분석은 UDP-글루코실트랜스퍼라제 (UDP-glucosyltransferase)를 코딩하는 CaUGT1 유전자가 TMV 및 Xcv 감염에 의해 증가 조절되었다는 것을 나타내었다.
- <23> CaUGT1 유전자가 바이러스-유도 유전자 억제 (virus-induced gene silencing, VIGS)에 의해 고추에서 발현이 녹다운 (knocked-down)될 때, 고추식물의 발병-관련 단백질 5 (*Capsicum annuum* pathogenesis-related protein 5, CaPR-5) 유전자도 역시 감소 조절되었고 과민반응이 지체되었다. 추가적으로, CaUGT1 유전자는 고추에서 잎, 줄기, 뿌리, 및 꽃이 아니라 고추열매에서만 발현되었다. CaUGT1 유전자가 고추열매에서 발현 억제될 때, 열매가 익는 것 (ripening)도 또한 지체되었다. 이로 미루어볼 때, 이러한 결과는 열매 특이적 유전자 즉, CaCGT1은 고추에서 방어반응과 성숙과정 둘 다와 관련됨을 시사한다.
- <24> 더욱이, CaUGT1 유전자의 프로모터를 고추 Genome Walker library에서 분리하였고, 이 프로모터의 구성요소들 (elements)을 분석하였다. auxin-, gibberellin-, ABA-, SA-, ethylene-, MeJA-, 및 elicitor-responsive elements를 포함하는 많은 구성요소들이 있다. 이러한 결과는 이 프로모터들이 방어-관련된 유전자들에 포함되는 대부분의 구성요소를 가지는 것을 나타낸다. CaUGT1 프로모터는 GUS reporter gene을 가진 pBI101 T-DNA 벡터에 위치하였고, 프로모터 활성 분석을 수행하였다. CaUGT1의 프로모터는 몇몇 열매에서 pBI121 T-DNA 벡터와 유사한 높은 활성을 나타내었다. pBI121 T-DNA 벡터는 양성 대조군으로써 사용된 CaMV 35S promoter를 포함한다.
- <25> UDP-글루코실트랜스퍼라제는 새로운 연구에서 잘-연구된 효소중의 하나이다. 각각 자기자신의 공여체 (donor), 수용체 (acceptor) 및 결합 특이성 (linkage specificity)을 가지는 많은 글루코실트랜스퍼라제가 있는 것으로 알려져 있다. 생물학적 관점으로부터, 이러한 글루코실트랜스퍼라제의 연구는 박테리아 독성에서 포유동물의 발달 (development)까지의 범위에서 새로운 해석을 내리기 시작하였다. 더욱이, 치료 상의 표적으로써 그들의 잠재적 역할 뿐만 아니라 질병의 병인학(etiology)에서 글루코실트랜스퍼라제에 의해 수행되는 역할은 또한 높이 평가되고 있다 (Dennis et al., 1999). 글루코실트랜스퍼라제는 PSI-BLAST 서열분석과 substrate/product stereochemistry 둘 다를 기초로 하여 서로 다른 47 families에서 분류되어 왔다 (Campbell et al., 1998). 글루코실트랜스퍼라제 반응은 활성화된 당 공여체 (sugar donor)에서 당류 (saccharide), 단백질 (protein), 지질 (lipid), DNA 또는 저분자 수용체 (small molecule acceptor)로 단당류 (monosaccharide)의 이동 (transfer)을 포함한다 (Bill et al., 1998).

- <26> 고추식물에서는, 감염되지 않은 상태에서 열매-특이적으로 발현되는 UDP-글루코실트랜스퍼라제의 단일 카피수가 있다. 식물이 TMV 또는 Xcv와 같은 외부 침입자에 의해 감염될 때, 발병 저항성의 pathways에서 몇몇 signal molecules는 축적되기 시작하고, 병원체 저항성 유전자는 활성화되기 시작한다 (Delaney et al., 1994; Penninckx et al., 1996, 1998; Dong, 1998; Glazebrook, 2001). 이러한 종류의 과정은 downstream PR 유전자 또는 몇몇 결정적인 병원체 저항성 유전자를 활성화하도록 유도한다. CaUGT1이 억제된 RT-PCR 결과는 CcUGT1이 CaPR-5의 upstream에 있는 것과 CaPR-5의 발현 수준을 조절한다는 것을 보여준다. 이전의 보고에서는, PR-5 단백질은 항곰팡이 활성 (antifungal activity)을 가지는 것으로 나타났다 (Vigers et al., 1992). 이 family의 members는 또한 병원체 감염 동안 역시 유도되며, 이러한 PR-5 member의 매우 높은 수준의 발현은 또한 HR과 관련되어 있을 것이라고 알려져 있다 (Van Loon and Van Strien, 1999; Madge Y. Graham, 2005). CaUGT1의 억제는 CaPR-5를 또한 억제하여 TMV에 대한 낮은 식물-병원체 저항성을 초래할 수 있다. 이는 HR에 직접적 또는 간접적으로 영향을 미치는 것으로 보이며 TMV 복제 역시 그러하다.
- <27> 열매 익음(fruit ripening)은 물리적, 생화학적 변화가 동시에 일어나는 발달 과정 (developmental process)이다. 이러한 변화는 열매 착색 (pigmentation), 물러짐 (softness), 및 당 (sugar)과 아로마 (aroma)의 축적을 포함한다 (Giovannoni, 1993). CaUGT1이 억제된 식물의 열매 표현형은 CaUGT1이 열매 숙성과 관련되어 있다는 것을 나타낸다. 이전 연구에서는, thaumatin-like protein (TLP) (PR-5 family)은 고추열매가 익는 동안에 축적된다고 보고되었다 (Kim et al., 2002). 고추 thaumatin-like protein (CaPR-5)는 곰팡이에 감염되었을 때 발현되며, 이러한 감염이 없는 정상시에는 붉은색 열매로 변화한 후의 열매의 당 축적에 관여한다. RNA blot 분석은 CaUGT1이 녹색 열매와 붉은색 열매에서 모두 발현한다는 것을 나타낸다. 고추 thaumatin-like protein이 단지 붉은색 열매에서만 발현한다는 점을 감안한다면, CaPR-5 유전자는 고추열매에서도 CaUGT1에 의해 역시 조절될 수 있다고 예상된다. 결과적으로, CaUGT1 유전자는 고추 열매에서 기능하면서 한편으로는 열매의 당 축적하는 기능을 하는 CaPR-5 유전자를 조절하면서 당 축적에도 관여할 것으로 추정된다. 그러나, CaUGT1이 억제된 열매 표현형의 단지 약 10%만이 부분적으로 녹색을 나타내었다. 이것은 CaUGT1이 열매 착색 (pigmentation)에 기능을 하는 것이 아니라 열매 숙성 (fruit development)의 다른 부분에서 기능을 할 것임을 나타낸다.
- <28> sense 와 antisense 방향 (orientation) 둘 다로 CaUGT1 유전자를 발현시킨 유전자 도입된 고추식물은 CaUGT1이 식물에서의 바이러스 병원체에 대한 방어 또는 열매 숙성에서 기능을 하는 메커니즘을 밝히기 위해서 반드시 필요하다.
- <29> 유전자 발현은 프로모터에 의해 조절되기 때문에, 프로모터의 분석은 유전자 발현의 프로파일링 (profiling)을 연구하는데 중요하다. CaUGT1의 프로모터 부위를 분리하였고, cis-acting 조절요소 (cis-acting regulatory elements)를 분석하였다. CaUGT1 유전자의 프로모터는 SA-, MeJA-, ethylene 반응성 요소로써 병원체와 관련있는 몇몇 cis-action 조절요소를 포함하였다. CaUGT1 유전자의 열매 특이적인 발현 형태를 확인하기 위해, 몇몇 열매에 사용된 particle bombardment 실험을 이용하였다. CaUGT의 프로모터는 CaMV 35S 프로모터를 포함하는 pBI121 T-DNA 벡터와 같이 높은 활성을 나타냈다. 고추식물에서 전사조절 (transcriptional regulation)과 관련된 프로모터의 기능적 부위를 이해하기 위해, 유전자 도입된 식물은 고추식물과 MicroTom 식물에서 제조되어야 한다.
- <30> 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.
- <31> 실시예 1. Preparation of total RNA (RNA 추출)
- <32> 1 g의 식물조직을 액체질소에 얼리고 균질화한 후 10 ml의 RNA추출 용액 (0.2 M Tris-Cl, pH 8.0, 0.4 M LiCl₂, 25 mM EDTA, pH 8.0 and 1% SDS)를 첨가하여 잘 섞는다. 10 ml의 아쿠아페놀을 첨가 후 오래 섞고 20분 동안 4 °C 10,000g 조건 하에서 원심 분리한다. 상층액을 10ml의 클로로포름이 담긴 tube로 옮겨 잘 섞은 후 20분 간 4 °C 10,000g 조건 하에서 원심 분리한다. 상층액을 에탄올을 이용하여 RNA를 침전시킨다. 침전물을 75% 에탄올로 씻은 후 2 M LiCl₂에 녹인 후 재 침전시키고 침전물을 DEPC가 처리된 물에 용해시킨다.
- <33> 실시예 2. Probe labeling (방사선 동위원소 probe 제작)
- <34> differential screening으로 얻어진 cDNA 클론들이 probe로 사용되었다. probe제작에 PCR을 이용한 방법이나 random priming을 이용한 방법이 사용되었다. PCR에 사용된 혼합물에는 template (100 ng), 250 μM dATP, dGTP and dTTP, 50 μM dCTP, T7 primer (10 pM), T3 primer (10 pM), [α-³²P]-dCTP (3000 Ci/mM) and Taq

polymerase (Bioneer, Korea)이 포함되었다. PCR은 처음에 95 °C에서 2분의 조건으로 그 이후에 95 °C에서 30초, 45 °C에서 30초, 72 °C에서 40초의 조건으로 30회를 마지막으로 72 °C에서 5분의 조건으로 작동되었다. random priming으로 사용되는 template는 10분 동안 끓여진 후 재빠르게 얼음에 보관되었다. 그 후에 Klenow polymerase (Boehringer Mannheim, Germany)를 제외한 모든 구성물들이 37 °C에 5분 간 보관되었다. Klenow polymerase를 첨가한 후 37 °C에서 30분 간 배양하였다. 방사선동위원소로 표시된 probe들은 QIAquick nucleotide removal kit (QIAGEN, USA)에 의해 정제 되었다. 마지막으로 probe를 pH 8.5인 50 mM Tris-Cl용액에 용해시킨다. Hybridization 실험을 하기 위해서는 방사선동위원소로 식별되는 probe를 5분 간 끓는 물에서 denaturation시킨 후 얼음에 재빨리 옮겨서 사용한다.

<35> 실시예 3. Promoter isolation (promoter 분리)

<36> Universal Genome WalkerTM Kit (CLONTECH, USA)과 유전자에 특이적으로 작용하는 primer (GSP) 1과 2를 사용하여 CaUGT1의 promoter 부위가 분리되었다. CaUGT1의 두 개의 유전자에 특이적으로 작용하는 primer는 5'-AAGGCCTTTCGAAGCGAGCGTTTAGCAAG-3'과 5'-CAAGAAAGGCATGAACGAGTGCACCCTCAC-3'이다. Web Signal Scan Program: PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) & PlantCARE (<http://sphinx.rug.ac.be:8080/PlantCARE/>)을 이용하여 promoter를 분석하였다.

<37> 실시예 4. Northern blot hybridization & analysis

<38> Northern blot 분석을 위해서 Ausubel et al. (1995) 방법을 따라 RNA를 추출하였다. 15 µg의 RNA를 6% 포름알데히드와MOPS 용액 (pH 7.0)이 포함된 1.0% 아가로스 젤에서 전기영동 한 후 nytran plus membrane으로 옮겼다. RNA 분석은 각 처리마다 3번에서 4번씩 반복 실험되었다. 이미 보고된 프로토콜 (Church and Gilbert, 1984)에 따라 hybridization이 수행되었고 membrane들은 상온에서 2× SSC 용액으로 10분 간 2번씩 씻어냈으며 상온에서 0.1× SSC과 0.1% SDS이 혼합된 용액으로 65 °C에서 5분 간 씻어냈다. Membrane을 살짝 말린 후 X-ray 필름이나 BAS-2500 phosphorimager (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)로 감광하여 관찰되었다.

<39> 실시예 5. Particle bombardment

<40> Protocol of Maliga (1995)의 방법에 따라 금 조각 (1.0 µm)에 DNA를 코팅하고 PDS-1000/He device (Bio-Rad Laboratories, Inc.)을 사용하여 실험이 수행되었다. 보통 500-1000 µg의 금 조각과 1.25-2.5 µg의 DNA가 한 번의 bombardment 실험에 사용되었다. 금 조각으로코팅 된 DNA들은 1100 압력 하에 6이나 9cm의 거리에서 열매 또는 잎의 표피세포에 쏘아졌다. 금 조각으로 코팅 된 DNA들이 쏘아진 열매와 잎들은 동일한 감광도와 온도 조건에서 24시간 동안 배양되었다.

<41> pBI101과 pBI121, 두 개의 플라스미드 벡터 (plasmid vector)가 프로모터 활성도 분석 (promoter activity analysis) 실험을 하는데 사용되었다. pBI101 플라스미드 (Clontech Co.,USA)는 약 10 kb 크기로 β-glucuronidase (GUS)라는 reporter gene을 가지고 있으며, 또한 NOS promoter에 의해 발현되는 neomycin-phosphotransferase (NPT)라는 selectable marker gene이 존재한다. CaUGT1의 전체 길이의 프로모터를 GUS 유전자의 발현을 조절할 수 있는 pBI101의 HindIII-SalI의 효소작용 부위에 삽입하여 재조합벡터 pBI101::CaUGT1를 재조합하였다 (도 6). pBI121 플라스미드는 CaMV 35S 프로모터의 조절 하에 GUS가 존재하며 NPT 유전자와 NOS 프로모터를 내포한다.

<42> Jefferson et al. (1987) by Klimaszewska et al. (1997) 에서 사용된 GUS 반응 용액 (50 mM Na₂HPO₄ and NaH₂PO₄, pH 7.0 10 mM K₃[Fe(CN)₆], 10 mM K₄[Fe(CN)₆], 10 mM Na₂EDTA, 0.1% (v/v) Triton-100, 1.5 mM X-Glucuronide)을 사용하여 열매에 흡입시킨 후 담그고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 100% 에탄올을 이용하여 색소를 모두 제거하였다. 일시적인 GUS 발현이 X-Gluc에 의해 탐지되었다. 파랑 색으로 변색된 열매는 GUS-positive로 간주되었다.

<43> 실험결과 1. Tissue-specific expression of CaUGT1

<44> 고추식물의 여러 기관에서 CaUGT1의 정상 상태 전사 수준을 시험하기 위하여, total RNA를 붉은색 (ripe)과 녹색 (unripe) 고추열매, 새로난 잎과 오래된 잎, 뿌리, 줄기, 및 꽃으로부터 추출하였다 (도 1). CaUGT1의 3' untranslated region (UTR)을 CaUGT1 유전자의 특이적 프로브(probe)로써 사용하였다. CaUGT1 유전자의 전사체는 녹색 고추열매와 붉은색 고추열매에서 아주 많이 축적되었다. 그러나, 상기 전사체는 뿌리, 줄기, 꽃, 및 잎에서는 사실상 없었다 (도 1).

<45> 실험결과 2. CaUGT1 유전자의 프로모터 부위의 분리

<46> 우선, 고추식물로부터 추출된 genomic DNA를 사용하여 adaptor-ligated genomic DNA fragments (referred as Genome walker libraries)를 구성하였다 (도 2). CaUGT1 유전자의 프로모터 부위를 찾아내기 위해, 유전자 특이적 프라이머와 adaptor 프라이머를 사용하였으며, CaUGT1 유전자의 프로모터 부위를 Genome Walker library에서 찾았다. 약 1968 bp인 CaUGT1 유전자의 프로모터를 분리하였다 (도 3). CaUGT1 유전자의 프로모터는 살리실산-반응성 요소 (SA-responsive element), 에틸렌-반응성 요소 (ethylene-responsive element), MeJA-반응성 요소 (MeJA-responsive element), 상처-반응성 요소 (wound-responsive element), 곰팡이-반응성 요소 (fungal-responsive element), 및 myb 전사 factor의 binding box (binding box of myb transcription factor)를 가진다 (도 4).

<47> 실험결과 3. particle bombardment를 이용한 열매에서의 CaUGT1 프로모터 활성의 분석

<48> 고추열매에서 CaUGT1 프로모터의 활성을 조사하기 위해, 프로모터의 full region을 GUS reporter 유전자를 가지는 pBI101 T-DNA 벡터 (도 6)에 넣었다. 열매에서 프로모터 활성의 분석을 위해, 열매를 pBI101::CaUGT1 또는 pBI121로 코팅된 골드 입자로 쏘았다. pBI121 T-DNA 벡터가 35S::GUS 융합 유전자를 포함하기 때문에, 식물-유래 35S::GUS 유전자의 발현 수준은 열매조직에서 항상 높았다 (도 5). 이는 CaMV 35S 프로모터 없이 단지 GUS 유전자만 가지는 T-DNA 벡터로부터 주어진 GUS 활성의 발현수준과는 명백하게 다르다. 접종 24시간 후 열매조직은 1X-Gluc solution으로 진공-침윤되었고 (vacuum-infiltrated), 열매조직을 100% 에탄올에 담가 놓았다. pBI121 플라스미드가 도입된 열매조직은 GUS-양성으로 확인되는 파란색을 나타내었다. 또한, CaUGT1 프로모터가 도입된 열매조직은 같은 활성 또는 양성 대조군보다 더 높게 나타났다 (도 5).

<49> 참고문헌

References

- Abel, S., Theologis, A. (1994) Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts; A versatile experimental system to study gene expression. *Plant J.* 5: 421-427.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Stahl, K. (1995) *Short Protocols in Molecular Biology*; Wiley, NY.
- Bangsgaard, L., Fuglsang, A.T., Jahn, T., Korthout, H.A., de Boer, A.H., Palmgren, M.G. (1998) Developmental and Stress Regulation of RCI1A and RCI2B, Two Cold-Inducible Genes of Arabidopsis Encoding Highly Conserved Hydrophobic Proteins. *Plant J.* 13: 661-671.
- Bayer, M.H. (1982) Genetic tumors: physiological aspects of tumor formation in interspecies hybrids. In *Molecular Biology of Plant Tumors* (Kahl, G. and Schell, J., eds). New York: Academic Press: 33-67.
- Bill, R.M., Revers, L., Wilson, I.B.H. (1998) *Protein Glycosylation*. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Boss, P.K., Davies, C., Robinson, S.P. (1996) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* 111: 1059-1066.
- Boukema, I.W. (1982) Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hbn. is governed by an allele of the L-locus. *Capsicum Newsl.* 3: 47-48.
- Boukema, I.W. (1982) Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* in *Capsicum* L. *Euphytica* 29: 433-439.
- Brederode, F.T., Linthorst, H.J.M., Bol, J.F. (1991) Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Mol. Biol.* 17: 1117-1125.
- Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., Henricsson, B. (1998) A classification of nucleotide-diphosphate-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 329:719.
- Chang, C., Shockey, J.A. (1999) The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 352-358.
- Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Bulgum, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Holm, T., Deng, J.L., Wang, X., Zhu, T. (2002) Expression Profile Matrix of Arabidopsis Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. *Plant Cell* 14: 559-574.
- Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17: 7151-7160.
- Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A.L. (2000) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of

<50>

- action and clinical importance. *J. Cell Biochem.* 34: 40-51.
- Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A.L. (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays* 22: 442-451.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8, 1793-1807.
- Dangl, J.L., Jones, J.D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- David, S.J., Westra, R.D. (1996) Soluble derivatives of green fluorescent protein (GFP) for use in *Arabidopsis thaliana*. *Weeds World* 3: 43-48.
- Delaney, T.P., Ulmes, S., Vervoort, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negroto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J. (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250.
- Dempsey, D.A., Shah, J., Klessig, D.F. (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 547-575.
- Dennis, J.W., Granovsky, M., Warren, C.E. (1999) Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays*. 21(5): 412-421.
- Dodge, A.D. (1994) Herbicide action and effects on detoxification processes; In *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. New York; CRC Press.
- Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 316-323.
- Dong, X., Mindrinos, M., Davis, K.R., Ausubel, F.M. (1991) Induction of *Arabidopsis* Defense Genes by Virulent and Avirulent *Pseudomonas syringae* Strains and by a Cloned Avirulence Gene. *The Plant Cell* 3: 61-72.
- Dunner, J., Shah, J. Klessig, D.F. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 266-274.
- Ecker, J.R. (1995) the ethylene signaltransduction pathway in plants. *Science* 268: 667-675.
- Fedoroff, N.V., Furtak, D.B., Nelson, O.E. (1984) Cloning of the bronze locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable controlling element activator (Ac). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3825-3829.
- Finley, D., Chau, V. (1991) Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 25-69.
- Finley, D., Varshavsky, A. (1985) The ubiquitin system: function and mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 10: 343-346.
- Ford, C.M., Boss, P.K., Hoj, P.B. (1998) Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize Bronze-1 locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vivo. *J. Biol. Chem.* 273: 9224-9233.
- Galan, J.E., Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.

- Giovannoni, J. (1993) Molecular biology of fruit developmental and ripening. In: J. Bryant (Ed.) Methods in Plant Molecular Biology, Academic Press, New York, 253-287.
- Glazebrook, J. (2001) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. 2001 status. Curr. Opin. Plant Biol. 4: 301-308.
- Graham, M.Y. (2005) The Diphenylether Herbicide Lactofen Induces Cell Death and Expression of Defense-Related Genes in Soybean. Plant Physiol. 2005 Nov 18. preview.
- Green, T.R., Ryan, C.A. (1972) Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves. Science 175: 776-777.
- Greenberg, J.T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol. 48: 525-545.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell 8: 1773-1791.
- Harborne, J.B., and Williams, C.A. (1988) Flavone and flavonol glycosides. In The Flavonoids, J.B. Harborne, ed. London, Chapman and Hall: 303-328.
- Hammer, S.L., Hogenesch, J.B., Strömme, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A. (2000) Orchestrated Transcription of Key Pathways in Arabidopsis by the Circadian Clock. Science 290: 2110-2113.
- Hedden, P., Kamiya, Y. (1977) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol. 48: 431-460.
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. Annu. Rev. Biochem. 67: 425-479.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 20;6(13): 3901-7.
- Jin, X., Zhang, L., Lou, M. (2001) Hepatocyte targeted DNA carrier L-PEI: the lactosylated polyethylenimine and transfection in vitro. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 15(4):345-348.
- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J.C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95: 4997-5002.
- Kawai-Yamada, M., Jin, L., Yoshinaga, K., Hirata, A., Uchimiya, H. (2001) Mammalian Bax-induced plant cell death can be downregulated by overexpression of Arabidopsis Bax inhibitor-1 (AtBI-1). Proc. Natl Acad. Sci. USA 98: 12295-12300.
- Kim, Y.J. Hwang, B.K. (2000). Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. Physiol Plantarum 108: 51-60.
- Kim, Y.S., Park, J.Y., Kim, K.S., Ko, M.K., Cheong, S.J., Oh, B.J. (2002) A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. Plant Mol Biol. 49(2): 125-135.
- Klimaszewska, K., Devantier, Y., Lachance, D., Lehi, M.A., Charest, P.J. (1997) Larix laricina (tamarack) somatic embryogenesis and genetic transformation. Can. J. For Res. 27: 538-550.

- Lacomme, C., Santa, Cruz, S. (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96: 7956-7961.
- Lee, H.I., Raskin, I. (1999) Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* 274: 36637-36642.
- Lee, S., Kim, S.Y., Chung, E., Joung, Y.H., Pai, H.S., Hur, C.G., Choi, D. (2004) EST and microarray analyses of pathogen-responsive genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) non-host resistance against soybean pustule pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). *Funct. Integr. Genomics* 4: 196-205.
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P. (2002) Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31(6): 777-786.
- Mackenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B., Bock, K.W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D.W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J.R., Ritter, J.K., Schachter, H., Tephly, T.R., Tipton, K.F., Nebert, D.W. (1997) The UDP glucosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7(4): 255-269.
- Maliga, P. (1995) Biolistic transformation of tobacco cells with nuclear drug resistance genes. In: Maliga, P., Kleissig, D.F., Cashmore, A.R., Gruissem, W., Varner, J.E. (eds) *Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 37-54.
- Martin, R.C., Mok, M.C., Mok, D.W. (1999) Isolation of a cytokinin gene, ZOG, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 284-289.
- Medina, J., Catala, R., Salinas, J. (2001) Developmental and Stress Regulation of RCI2A and RCI2B, Two Cold-Inducible Genes of Arabidopsis Encoding Highly Conserved Hydrophobic Proteins. *Plant Physiol.* 125: 1655-1666.
- Memelink, J., Liriohorst, H.J.M., Schilperoort, R.A., Hoge, J.H.C. (1990) Tobacco genes encoding acidic and basic pathogenesis-related proteins display different expression patterns. *Plant Mol. Biol.* 14: 119-126.
- Mich'ele, C. Heath (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.
- Moebs, C.P., Allen, P.V., Friedman, M., Belknap, W.R. (1997) Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant J.* 11: 227-236.
- Ozkeynak, E., Finley, D., Solomon, M.J., Varshavsky, A. (1987) The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J.* 6: 1429-1439.
- Park, C.J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G.J., Yoo, J.S., Paek, K.H. (2002) Introduction 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., Shin, R., Park, J.M., Lee, G.J., Yoo, T.H. Paek, K.H. (2001) A hot pepper cDNA encoding a pathogenesis-related protein 4 is induced during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Mol.*

- Cells 28: 122-127.
- Park, J.M., Park, C.J., Lee, S.B., Ham, B.K., Shin, R., Paek, K.H. (2001) Overexpression of the tobacco Tsil gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* 13: 1035-1046.
- Park, M.H., Wolff, E.C. (1988) Cell-free synthesis of deoxyhypusine. Separation of protein substrate and enzyme and identification of 1,3-diaminopropane as a product of spermidine cleavage. *J. Biol. Chem.* 263: 15264-15269.
- Park, M.H., Lee, Y.B., Joe, Y.A. (1997) Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol. Signals* 6: 115-123.
- Penninckx, I.A., Eggenmont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblaux, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M., Broekaert, W.F. (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., Broekaert, W.F. (1998) Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 2103-2114.
- Reichel, C., Maas, C., Schulze, S., Schell, J., Steinbiss, H.H. (1996) Cooperative binding to nucleic acids by barley yellow mosaic bymovirus coat protein and characterization of a nucleic acid-binding domain. *J. Gen. Virol.* 77: 587-592.
- Roig, P., Gil, M.L., Martínez, J.P., Gozalbo, D. (2000) Molecular cloning and characterization of the *Candida albicans* UEB gene coding for a ubiquitin-hybrid protein. *Yeast* 16: 1413-1419.
- ROSS, A.F. (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14: 340-358.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willis, M.G., Molina, A., Steiner, H.V., Hunt, M.D. (1996) Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chung, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W., Staskawicz, B.J. (1996) Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* 274: 2063-2065.
- Sepúlveda, P., Cervera, A., López-Ribot, J.L., Chaffin, W.L., Martínez, J.P., Gozalbo, D. (1996) Cloning and characterization of a cDNA coding for *Candida albicans* polyubiquitin. *J. Vet. Med. Mycol.* 34: 315-322.
- Shin, R., Lee, G.J., Park, C.J., Kim, T.Y., You, J.S., Nam, Y.W., Paek, K.H. (2001) Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a proteinase inhibitor gene. *Plant Science* 161: 727-737.
- Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J.M., Al-Niem, T., Dyer, W.E., Ho, T.D., Qu, R. (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci.* 155: 1-9.

- Smith, H.H. (1972) Plant genetic tumors. *Prog. f.x.p. Tumor Res.* 15: 138-159.
- Smith, H.H. (1988) The inheritance of genetic tumors in *Nicotiana glauca* hybrids. *J. Heredity* 79: 277-283.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., Tonelli, C. (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* 24: 743-755.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Metraux, J.P. (1997) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.
- Szerszen, J.B., Szczepkowski, K., Bandurski, R.S. (1994) *iaaH*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* 265: 1699-1701.
- Tai, H.L., Chen, C.C., Yeh, K.T. (1999). Xanthogranulomatous cystitis associated with anaerobic bacterial infection. *J. Urol* 162: 795-796.
- Van Loon, L.C., Gerritsen, Y.A.M., Ritter, C.E. (1987) Identification, purification and characterization of pathogenesis-related proteins from virus-infected Samsun NN tobacco leaves. *Plant Mol. Biol.* 9: 593-609.
- Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V. (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Reporter* 12: 245-264.
- Van Loon, L.C., 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.
- Vigers, A.J., Wiedemann, S., Roberts, W.K., Legrand, M., Selitrennikoff, C.P., Fritig, B. (1992) Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Sci.* 83: 155-161.
- Wernecke, D.C., Baltrusch, M., Buck, F., Woker, F.P., Heinz, E. (1997) UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: Cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.* 35: 597-603.
- Yamazaki, M., Gong, Z., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Tanaka, Y., Kusumi, T., Saito, K. (1999) Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. *J. Biol. Chem.* 274: 7405-7411.
- Yang, Y., Shah, J., Klessig, D.F. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11(13): 1621-39.
- Yoo, T.H., Park, C.J., Lee, G.J., Shin, R., Yim, J.H., Kim, K.J., Rhee, K.H., Paek, K.H. (2002) A hot pepper cDNA encoding ascorbate peroxidase is induced during the incompatible interaction with virus and bacteria. *Mol. Cells* 14: 75-84.

<55>

발명의 효과

<56>

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 고추식물의 방어반응과 고추열매의 숙성에 관여하는 UDP-글루코실트랜스퍼라제를 조절하는 그의 프로모터를 분석함으로써, 고추열매 특이적 발현을 하는 UDP-글루코실트랜스퍼라제의 발현을 증가시킬 수 있게 되었으며, 본 발명의 프로모터를 포함하는 재조합백터를 이용하여 고추열매에 특이적으로 발현시키기 원하는 목표유전자를 삽입하여 새로운 형질전환 식물체를 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

<1>

도 1은 노던 블롯(northern blot) 분석에 의한 다양한 고추식물 기관에서 CaUGT1의 발현 형태를 나타낸다. 레인: R, 뿌리; S, 줄기; L, 잎; F, 꽃; GF, 녹색 열매 (unripe); RF, 붉은색 열매 (ripe). ethidium bromide-염색된 겔에서 28S 와 18S rRNA 밴드는 loading control로 나타난다.

<2>

도 2는 유용한 프로모터를 찾기 위한 방법의 흐름도이다.

<3>

도 3은 CaUGT1 프로모터 부위의 뉴클레오타이드 서열이다. CaUGT1 프로모터의 길이는 5'region과 ATG 번역 개시 코돈 (굵은 글자)을 포함하는 1968 bp 이다.

<4>

도 4는 식물 CaUGT1 프로모터 부위에서 시스-작용 조절 DNA 요소들(cis-acting regulatory DNA elements)을 나타낸다. 숫자는 CaUGT1 번역 시작 site로부터의 거리를 지시한다. SA-, ethylene-, MeJA-, ABA- 및 wound-responsive는 그것의 반응성 요소들을 각각 지시한다. Myb binding site는 box와 결합하는 myb 전사 factor를 지시한다. 또한, Box-W1은 fungal elicitor responsive site를 지시한다.

<5>

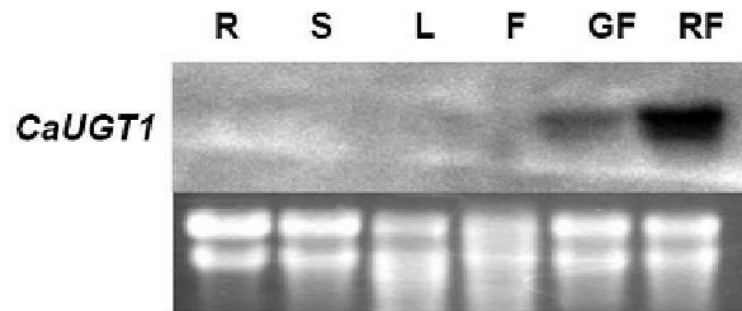
도 5는 입자 충격(particle bombardment) 실험을 이용하여 열매에서 CaUGT1 프로모터 활성의 분석을 나타낸다. 입자 충격 실험용으로 당근, 양파, 및 고추열매를 사용하였다. CaUGT1 프로모터를 pBI101 T-DNA 벡터에 GUS reporter 유전자와 함께 주입하였다. CaMV 35S 프로모터를 포함하는 pBI121 T-DNA 벡터를 양성대조군으로 사용하였다.

<6>

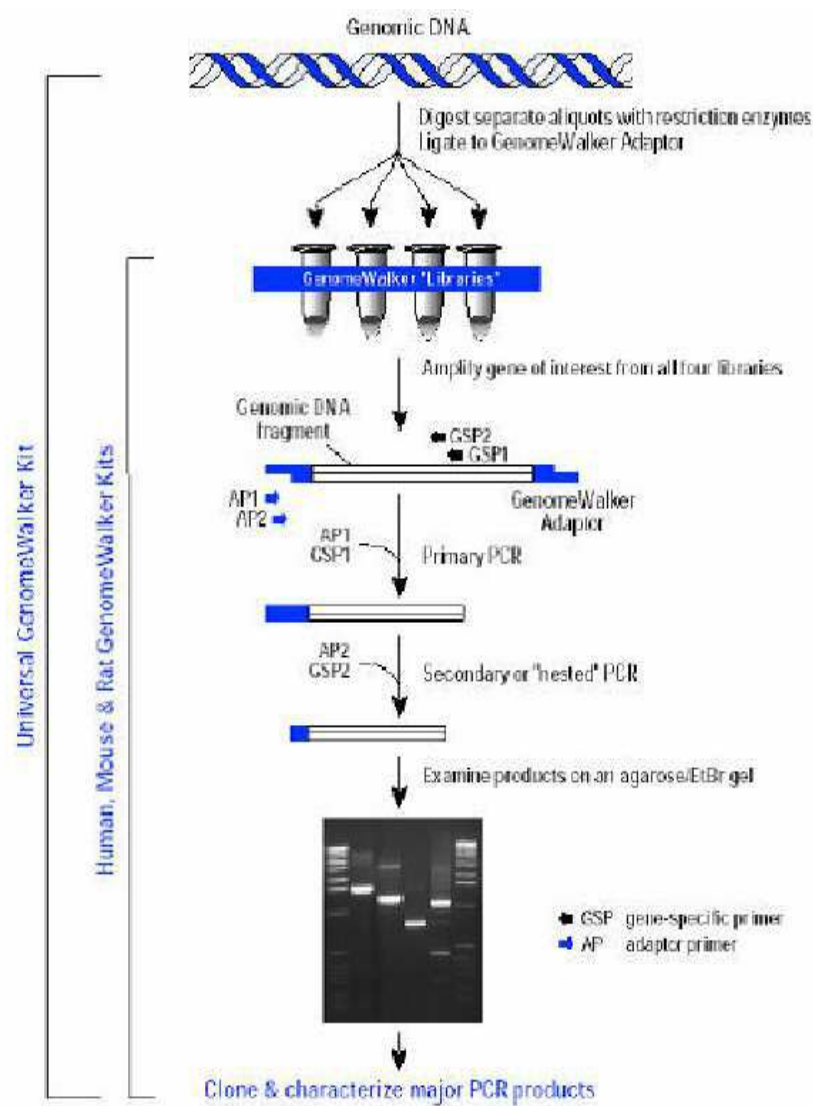
도 6은 PBI101::CaUGT1 벡터의 계열지도이다.

도면

도면1



도면2



도면3a

CCTCATTCTCATTTTGGATCGTAACATGATATGAGGATCCAACACCTTCTT
TATCTTCCTCACGTTCCCTTGGTATAAACCACAGTATGATCCTTAACTTTTA
ATACCTCGTTGCATGAAACCACCAATTCTGTCTGTCGCCTCATTCTGGAAG
GGATCAAACCTTTGGAAATCCTTCTGGATATGAAATAAAGAGTGCAGCATCG
TGCTTTGACAACTTCTTCGATGGTTGTTGTTTTATTCTTATTTTTAGGAC
CCAACATTTCAAACACAGAAGTTCTTGTGGTTGATTCTCTAAGTCGATCAA
ATACGAAGGGTCTTTTATAATGACAGTGGATTCTTTTTCGATGGTGATGTA
ATTATTGACTGCCTTTCTTATGGATATGCGAATTGGAGGTGGTTGTGCATA
TCCTAGTCCTTCACATTCTTTCTTAGTTTTACCCTTCGACGAAATTTTTCC
CAACCTTGATGGCTCATTAGGATTGTATCCAGCCTTTACAAATAACTTATA
TGCATTTGGATCAAAGCCCTCTTTTGTACACTTCATAGGGAGTGCCATATC
TTATGGAAAATTTTGAGCCACAGATTCTCTAAGTGGCCTTGAGGATTGATT
TGTTACTTCAACCTTCCTGATAGGTAAAGTTAACCCCTTTATCACATTATC
TTGGGCATTAGGTGAGTGATTTTCTCTTTCTTTACCTTTGGCATGTAGCAA
AGAATAGGAGATGTCTTCTTTTCATAGGAGCGACTCTTCTTTATTTCGAA
GTAAAGAAGGGCTTCATGTTGTGAATTTTTTGTAGTCACCTTGACCTTCT
TAGATGCAAGATCGTCACACTTGGTCTTGGTGACATCTTCAATCCTTTTCT
CATCTACAATATGATTCTTTAAGTAGAATTTTGCATCGGCAAAAATGTGAC
TCAGCTTCAGTAAATGGCTTGTATCGGCGACTATCATTCTTTCCACTTCG
TTTTTGAGGCACTTCAAGCATTGATAGTAAGAGGACGAGATAATTTTGTTT

도면3b

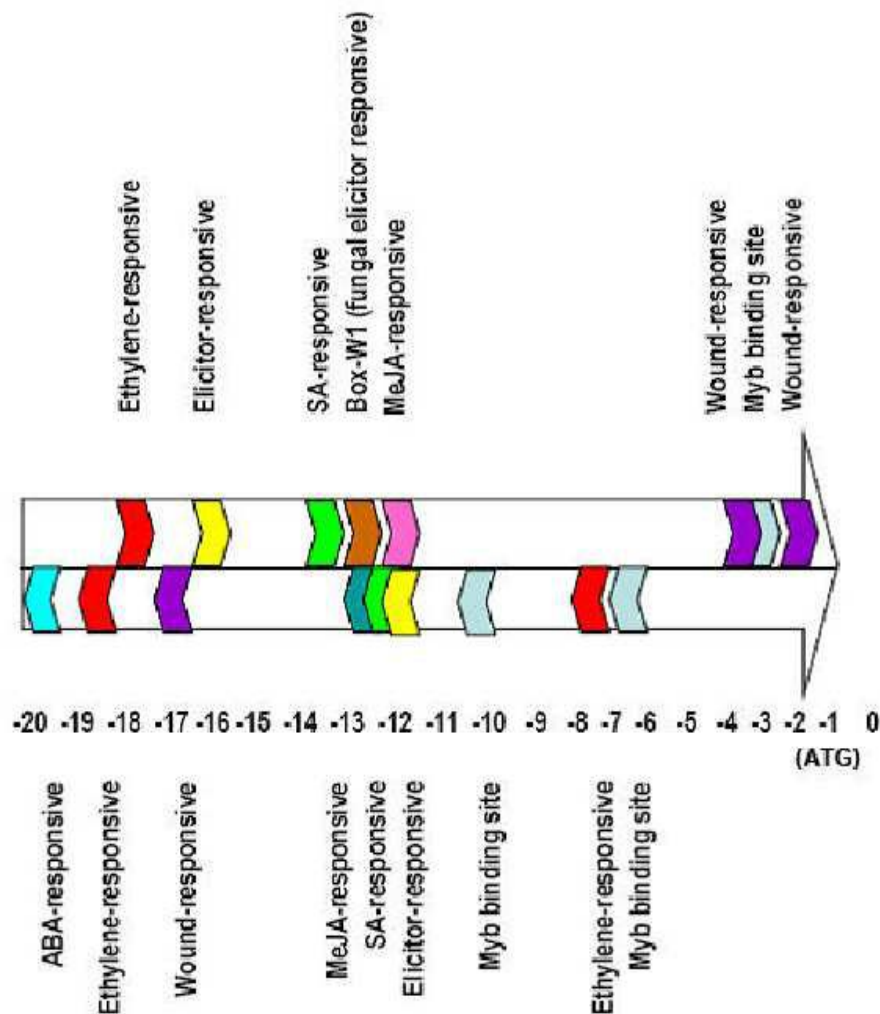
AAGAAATACATTATATAAATTTTTAGCATTGATCACATGCATCAATAGGTT
TGA CTGAAAATCATCCATACTAATCCCCAACTTCATACATCCTATGGGCCT
CTGGCCCTCGGCCCCCTTGGTTGAATACTTGGATCATTATATGGCTTTTGT
CCAGTTTGCCAGTAGCGATACCAAGATCTTTCCTCGTACGGATAGGCAGGA
TATTGACTCCAGATCCCTCATCTATCAATATTCTATTGATCTTCTTTCCTA
GAATTTGATCCACCAAGTATAAAGGACAGTTATGTAGGGTCTCACCAAGCA
AAAAATCGTTATTTGTGAATGTGATTTTTGTATCACCACATGTGCCTCTTT
GGTCTATTGGAAATAGCCTCTCAACTTCTTCAGAGGTAGTGGTATGGACTG
TGTACATCTTACCCTCCCCAAACCCCACTTTGTGGGAATACACTAGGTTTG
TCGTTGTTGTTATTATTGTTGTACACATGTGCCTCTTTGCCAAGAGTTTCA
GCCAGCCTTT

도면3c

```

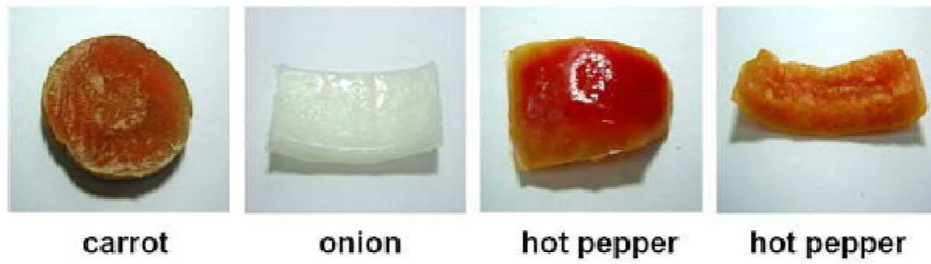
TGAAAGATGAAAGAACTTTCATGGGTATATTCTCACCCCTTGCCCCCTTC
TTTAGCGGTATTAAAAACAAGACACCTCAAGGTTGACTTGGGCAGTCTTT
CCATGGAACCTAACTCGGTAAGAATTCTCTCTAAAGTCATCGGACACCGAG
GTTCTGATGGTGAAGCTCTGTTACCCCTTGCTCTCTTTGTAAGTTCAAC
CAACTTCTGTTAGTATAGCCGAGCAAAAGTCAGATTCAAGTATATCTCA
ATTTCTTCTCTTTTATTTAAGCCAAACAAAAGTTGATTCAAGTAATCCG
ATTCCTCACTTTTATTATTTATTATAATAACCAATAACCAAATCCAAC
TATTCTCTCTCCTATTGTGTTCCCTAGCTGCTTCTTCACTAATTTCTT
TTTTCAAAAAAGAATG
    
```

도면4



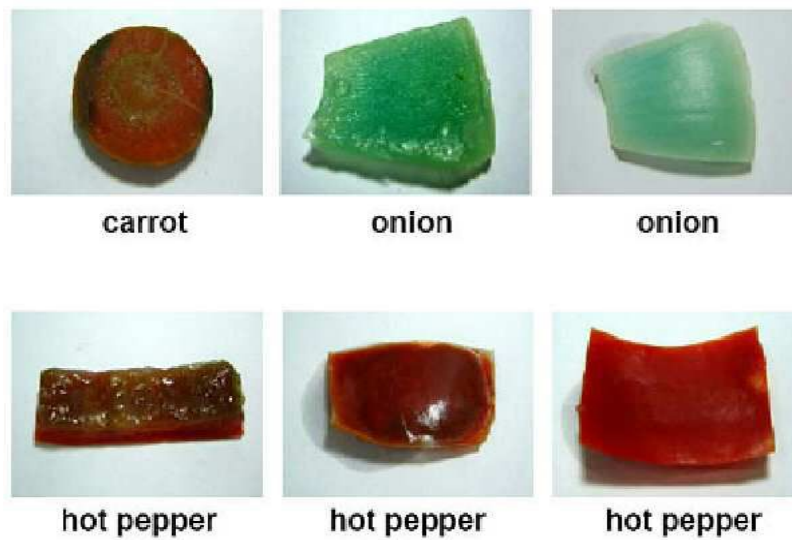
도면5a

Negative control



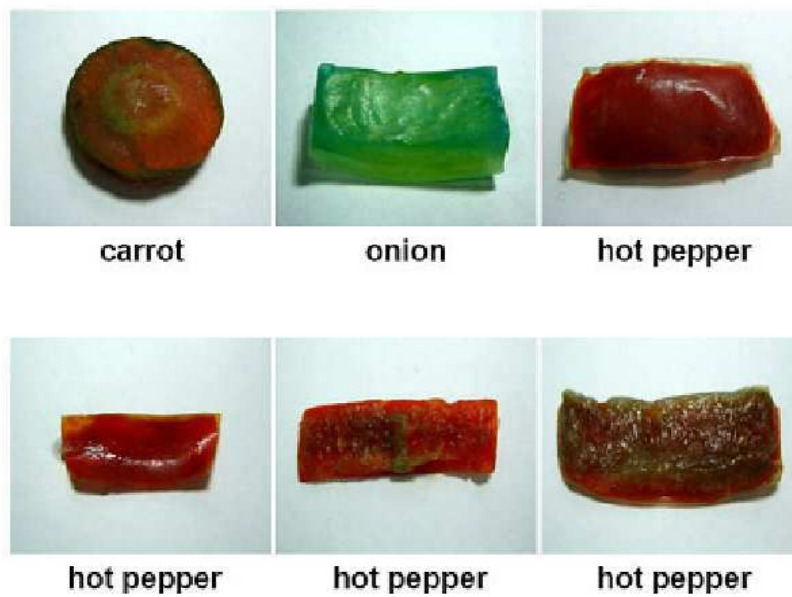
도면5b

Positive control

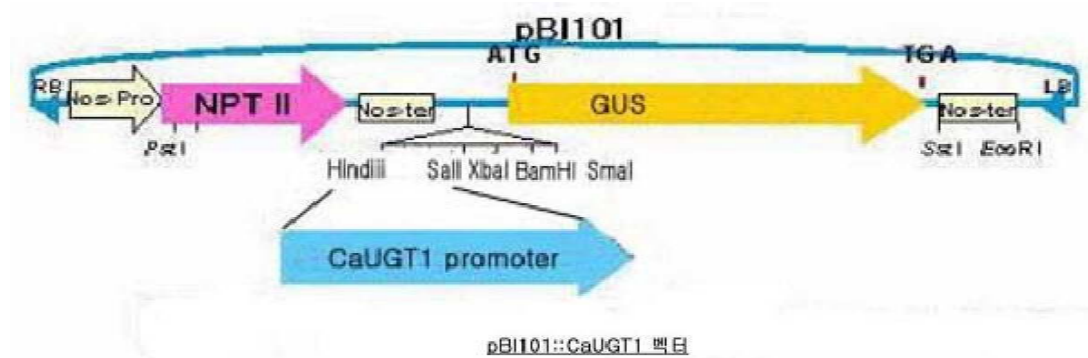


도면5c

CaUGT1 promoter::GUS



도면6



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)