(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0085630
(43) 공개일자 2011년07월27일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0005510
(22) 출원일자 2010년01월21일
심사청구일자 2010년01월21일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
황병국
서울특별시 서초구 서초1동 1641-1 서초삼성래미안 Apt 103동1405호
이동혁
서울특별시 성북구 안암동2가 139-1 실로암 302호
(74) 대리인
김선애

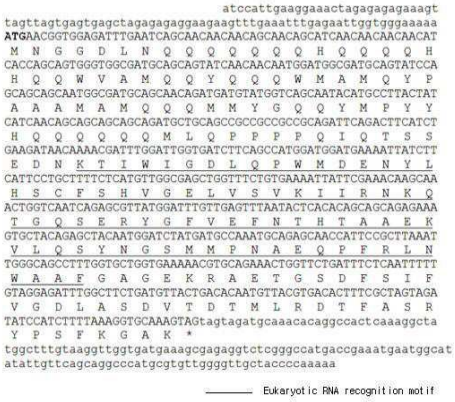
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 병 저항성 관련 고추 RNA 바인딩 프로테인 유전자 CaRBP1 및 이를 이용한 형질전환 식물체

(57) 요 약

본 발명은 신규한 병 저항성 관련 고추 RNA 바인딩 프로테인 유전자 (*CaRBP1*: *Capsicum annuum RNA binding protein 1*, 서열번호 1) 및 이를 이용한 병저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용한 식물체의 병 저항성 탐색방법도 제공한다. 상기한 본 발명에 의하면, 식물체 병원균의 저항성반응의 표지 및 병저항성 식물체의 분자적 육종을 위한 유전재료를 제공할 수 있고, 식물병 저항성 등의 탐색을 촉진할 수 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

식물병 저항성 관련 유전자로서 고추 유래 RNA 바인딩 프로테인을 코딩하는 하기 (a) 또는 (b)의 분리된 유전자 (*CaRBP1*):

(a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자;

(b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(CaRBP1).

청구항 3

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항 기재의 유전자 또는 제3항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 5

식물체로부터 mRNA 분리하여 제1항 기재의 *CaRBP1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 식물체는 고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균을 접종한 식물체인 것을 특징으로 하는 식물체의 병저항성 탐색방법.

청구항 7

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체에 병저항성을 부여하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물병 저항성에 관련된 신규 유전자인 고추 RNA 바인딩 프로테인 유전자 (*CaRBP1*: *Capsicum annuum RNA binding protein 1*), 및 이를 이용한 생물적(biotic) 스트레스 저항성 탐색방법과 병저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 고추식물의 세균병인 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주와 비병원성 균주에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되는 식물병 저항성 관련 신규 유전자인 *CaRBP1* 유전자의 염기서열 및 그에 따른 아미노산 서열을 제공하며, 이를 이용하여 병원성이나 비병원성 병원균 접종 시 저항성 관련 유전자 *CaRBP1*의 차별적인 발현여부를 확인하는 식물체의 병저항성 탐색방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 고추 식물에서 바이러스 유도 유전자 침묵(VIGS, virus-induced gene silencing) 기술을 이용하여 상기 *CaRBP1* 유전자의 발현을 억제시키거나, 상기 *CaRBP1* 유전자를 고추 식물에 아그로박테리움 매개 일시적 발현(*Agrobacterium*-mediated transient expression) 방법을 이용하여 도입하거나 모델 식물인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에 형질전환 시킴으로서 *CaRBP1* 유전자의 발현 증가를 유도시켜서 이 유전자의 식물체 병저항성 증대 역할을 확인하여, 이를 통한 식물병 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물은 생활사 동안에 다양한 병원체에게 침해를 받는다. 식물은 정상적인 생장 및 번식을 위하여 다양한 형태의 효과적인 방어관련 기작을 가지고 있다. 이와 같은 방어관련 기작들은 식물의 저항성을 증진시킴으로서 식물의 생존에 중요한 수단이 된다. 그러므로 지금까지 알려져 있지 않은 식물 생체 내 방어 관련 기작을 규명하는 것은 경제적으로 작물생산량 증대를 위해 중요한 역할을 할뿐만 아니라 학문적으로는 새로운 과학기술의 축적을 가능하게 한다. 특히 식물방어관련 기작동안에 특이적으로 유도되는 유전자의 정보 및 기능에 대한 규명은 새로운 저항성 작물의 육종을 위한 중요한 자원으로 사용될 수 있다.

[0003] 대표적인 가지과 작물로서 고추(*Capsicum annuum L.*)는 남아메리카 원산의 작물로서 열대와 온대지방에서 널리 재배된다. 고추의 최초 도입에 대해서는 정확히 알려져 있지 않지만 고추가 우리나라에 도입된 이후에 식생활에 매우 큰 영향을 끼쳤다. 특히 고추는 한국에서 가장 많이 재배되는 원예작물의 한가지로서 농업경제에 있어서 매우 중요한 작물이다. 이러한 고추식물에서 바이러스병, 세균병, 진균병 등이 다양하게 보고되어 있으며 실제로 병 발생에 의한 생산량 감소가 빈번히 일어난다. 그러나 현재까지 효과적인 병 저항성 작물은 보고되어 있지 않으며 식물보호를 위해서 화학적 방제에 의존적이다. 그러므로 전통적인 육종을 이용한 새로운 저항성 작물 개발을 위한 노력의 단점을 보완 할 수 있는 생명공학적 기법을 이용한 효과적인 방어관련 유전자의 분리 및 형질전환 식물의 제작은 생산비 절감을 통한 농가소득의 증대효과 및 친환경시대에 맞는 고품질 청정작물의 생산을 가능하게 하며 이와 연계된 다양한 산업의 활성화에 기여 할 수 있다.

[0004] 한편, 대부분의 식물의 유전자는 DNA로 존재하며 이와 같은 유전자들은 그 특성에 따라서 구조적으로 발현되거나 외부의 자극에 의해서 발현된다. 이때 유전자의 발현은 생체 내에서 전사기작을 통해서 DNA 염기서열을 원본으로 하여 이와 상응하는 RNA가 만들어 진다. 이후에 RNA의 번역과정을 통해서 최종적으로 단백질의 형태로 만들어지고 다양한 생체내의 생화학적 대사에서 사용된다.

[0005] 식물에서도 언급한 바와 동일한 기작을 통하여 생체내의 대사가 일어난다. 전사과정 동안에 생성된 RNA는 다양한 RNA 바인딩 프로테인(RNA binding protein; RBP) 에 의해서 RNA의 이동 및 단백질 생성을 위한 번역과정이 조절된다. 식물의 방어관련 기작동안에도 여러 가지 RNA 바인딩 프로테인(RNA binding protein)이 합성되며 이렇게 생성된 단백질들은 특이적인 RNA와 상호작용 함으로서 다양한 방어관련기작을 조절하며, 대표적으로 기주세포의 병원체 인식, 세포벽의 캘로스(callose) 집적, 활성산소 증가, 피토알렉신 (phytoalexin) 과 같은 항균성 물질 생성, 국부적 세포 죽음을 통한 과민성 반응, 병방어 관련 단백질 생성 등이 있다. 이를 위한 전사과정 동안에 생성된 RNA를 조절함으로서 정상적인 방어반응이 일어날 수 있도록 한다. 대표적인 모델식물로서 애기장대에서 알려진 대표적인 RNA 바인딩 프로테인인 GRP7은 세균성 흑반병원균(*Pseudomonas syringe* pv. *tomato DC3000*)의 이펙터(effector)와 상호작용을 하여 저항성을 증가시킨다는 것이 최근 연구를 통하여 보고되었다.

[0006] 그러나 아직 고추식물에서는 방어반응 동안에 유도되는 RNA 바인딩 프로테인에 대해서 알려진 것이 거의 없다. 그러므로 식물내의 전사를 조절함으로서 방어반응을 조절하는 RNA 바인딩 프로테인에 관한 연구는 매우 각광받는 분야로서 특히 식물병 저항성 반응에 관여하는 RNA 바인딩 프로테인에 대한 연구 및 그 기능을 증명하는 것은 고추식물의 병저항성 기작을 이해하는데 중요한 역할을 하며 병저항성 형질전환 식물체 제작을 위한 주요한 유전자원을 제공하는데 기여할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자의 하나인 고추 RNA 바인딩 프로테인(RNA binding protein1)을 코딩하는 *CaRBP1* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 상기 *CaRBP1* 유전자를 이용하여 식물병에 대한 저항성 존재 여부를 탐색하는 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0009] 더 나아가, 본 발명은 상기 *CaRBP1* 유전자를 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제작하는 데 그 목적이 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 상기 목적은, 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광 고추 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)으로부터 분리한 신규 저항성 관련 유전자 *CaRBP1*을 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 병원균 처리를 통하여 *CaRBP1*의 발현 여부를 조사하고, 고추식물과 이 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaRBP1* 유전자의 식물병 저항성 유도 기능을 확인하여 달성하였다.

[0012] 따라서 본 발명은 식물병 저항성 관련 유전자로서 고추 유래 RNA 바인딩 프로테인을 코딩하는 (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자 또는 (b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자(*CaRBP1*)를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 RNA 바인딩 프로테인(CaRBP1)을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 제조한 재조합 벡터 및 형질전환 식물체를 제공한다.

[0015] 나아가 본 발명은 식물체로부터 RNA 분리하여 *CaRBP1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성을 탐색하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 상기 *CaRBP1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체에 병 저항성을 부여하는 방법을 제공한다.

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

[0018] 먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 Bv5-4a 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxygenin)으로 표지하여 프로브(Probe)를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용한 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization) 과정을 수행하여 병저항성과 관련이 있을 것으로 예상되는 클론을 선별하였다. 이 클론들 중 RNA 바인딩 프로테인 유전자로 밝혀진 유전자의 염기서열을 해독(Sequencing)함으로써, *CaRBP1*로 명명된 고추 녹광 품종의 RNA 바인딩 프로테인(CaRBP1) 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그로부터 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).

[0019] 보다 구체적으로 본 발명에 의한 상기 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트(Blast) 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 CaRBP1 단백질 코딩 유전자를 확인하고 RNA 바인딩 프로테인(*CaRBP1*) 유전자로 명명하였다. CaRBP1 단백질은 아미노산 서열의 비교결과 RNA 바인딩 프로테인에서 전형적으로 나타나는 RNA 인식 부위(recognition motif)를 가지고 있었다. 담배(*Nicotiana plumbaginifolia*)의 RNA 바인딩 프로테인47 유전자(accession no. CAC_01238)와는 단백질 수준에서 87 %, 토마토(*Lycopericum esculentum*) 의 DNA 바인딩 프로테인 유전자 (accession no. AAR91698)와는 단백질 수준에서 76 %의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, nucleotide blast program). 확인된 *CaRBP1*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다. 그리고 다른 식물에서 *CaRBP1* 유전자가 보존되어 있는지 분석하기 위하여 계통분석을 실시하여 계통수(phylogenetic tree)로 나타내었다 (도 2).

[0020] 본 발명에 의한 CaRBP1 단백질은 RNA에 특이적인 결합 활성이 확인되었고(도 3 및 4 참조), 식물 세포의 핵에 위치한다(도 5 참조).

[0021] 다음에, 본 발명은 생물적 처리를 한 식물체로부터 RNA 분리하여 *CaRBP1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균 등 병원균을 예로 들 수 있다. 상기 *CaRBP1* 유전자 발현 여부 확인은 노던 블럿, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 본 발명에 의한 *CaRBP1* 유전자가 식물병원균에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 6 참조). 따라서 본 발명에 의한 *CaRBP1* 유전자는 식물체의 병저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기의 *CaRBP1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 고추식물에서 특이적으로 *CaRBP1* 유전자가 억제된 식물체의 제작하고, *CaRBP1* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물을 제작하여 식물병 저항성 생성여부를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다.

따라서 본 발명은 상기 *CaRBP1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체에 병 저항성을 부여하는 방법도 제공한다.

[0023] 보다 구체적으로 본 발명은 바이러스 유도 유전자침묵(불능화)기술(virus-induced gene silencing (VIGS))에 이용되어지는 TRV(Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaRBP1* 유전자를 TRV2 벡터(참고문헌: Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2:109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2::*CaRBP1*을 제작하였다. 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 *CaRBP1*의 발현이 억제된 VIGS 식물체를 제조하여 병감수성이 증대되는 것을 확인할 수 있었다 (도 9 내지 도 13 참조).

[0024] 나아가 본 발병에 의한 *CaRBP1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S::*CaRBP1*)를 고추 식물에 아그로박테리움 매개 일시적 발현(*Agrobacterium*-mediated transient expression) 시키거나 본 발명에 의한 *CaRBP1*이 과발현된 형질전환 애기장대 식물을 제조하여 식물병 저항성의 증대를 확인할 수 있었다 (도 7, 도 8, 도 14, 및 도 15 참조). 따라서 본 발명에 의한 고추 RNA 바인딩 프로테인의 기능을 불능화 시킨 고추 식물 및 RNA 바인딩 프로테인을 과발현 시킨 애기장대 식물에 대한 식물병원균에 대한 저항성 검정평가를 수행하여 병저항성 발생여부를 알아 볼 수 있게 되었다.

[0025] 상술한 바와 같이 본 발명으로 RNA 바인딩 프로테인의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 병생성 관련 단백질 (PR protein)의 유전자 정보를 축적할 수 있게 되어 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병저항성이 증진되는 생명공학적 식물을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0026] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 고추 식물 세균병인 고추 세균성 점무늬병에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자인 신규한 RNA 바인딩 프로테인을 코딩하는 *CaRBP1* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공함과 동시에, 이 유전자를 이용하여 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공할 뿐 아니라 저항성 식물 육종 및 형질전환 식물체 제작에 기여하는 효과를 도모할 수 있게 되었다.

[0027] 따라서 본 발명은 병저항성 식물체의 육종을 위한 재료를 제공할 수 있어 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있는 효과가 있으므로 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종 (*Capsicum annnuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 RNA 바인딩 프로테인(*CaRBP1*) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,

도 2는 고추 녹광 품종의 CaRBP1 단백질의 아미노산 서열을 이용하여 계통분석을 실시한 결과를 나타낸 도면이고,

도 3은 본 발명에 의한 CaRBP1 단백질의 RNA 결합 활성을 측정하기 위하여 CaRBP1 단백질을 대장균에서 발현시키고 Ni-NTA agarose 레진을 이용하여 순화한 결과를 보인 도면이고,

도 4는 본 발명에 의한 CaRBP1 단백질의 RNA 결합 활성을 측정한 도면이고,

도 5는 본 발명에 의한 CaRBP1 단백질에 그린플루오레센트 단백질을 퓨전하여 CaRBP1 단백질의 세포 내 위치를 나타낸 도면이고,

도 6은 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 및 비병원성 균주를 접종하였을 때 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 *CaRBP1* 유전자의 차별적 발현 결과를 나타낸 도면이고,

도 7은 재조합벡터 pBIN35S:*CaRBP1*과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여 고추 식물에서 *CaRBP1* 유전자를 과발현하였을 때 세포사멸이 유도되며 이때 CaRBP1 단백질이 과발현됨을 확인한 결과이고,

도 8은 재조합 벡터 pBIN35S:*CaRBP1*과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain

GV3101) 균주를 이용하여 유발되는 세포사멸로 인한 과산화수소 발생 및 전해질 유출을 측정한 결과를 보인 도면이고,

도 9는 바이러스-유도 유전자침묵(virus-induced gene silencing, VIGS)의 방법을 이용하여 *CaRBP1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 잎 조직에 접종하였을 때 병징의 발생과 세균의 생장을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 10은 본 발명에 의한 *CaRBP1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 감염 고추 잎 조직에서의 과산화수소 발생과 전해질 유출을 측정한 결과를 나타낸 도면이고,

도 11은 본 발명에 의한 *CaRBP1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 캘로스(callose) 집적, 과민성 반응에 의한 세포사멸과 이를 위한 활성산소 축적의 감소를 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 12는 본 발명에 의한 *CaRBP1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 살리실산 축적의 변화를 측정한 결과를 보인 도면이고,

도 13은 본 발명에 의한 *CaRBP1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, *CaRBP1* 의 효과적인 발현 억제와 저항성 관련 유전자의 차별적 발현을 나타낸 결과를 보인 도면이고,

도 14는 재조합벡터 pBIN35S:*CaRBP1*과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여 *CaRBP1* 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 *CaRBP1* 유전자가 과발현 되고, *CaRBP1* 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 균주 접종시 식물체 내에서 병원균 생장을 측정한 결과를 보인 도면이고,

도 15는 본 발명에 의한 *CaRBP1* 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 노균병 (*Hyaloperonospora parasitica* Noco2)에 대한 병저항성의 증가를 관찰한 결과를 보인 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0030] **[실시예 1] *CaRBP1* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정**

[0031] 고추 세균성 점무늬병에 대한 병저항성 관련 단백질 중 하나인 RNA 바인딩 프로테인(*RNA binding protein1*) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0032] 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성 세포사멸반응을 보이는 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.

[0033] 다음에, 이 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR(Polymerase Chain Reaction) 증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로부터 얻은 개개의 cDNA 클론들을 나이론막(Hybond N+)에 동일하게 흡착시킨 후, 각각 고추 세균성 점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxygenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하였다.

[0034] 하이브리다이제이션 결과를 분석하여 비병원성 균주가 접종된 식물체의 mRNA 프로브에 대해서 특이적으로 강하

게 증폭되어 발현되는 유전자를 병저항성에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 수득하였다.

[0035] 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 CaRBP1 단백질 코딩 유전자를 확인하고 RNA 바인딩 프로테인(*CaRBP1*) 유전자로 명명하였다. CaRBP1 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 RNA 바인딩 프로테인에서 RNA 바인딩 프로테인에서 전형적으로 나타나는 RNA 인식 부위(RNA recognition motif) 를 가지고 있었다. 담배 (*Nicotiana plumbaginifolia*)의 RNA 바인딩 프로테인47 유전자(accession no. CAC_01238)와는 단백질 수준에서 87 %, 토마토(*Lycopericum esculentum*) 의 DNA 바인딩 프로테인 유전자 (accession no. AAR91698)와는 단백질 수준에서 76 %의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, nucleotide blast program). 확인된 *CaRBP1*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다. 다음 다른 식물에서 *CaRBP1* 유전자가 보존되어 있는지 분석하기 위하여 계통분석을 실시하여 계통수(phylogenetic tree)로 나타내었다 (도 2).

[0036] **[실시예 2] CaRBP1 단백질의 RNA 결합 활성 측정**

[0037] 상기 실시예 1에서 수득한 CaRBP1 단백질의 RNA 결합 활성을 측정하기 위하여 다음과 같이 시험하였다.

[0038] **[단계 1]**

[0039] CaRBP1 단백질의 RNA 결합 활성 측정을 위해서 실시예 1에서 수득한 *CaRBP1* 유전자를 pET28a 벡터(Novagen)에 도입시켜 히스티틴(histidine)과 퓨전시켰다(His-CaRBP1). 이렇게 퓨전된 단백질을 Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 이용하여 발현시킨 후에 단백질을 Invitrogen사에서 제공하는 Ni-NTA Agarose 레진(Ni-NTA Agarose resin)을 이용하여 순화하였다(도 3).

[0040] **[단계 2]**

[0041] 순화된 His-CaRBP1 단백질을 이용하여 RNA 결합 활성을 측정하기 위하여 각각의 RNA 염기(poly U, polyG, poly G)가 결합되어 있는 리보호모폴리머 레진(ribohomopolymer resine)과 반응시켰다. 도 4에서 나타난 바와 같이 CaRBP1 단백질은 RNA 결합 활성을 보였다. 그러나 이중나선이나 단일나선 DNA가 결합된 레진(ds DNA, ss DNA resine)과 반응시켰을 때는 결합 활성을 보이지 않았다. RNA 결합 활성은 웨스턴 블롯 방법을 통해 측정되었으며 이때 히스티딘 항체와 GST 항체(GE Healthcare)를 사용하였다. GST 단백질은 대조구로서 사용되었다.

[0042] **[실시예 3] 식물 세포 내에서 CaRBP1 단백질 위치확인**

[0043] 상기 실시예 1에서 수득한 *CaRBP1* 유전자의 식물 세포 내에서의 위치를 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[0044] **[단계 1]**

[0045] 식물 세포 내에서 CaRBP1 단백질의 발현위치를 확인하기 위하여 실시예 1에서 수득한 *CaRBP1* 유전자의 3' 말단에 그린플루오레센트(GFP) 단백질을 퓨전(35S::CaRBP1:smGFP)시켰다(도 5). 입자총(Particle bombardment) 방법을 이용하여 퓨전 단백질을 양파표피세포에서 발현시킨 후 24시간 뒤 콘포컬(conforcal) 현미경을 이용하며 관찰하였다. 도 5에서 나타난 것처럼 CaRBP1 단백질이 핵에 위치하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색을 수행하여 핵에서의 CaRBP1 단백질의 존재여부를 확인하였다.

[0046] **[실시예 4] 병원균 접종에 의한 고추식물에서의 *CaRBP1* 유전자의 발현 탐색방법**

[0047] 상기 실시예 1에서 수득한 *CaRBP1* 유전자의 저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[0048] **[단계 1]**

[0049] 먼저 저항성 탐색 방법을 구체적으로 제시하기 위하여, 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 YN(Yeast- Nutrient) 배지에서 배양한 후, 10^8 cfu/mℓ의 농도로 6엽기의 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)의 3, 4엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 접종하고, 접종 후에는 28℃, 100% 상대습도 조건

에서 16시간 동안 습실 처리 하였다. 접종 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 접종된 3, 4엽을 샘플링하여 RNA를 추출하였다. 이렇게 추출한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

[0050] 다음으로 실시예 1에서 수득된 *CaRBP1* 유전자에 클레나우효소(Klenow enzyme)를 이용하여 동위원소가 붙은 a-^{32}P[dCTP] 을 표지한 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65℃로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다. 이렇게 동위원소를 이용하여 표지한 상기의 DNA 프로브는 나이론막(Hybond N+)에 붙어있는 mRNA에 결합하게 되고, 그 결과 이 나이론막 (Hybond N+) 상에 X-ray 필름을 얹게 되면 동위원소가 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 발현 유무와 정도를 알아볼 수 있게 하였다.

[0051] 상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩 (loading) 되었음을 확인하였다. 이상의 실험결과를 도 6에 나타내었으며 실험의 결과 *CaRBP1* 유전자는 병원성 균주와 비병원성 고추 세균성 점무늬병 접종 후 빠른 시간에 모두 발현이 시작되었고, 비병원성 균주를 접종하여 저항성 반응을 보이는 고추 식물에서 그 발현이 5시간 이후부터 크게 증가하고 증가된 RNA양이 지속, 유지되었다. 즉, 친화적 반응에서는 *CaRBP1* 유전자의 발현이 낮은 수준으로 지속되었으나, 불친화적 반응에서는 접종 후 5시간 이후부터 25시간까지 발현이 강하게 유지되었다.

[0052] **[실시예 5] *CaRBP1* 유전자 과발현에 의한 고추 식물의 병저항성 관련 세포사멸유도**

[0053] 고추식물에서 *CaRBP1* 유전자가 과발현 되었을 때 병에 대한 저항성을 위한 세포사멸 유도 여부를 확인하기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaRBP1* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN35S 벡터에 도입시켜 만든 재조합 벡터 pBIN35S:*CaRBP1*을 전기천공법(electroporation) 방법을 이용하여 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)에 도입하고 이를 고추 잎에 접종하여 *CaRBP1*을 과발현하는 고추식물의 병저항성 관련 세포사멸변화 여부를 관찰하였다.

[0054] **[단계 1]**

[0055] *CaRBP1*을 과발현하는 재조합벡터 (35S:*CaRBP1*)와 *CaRBP1*을 과발현하지 않는 대조구 벡터 (35S:00)를 이용하여 형질전환 시킨 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)를 흡광도(optical density) 600 (OD_{600}) 에서 1.0, 0.5, 0.1 농도로 고추 잎의 엽맥을 경계로 하여 각각 주사기로 침투 (infiltration) 접종하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이 접종 2일째부터 *CaRBP1*을 과발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium)*을 접종한 부위에서 세포사멸이 일어나기 시작하는 것을 관찰할 수 있었으며 이때 접종부위에 페놀계 물질의 축적이 일어나는 것을 자외선(UV) 하에서 관찰할 수 있었다. 세포사멸이 강하게 관찰되는 6일째 표현형과 이때 잎 조직에서 CaRBP1 단백질이 강하게 발현되는 것은 웨스턴블러팅을 통해서 확인하였다(도 7).

[0056] 접종 후 24시간, 48시간 후에 잎 조직에서 유출되는 전해질 양을 측정하여 세포사멸을 정량하였다. 대조구에 비해서 *CaRBP1*을 과발현 시킨 조직에서 유출되는 전해질이 크게 증가하였다(도 8). 또한, 병저항성을 위한 세포사멸의 신호전달 물질로 잘 알려진 활성산소의 발생량을 측정하기 위하여 자일레놀오렌지(xylenol orange)를 이용하여 과산화수소(H_2O_2)양을 정량하였다. 그 결과, *CaRBP1*을 과발현 하는 아그로박테리움(*Agrobacterium)* 균주를 접종한 부위에서 활성산소의 발생이 매우 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(도 8).

[0057] **[실시예 6] *CaRBP1* 유전자 발현의 억제에 의한 병저항성의 변화**

[0058] 고추식물에서 *CaRBP1* 유전자의 발현이 억제되었을 때 몇 가지 병 생성과 관련 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 변화를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaRBP1* 유전자를 고추식물에서 바이러스 유도 유전자 침묵(VIGS, virus-induced gene silencing)에 이용되어지는 TRV (Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaRBP1* 유전자를 TRV2 벡터(참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2::*CaRBP1*을 제조하였다. 이렇게 제조한 재조합벡터 TRV2::*CaRBP1*을 실시예 5와 동일한 방법으로 통해 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 도입하고 이렇게 형질전환된 GV3101 균주를 고추 유묘

(seedling)의 떡잎에 주사기 침투 방법을 사용하여 접종하여 고추식물에 도입함으로써 고추 생육동안 *CaRBP1* 유전자의 발현 억제를 유도시켰다.

[0059] [단계 1]

[0060] *CaRBP1*의 발현이 억제된 식물체에서 병원세균에 대한 저항성의 변화를 확인하기 위하여, 상기의 *CaRBP1* 유전자의 발현이 억제된 고추 식물과 TRV:00 벡터를 접종한 고추 녹광품종(대조구)에 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 고추 엽맥을 경계로 10^8, 10^7, 10^6 cfu ml^{-1} 의 농도로 접종한 후 각각 3, 6일 이후 접종 잎의 병징을 관찰하였다(도 9). 그리고 병원성 균주와 비병원성 균주를 5 x 10^4 cfu ml^{-1} 로 접종하여 접종 후 0, 3일에 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하였다(도 9). 병원성 균주 및 비병원성 균주를 10^7 cfu ml^{-1} 로 접종하여 접종 이후 12, 24시간 후에 실험구와 대조구의 방어반응과 관련된 캘로스(callose) 집적, 활성산소방출과 세포사멸을 각각 접종 후 시간이 경과함에 따른 과산화수소(H_2O_2) 발생량과 전해질 유출을 측정하였고(도 10) 접종 후 12, 24시간 후 아닐린 블루 염색, 댑 염색과 트리판 블루 염색을 통해 관찰하였다 (도 11). 또한, 병원균을 10^7 cfu ml^{-1} 로 접종하여 접종 이후 1, 2일 후에 실험구와 대조구의 감염 잎에서 살리실산(salicylic acid, SA)을 추출하여 정량하였으며 RNA를 추출하여 리얼타임 알티-피시알 (real time RT-PCR)을 통해 *CaRBP1*의 특이적인 유전자 억제 효과와 함께 병 접종시 대조구 식물과 비교하여 병저항성 관련 유전자의 발현 차이를 알아보았다 (도 12).

[0061] 도 9에서와 같이 VIGS로 *CaRBP1*의 발현이 억제된 식물에서 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 접종 후 병징을 관찰한 결과, 병원성 균주 접종 시에는 대조구와 비교하였을 때 차별적인 병징이 관찰되지 않았으나 비병원성 균주 접종시 대조구 식물에서 저항성 반응으로 국부적 세포사멸이 강하게 일어나지만 *CaRBP1* 유전자의 발현이 억제된 식물에서는 세포사멸이 감소하는 것이 관찰되었다. 마찬가지로 감염조직에서 병원성균과 비병원성균의 세균 생장을 측정한 결과 대조구에 비교하여 *CaRBP1*의 발현이 억제된 식물에서 더 많은 비병원성균의 세균생장을 나타내었으나 병원성균의 세균생장은 차이를 보이지 않았다(도 9). 그리고 *CaRBP1* 이 억제된 식물에서는 비병원성 균주 접종 시 일어나는 방어반응을 위한 캘로스(callose) 집적, 활성산소 발생 및 과민성 세포사멸이 매우 감소하는 것이 관찰 되었다(도 10 및 11). 또한, 살리실산은 *CaRBP1*의 발현이 억제된 식물이 비병원성 균주에 감염되었을 때 축적양이 매우 감소하였으며(도 12), 리얼타임 알티-피시알 실험 결과, *CaRBP1*이 억제된 식물에서 비병원성 균주에 감염되었을 때 강하게 발현되는 *CaRBP1* 유전자의 발현이 특이적으로 감소하는 것이 관찰되었고, *CaBPR1, CaDEF1* 과 같은 저항성 관련 유전자의 발현이 감소하였다(도 13).

[0062] **[실시예 7] *CaRBP1* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 *CaRBP1* 유전자의 과발현에 의한 애기장대 식물의 병 저항성의 변화**

[0063] 모델식물로 사용되는 애기장대 식물체에서 *CaRBP1* 유전자의 과발현시 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaRBP1* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN3S 벡터에 도입시켜 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S::*CaRBP1*을 실시예 5와 동일한 방법을 통해 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 도입하고 이 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물에 도입함으로써 형질전환 시켜서 *CaRBP1* 유전자의 과다발현을 유도시킨 후 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0064] [단계 1]

[0065] 상기와 같이 *CaRBP1*이 과발현된 식물에 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)균주를 접종하고 세균의 생장을 관찰하였다. *CaRBP1*이 과발현된 식물과 과발현하지 않는 야생형 대조구 식물에서 세균생장은 차이를 보이지 않았다(도 14).

[0066] 도 14에서 #3, #6, #7은 사용된 형질 전환 식물의 계통번호를 나타낸다.

[0067] [단계 2]

[0068] *CaRBP1*이 과발현된 식물에, 애기장대에서 노균병을 일으키는 하이알로페로노스포라 파라시티카 Noco2(*Hyaloperonospora parasitica* Noco 2)를 접종한 후 병저항성의 변화를 관찰하였다. 파종 후 7일째, *CaRBP1*이 과발현된 식물과 과발현하지 않는 야생형 대조구 식물의 떡잎에 하이알로페로노스포라 파라시티카 Noco2를 5 x

10^4 spores/ml 의 농도로 분무접종 하였다. 접종 후 17℃의 온도에서 습실 처리하였다. 그 결과 도 15에 나타난 바와 같이, *CaRBP1*을 과발현하는 형질전환 애기장대 식물에서 저항성이 증가되어 노균병원균의 분생자경 및 포자형성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0069] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

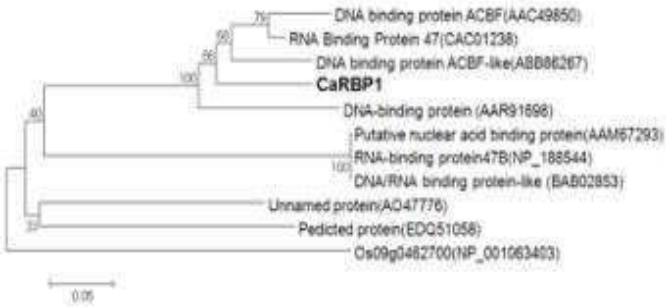
도면

도면1

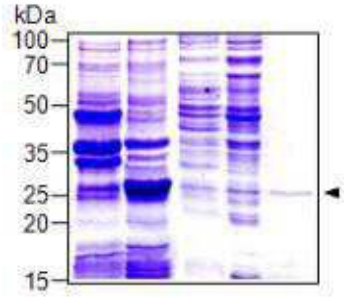
```
                                   atccattgaaggaaactagagagagaaagt
tagttagtgagtgagctagagagaggaagaagtttgaaatttgagaattggtgggaaaaa
ATGAACGGTGGAGATTTGAATCAGCAACAACAACAGCAACAGCATCAACAACAACAACAT
 M  N  G  G  D  L  N  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  H  Q  Q  Q  Q  H
CACCAGCAGTGGGTGGCGATGCAGCAGTATCAACAACAATGGATGGCGATGCAGTATCCA
 H  Q  Q  W  V  A  M  Q  Q  Y  Q  Q  Q  W  M  A  M  Q  Y  P
GCAGCAGCAATGGCGATGCAGCAACAGATGATGTATGGTCAGCAATACATGCCTTACTAT
 A  A  A  M  A  M  Q  Q  Q  M  M  Y  G  Q  Q  Y  M  P  Y  Y
CATCAACAGCAGCAGCAGCAGATGCTGCAGCCGCCGCCGCCGCAGATTCAGACTTCATCT
 H  Q  Q  Q  Q  Q  Q  M  L  Q  P  P  P  P  Q  I  Q  T  S  S
GAAGATAACAAAACGATTTGGATTGGTGATCTTCAGCCATGGATGGATGAAAATTATCTT
 E  D  N  K  T  I  W  I  G  D  L  Q  P  W  M  D  E  N  Y  L
CATTCCTGCTTTTCTCATGTTGGCGAGCTGGTTTCTGTGAAAATTATTCGAAACAAGCAA
 H  S  C  F  S  H  V  G  E  L  V  S  V  K  I  I  R  N  K  Q
ACTGGTCAATCAGAGCGTTATGGATTTGTTGAGTTTAATACTCACACAGCAGCAGAGAAA
 T  G  Q  S  E  R  Y  G  F  V  E  F  N  T  H  T  A  A  E  K
GTGCTACAGAGCTACAATGGATCTATGATGCCAAATGCAGAGCAACCATTCCGCTTAAAT
 V  L  Q  S  Y  N  G  S  M  M  P  N  A  E  Q  P  F  R  L  N
TGGGCAGCCTTTGGTGCTGGTGAAAAACGTGCAGAAACTGGTTCTGATTTCTCAATTTTT
 W  A  A  F  G  A  G  E  K  R  A  E  T  G  S  D  F  S  I  F
GTAGGAGATTTGGCTTCTGATGTTACTGACACAATGTTACGTGACACTTTCGCTAGTAGA
 V  G  D  L  A  S  D  V  T  D  T  M  L  R  D  T  F  A  S  R
TATCCATCTTTTAAAGGTGCAAAGTAGtagtagatgcaaacacaggccactcaaaggcta
 Y  P  S  F  K  G  A  K  *
tggctttgtaaggttggtgatgaaagcgagaggtctcgggccatgaccgaaatgaatggcat
atattgttcagcaggcccatgcgtgttggggttgctaccccaaaaa
```

———— Eukaryotic RNA recognition motif

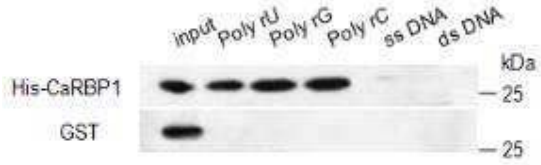
도면2



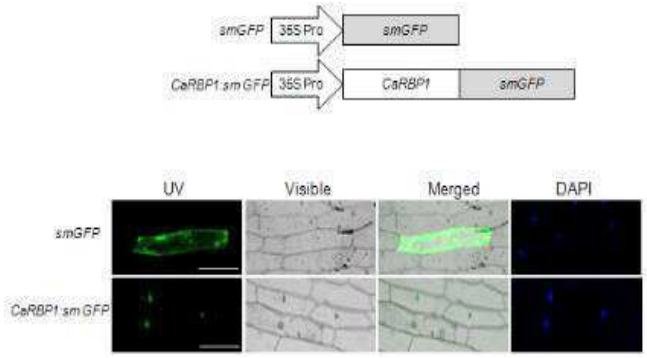
도면3



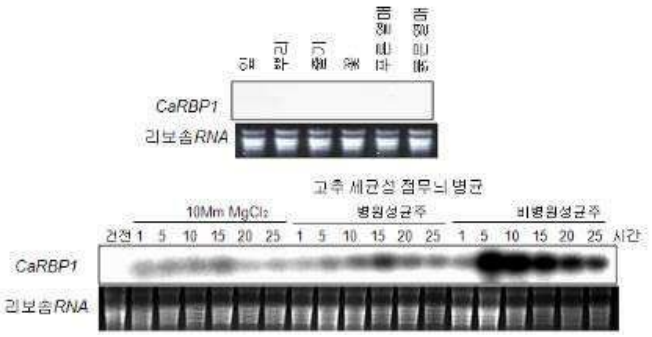
도면4



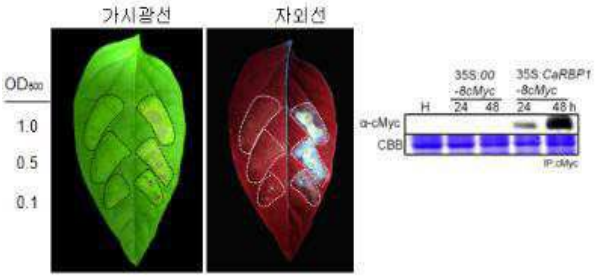
도면5



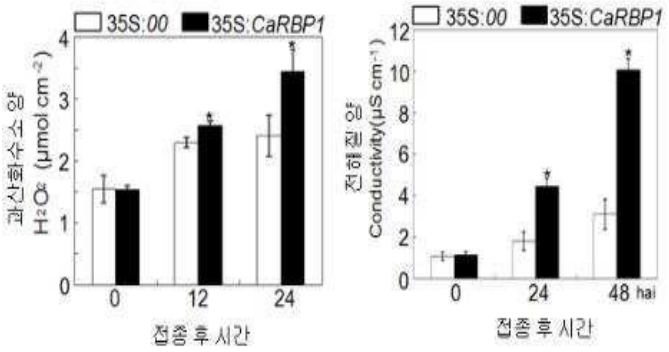
도면6



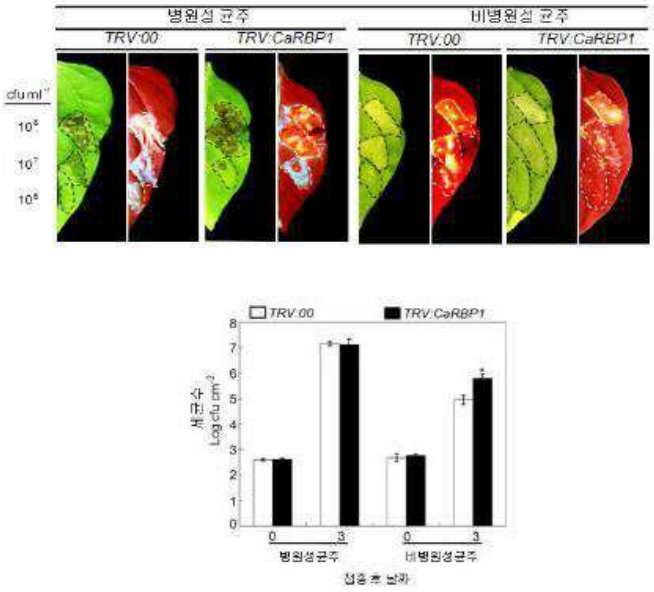
도면7


가시광선
자외선
OD600
1.0
0.5
0.1
35S:00 -8cMyc
35S:CaRBP1 -8cMyc
H
24
48
24
48 h
α-cMyc
CBB
IP:cMyc

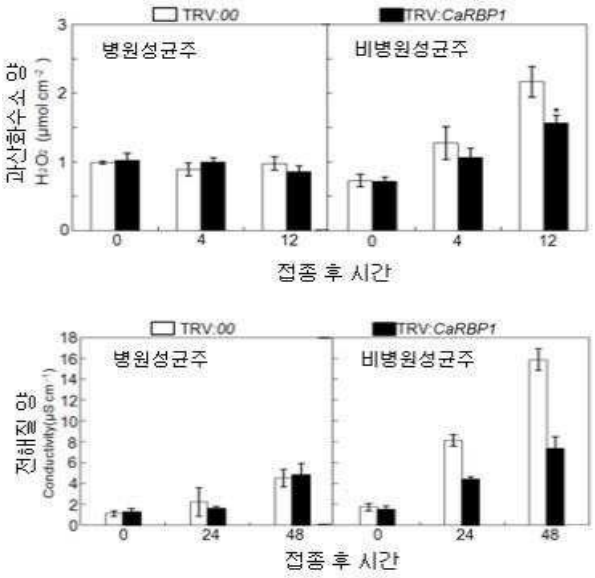
도면8


35S:00
35S:CaRBP1
과산화수소 양
H2O2 (μmol cm-2)
0
12
24
접종 후 시간
35S:00
35S:CaRBP1
전해질 양
Conductivity(μS cm-1)
0
24
48 hai
접종 후 시간

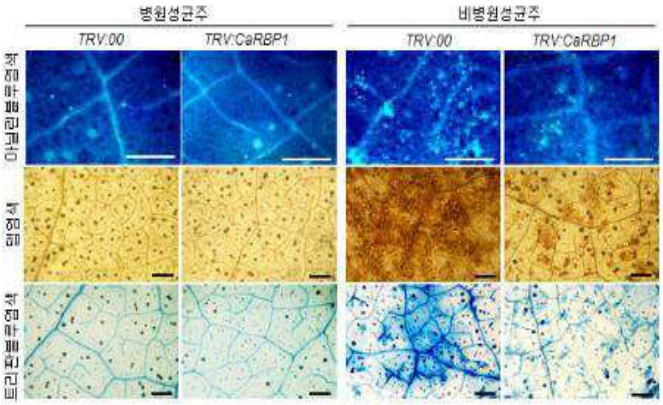
도면9


병원성 균주
비병원성 균주
TRV:00
TRV:CaRBP1
TRV:00
TRV:CaRBP1
cfu ml-1
10⁶
10⁷
10⁸
TRV:00
TRV:CaRBP1
세균수
Log cfu cm-2
0
3
0
3
병원성균주
비병원성균주
접종 후 날짜

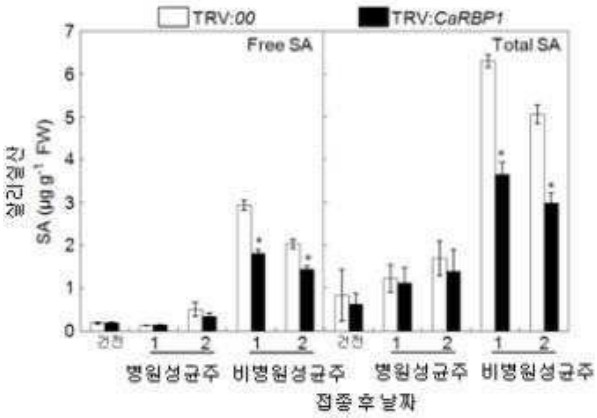
도면10



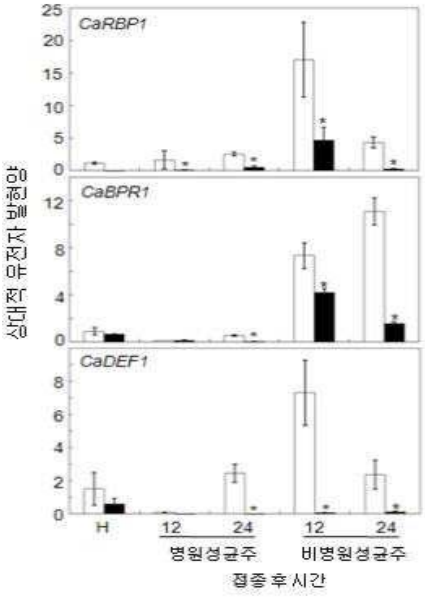
도면11



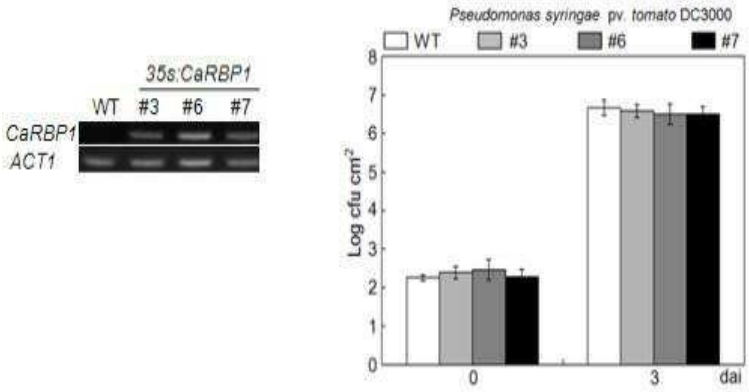
도면12



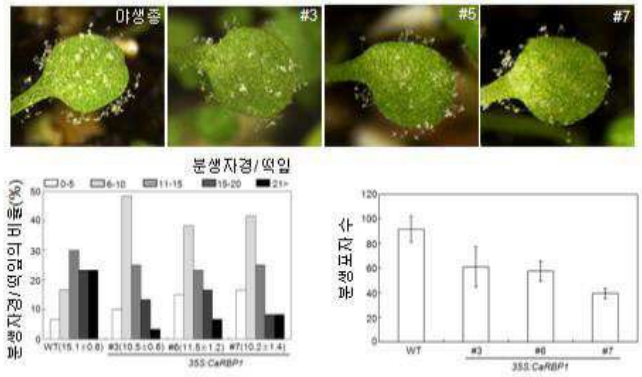
도면13



도면14



도면15



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation

<120> Disease resistance-related pepper RNA binding protein gene CaRBP1

and transgenic plants using the same

<130> P11-100111-01

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1152

<212> DNA

<213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang

<400> 1

tcctgttggc ckactggctt ttcttctcyc tctttactca wtcaatactt tctctctcta 60

aaaatccatt gaaggaaact agagagagaa agttagttag tgagtgagct agagagagga 120

agaagattga aatttgagaa ttggtgggaa aaaatgaacg gtggagattt gaatcagcaa 180

caacaacagc aacagcatca acaacaacaa catcaccagc agtgggtggc gatgcagcag 240

tatcaacaac aatggatggc gatgcagtat ccagcagcag caatggcgat gcagcaacag 300

atgatgtatg gtcagcaata catgccttac tatcatcaac agcagcagca gcagatgctg 360

cagccgccgc cgccgcagat tcagacttca tctgaagata acaaaacgat ttggattggt 420

gatcttcagc catggatgga tgaaaattat cttcattcct gcttttctca tgttggcgag 480

ctggtttctg tgaaaattat tcgaaacaag caaactggtc aatcagagcg ttatggattt 540

gttgagttta atactcacac agcagcagag aaagtgctac agagctacaa tggatctatg 600

atgccaaatg cagagcaacc attccgctta aattgggcag cctttggtgc tggtgaaaaa 660

cgtgcagaaa ctggttctga tttctcaatt tttgtaggag atttggcttc tgatgttact 720

gacacaatgt tacgtgacac tttcgctagt agatatccat cttttaaagg tgcaaagtag 780

tagtagatgc aaacacaggc cactcaaagg ctatggcttt gtaaggttgg tgatgaaagc 840

gagaggtctc gggccatgac cgaaatgaat ggcatatatt gttcagcagg cccatgcgtg 900

ttggggttgc taccccaaaa acatcaccca scacaatttc ttccaagctg kgatatactg 960

gkgawtgcat aatggtctgc accatgatcc agtctgatgg cgatcmtcaa acmamaattt 1020

gtgcgactga tctggktcag atgaagacct gacgatctta gcattgggga atgtcctgga 1080

atctggcgaa ggtggtttgc attcgagact ygycggaact aaaaataagg cagggtgcca 1140

cggaattccc tc 1152

<210> 2

<211> 208

<212> PRT

<213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang

<400> 2

Met Asn Gly Gly Asp Leu Asn Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Gln
1 5 10 15

Gln Gln Gln His His Gln Gln Trp Val Ala Met Gln Gln Tyr Gln Gln
20 25 30

Gln Trp Met Ala Met Gln Tyr Pro Ala Ala Ala Met Ala Met Gln Gln
35 40 45

Gln Met Met Tyr Gly Gln Gln Tyr Met Pro Tyr Tyr His Gln Gln Gln
50 55 60

Gln Gln Gln Met Leu Gln Pro Pro Pro Pro Gln Ile Gln Thr Ser Ser
65 70 75 80

Glu Asp Asn Lys Thr Ile Trp Ile Gly Asp Leu Gln Pro Trp Met Asp
85 90 95

Glu Asn Tyr Leu His Ser Cys Phe Ser His Val Gly Glu Leu Val Ser
100 105 110

Val Lys Ile Ile Arg Asn Lys Gln Thr Gly Gln Ser Glu Arg Tyr Gly
115 120 125

Phe Val Glu Phe Asn Thr His Thr Ala Ala Glu Lys Val Leu Gln Ser
130 135 140

Tyr Asn Gly Ser Met Met Pro Asn Ala Glu Gln Pro Phe Arg Leu Asn
145 150 155 160

Trp Ala Ala Phe Gly Ala Gly Glu Lys Arg Ala Glu Thr Gly Ser Asp
165 170 175

Phe Ser Ile Phe Val Gly Asp Leu Ala Ser Asp Val Thr Asp Thr Met
180 185 190

Leu Arg Asp Thr Phe Ala Ser Arg Tyr Pro Ser Phe Lys Gly Ala Lys
195 200 205