

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0099657 (43) 공개일자 2013년09월06일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/82 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호	10-2012-0021334	(72) 발명자 황병국 서울특별시 서초구 서초1동 1641-1 서초삼성래미 안아파트 103동 1405호 최두석 서울특별시 용산구 원효로2가 8-29
(22) 출원일자	2012년02월29일	(74) 대리인 김선애
심사청구일자	2012년02월29일	

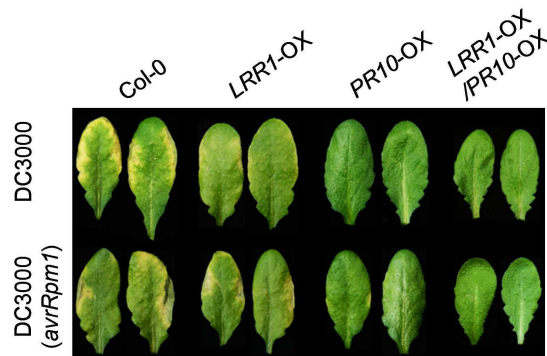
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 식물체 병생성 관련 단백질 유전자와 루신 리치 리פט 단백질 유전자를 이용한 병저항성 식물체 제조방법 및 식물체 병저항성 탐색방법

(57) 요약

본 발명은 식물체 병생성 관련 단백질 유전자와 루신 리치 리פט 단백질 유전자를 이용한 병저항성 식물체 제조방법 및 식물체 병저항성 탐색방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 병관련 유전자 *CaLRR1*과 상호작용하는 *CaPR10*을 선발하여 방어관련단백질들의 상호작용을 분자생물학적/세포화학적 방법을 통해 밝히고 이들 단백질의 항체를 이용하여 식물체의 저항성 탐색방법을 제공함으로써 저항성 식물 품종 개발 및 형질전환 식물체 제작에 기여할 수 있다.

대표도 - 도26



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008027

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 고추에서 병저항성 관련 유전자의 분리와 기능 분석

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

식물체에서 *CaPR10* 유전자 및 *CaLRR1* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 병저항성 식물체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 *CaLRR1* 유전자는 *CaPR10* 유전자에 의한 세포 사멸 반응을 유도하는 것을 특징으로 하는 병저항성 식물체의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 *CaLRR1* 유전자는 *CaPR10* 유전자에 의한 리보핵산분해활성을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 특징으로 하는 병저항성 식물체의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 *CaPR10* 유전자 및 *CaLRR1* 유전자는 모두 세포질에서 발현되는 것을 특징으로 하는 병저항성 식물체의 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 의해 제조된 병저항성 식물체.

청구항 6

CaPR10 항체 및 *CaLRR1* 항체를 프로브로 이용하여 *CaPR10* 단백질 및 *CaLRR1* 단백질이 발현 여부를 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 식물체 병생성 관련 단백질 유전자와 루신 리치 리프 단백질 유전자를 이용한 병저항성 식물체 제조 방법 및 식물체 병저항성 탐색방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 고추 세균성 점무늬병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*의 비병원성 균주에 감염될 때 일어나는 저항성 반응에서 빠르고 강하게 발현되는 *CaPR10*(*Capsicum annuum* pathogenesis-related protein 10)로 항체를 제작하여 이를 이용하여 면역반응으로 *CaPR10*의 단백질 수준의 발현 여부를 탐색하고, 상승적으로 과민성 세포사멸 등의 병저항성을 유도하는 *CaLRR1*(*Capsicum annuum* leucine-rich repeat protein 1)과의 상호작용을 탐색하는 방법에 관한 것이다. 또한 아그로박테리움 (*Agrobacterium tumefaciens*)을 이용한 일시적 유전자 발현 (transient gene expression)을 통해서 *CaPR10*과 *CaLRR1*의 결합체의 역할을 탐색하였고, *CaPR10* 유전자를 과발현(overexpression)하는 형질전환 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물체를 제작하여 병저항성 증대효과를 확인하고, 특히 *CaLRR1* 형질전환식물과 교잡을 통하여 두 유전자를 모두 과발현하는 식물체를 통해 *CaPR10*과 *CaLRR1*의 상호작용의 병저항성에 있어서의 역할을 탐색하고 최종적으로 식물병 저항성 형질전환 식물체를 위한 유전자원을 제공하는 것에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

정착 생물로서의 식물은 산발적인 외부 환경 스트레스에 노출이 되어 있다. 특히 생물학적 스트레스, 즉 병원균의 침입에 대하여 직접적인 회피를 할 수 없기 때문에 스스로 방어기작을 진화시켜왔다. 이러한 방어반응은 선천적 면역에 의존하는데 이에 대한 연구는 아직 부족하다. 식물의 면역성에도 불구하고 병원균의 감염에 의한 작물의 생산 및 품질의 저하는 경제적 피해를 야기하고 있다. 이를 극복하기 위하여 벼를 비롯하여 고추나 콩 등의 주요 작물들을 모델 식물로 하여 병 저항성 기작을 연구하고 있으며, 아울러 이들 자원을 이용하여 저항성

품종을 육성하고 있다.

[0003] 식물과 병원균의 상호작용이 일어나는 동안에 식물의 병저항성 신호전달 경로가 활성화되고 여기에 관련하는 유전자들을 분자생물학 및 세포생물학적 방법을 통해 탐색하고 있다. 식물은 병원균의 침입을 인식하면 방어신호 전달경로가 활성화되어 침입부위에서 칼로스(callose)를 축적하거나 리그닌(lignin)화에 의한 세포벽 강화 등을 통해 병원균의 증식을 물리적으로 방어하거나 과민성 반응(Hypersensitive response)으로서의 급격한 국부적 세포 사멸로 추가적 병원균 증식을 억제하고, 또한 병생성관련단백질(Pathogenesis-related protein)이나 기타 항미생물성 물질을 생성함으로써 침입하는 병원균에 대항한다. 이들에 대한 연구는 식물의 방어 생리 기작을 밝히는 데 있어 중요한 가치가 있으며 여기에서 얻어지는 병저항성 유전자는 해당 작물의 병저항성을 극대화시킬 수 있을 뿐만 아니라 다른 식물 종의 분자유종 또한 가능하게 할 수 있다.

[0004] 고추의 병저항성 관련하여 알려진 종래의 기술에는 E3유비퀴틴라이게이즈 유전자 씨에어링1 (대한민국 특허등록 제10-1056273호), 칼모듈린 유전자 씨에이씨에이엠1 (대한민국 특허등록 제10-1047619호), 만노스바인당렉틴1 (대한민국 특허등록 제10-1043877호), 리폭시제나제1 (대한민국 특허등록 제10-1006300호), 엽시스산 반응 유전자 씨에이에이비알1 (대한민국 특허등록 제10-0990317호) 등을 이용하여 병원균 침입에 보다 높은 저항성을 발현하는 형질전환 식물체를 제작하고 이를 이용해 병저항성을 탐색하는 기술이 최근에 보고가 되었다.

[0005] 한편, 병생성 관련 단백질 10 (Pathogenesis-related protein 10, PR10)은 여러 식물에서 병원균 감염 동안에 발현하거나 혹은 감수성 품종에서보다 저항성 품종에서 보다 발현이 증가하는 것으로 알려져 방어 반응에서 역할을 할 것이라는 보고가 있었다. 또한 리보핵산분해효소(RNase) 활성이 있는 것으로 알려져 있었다. 그러나 이러한 연구결과와는 달리 PR10들이 병저항성 기작에서 어떠한 역할을 하는 지는 아직 불분명하였다.

[0006] 본 발명의 배경이 되는 기술로서는, 대한민국 등록특허공보 10-0538975(2005.12.26)에 식물 병원균에 감염된 고추에서 식물방어메카니즘에 관련된 단백질인 PR-10을 코딩하는 유전자의 염기서열과 아미노산 서열을 제공하고, 항바이러스제 및 항진균제로서의 용도가 기재되어 있고, 최형우 등, MPMI Vol. 24, No. 1, 2011, pp. 68-78. 및 정호원 등, Mol Plant Pathol. 2007 Jul;8(4):503-14에는 CaLLR1 및 CaHIR가 식물 면역 및 병과 관련된 세포죽음 조절자로서 역할을 한다고 기재되어 있고, 정의환 등, Biochimica et Biophysica Acta 1676 (2004) 211-222에는 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 대해 체관부 세포를 보호하는 작용을 하는 루신리치PEAT 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 기재되어 있으나, CaLLR1과 CaPR10의 상호작용 및 이를 이용한 병저항성 식물체 제조방법 등에 대한 기재는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-0538975(2005.12.26)

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 최형우 등, The Hypersensitive Induced Reaction and Leucine-Rich Repeat Proteins Regulate Plant Cell Death Associated with Disease and Plant Immunity, MPMI Vol. 24, No. 1, 2011, pp. 68-78.

(비특허문헌 0002) 정호원 등, The leucine-rich repeat (LRR) protein, CaLRR1, interacts with the hypersensitive induced reaction (HIR) protein, CaHIR1, and suppresses cell death induced by the CaHIR1 protein., Mol Plant Pathol. 2007 Jul;8(4):503-14.

(비특허문헌 0003) 정의환 등, Identification of a novel pathogen-induced gene encoding a leucine-rich repeat protein expressed in phloem cells of Capsicum annuum, Biochimica et Biophysica Acta 1676 (2004) 211-222

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 고추의 병생성관련단백질 10 (CaPR10)의 기능을 CaLRR1과의 상호작용을 비롯하여 두 유전자가 함께 발현되는 형질전환 식물체의 제작, 세포 사멸에서의 기능 분석 등을 통하여 저항성 검정 평가를 가능하게 하여 본 발명을 완성하였다. 이러한 발명은 식물의 병저항성 기작에 대한 지식적 정보를 축적할 뿐만 아니라 이를 이용하여 저항성 식물 육종, 개발에 이바지하여 식물보호 및 식량 자원 확보에 있어 실용적 대안을 제시하여 줄 것이다.
- [0010] 종래의 병저항성 유전자 탐색방법은 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 감염된 식물에서 얻어진 mRNA를 통해 cDNA를 합성하고 여기서 병방어관련 유전자를 선별하는 과정을 거쳤다. 비록 몇몇 방어관련유전자들이 밝혀졌지만 하나의 유전자에 의한 단순한 신호전달경로가 아닌 여러 유전자의 유기적으로 복잡한 상호작용에 의해 생리활성이 조절된다는 생물학적 성질을 고려할 때 본 발명은 이와 같은 종래 기술상의 과제를 해결하기 위한 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한 본 발명의 목적은 병방어관련 유전자 루신리치리펩1 (*CaLRR1*)을 이용하여 상호작용하는 고추 병생성관련단백질 유전자 10(Pathogenesis-related 10, *CaPR10*)를 선별하여 이 상호작용을 통해 식물체의 저항성 탐색방법을 제공하고자 하는 것이다.
- [0012] 더 나아가, 본 발명은 상기 *CaLRR1*과 *CaPR10* 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 제작하는 목적이 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적과 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 식물체에서 *CaPR10* 유전자 및 *CaLRR1* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 병저항성 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 병저항성 식물체를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 CaPR10 항체 및 CaLRR1 항체를 프로브로 이용하여 CaPR10 단백질 및 CaLRR1 단백질이 발현 여부를 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공한다.
- [0017] 이하, 본 발명에 대해 구체적으로 설명한다.
- [0018] 상기 본 발명의 목적은 고추 병관련 유전자 *CaLRR1*과 상호작용하는 *CaPR10*을 선별하고 고추 세균성 점무늬 병균 감염에 대한 발현 여부를 조사하고, 고추, *nicotiana benthamiana*, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물 등에서 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)을 이용한 과발현을 통하여 식물병저항성 유도를 확인하여 달성하였다.
- [0019] 따라서, 본 발명은 식물체에서 *CaPR10* 유전자 및 *CaLRR1* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 병저항성 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명에 있어서, *CaPR10* 유전자 및 *CaLRR1* 유전자를 과발현시키는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에 공지된 다양한 식물의 형질전환 방법들을 이용할 수 있다. 예를 들어 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 식물세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법 (Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시 엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.
- [0021] 본 발명자들에 의해 병관련 유전자 *CaLRR1*과 *CaPR10* 유전자가 상호작용을 하는 것이 최초로 밝혀졌다(도 1 ~ 도

3 참조).

- [0022] 상기 *CaLLR1* 유전자는 *CaPR10* 유전자에 의한 세포 사멸 반응을 유도하여 식물체의 병 저항성을 증가시키는 것으로 나타났다(도 6 ~ 도 11 참조).
- [0023] 또한, 상기 *CaLLR1* 유전자는 *CaPR10* 유전자에 의한 리보핵산분해활성을 농도 의존적으로 증가시켜 식물체의 병 저항성을 유도할 수 있는 것으로 나타났다(도 12 참조).
- [0024] 나아가, 상기 *CaPR10* 유전자 및 *CaLLR1* 유전자는 모두 세포질에서 발현되어 상호작용하는 경우에만 세포사멸 반응을 유도할 수 있는 것으로 나타났다(도 14 ~ 16 참조). 이때, 예를 들어 NLS에 염기서열 돌연변이 (GGCCCTAAACAAAGCGTAAGGTT; 서열번호 2)가 포함되어 핵위치를 하지 못하는 염기서열(nls)을 도입한 pBIN35S:*nls-CaPR10-GFP*와 pBIN35S:*nls-CaLLR1-GFP* 재조합백터를 제조하여 상기 *CaPR10* 유전자 및 *CaLLR1* 유전자가 모두 세포질에서 발현되도록 하여 식물체의 병저항성을 증가시킬 수 있다.
- [0025] 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 *CaPR10* 유전자가 도입되어 형질전환된 식물체와 *CaLLR1* 유전자가 도입되어 형질전환된 식물체를 교배하여 병저항성 식물체를 제조할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 병저항성 식물체를 제공한다. 상술한 바와 같이 *CaPR10* 유전자 및 *CaLLR1* 유전자 상호발현이 식물의 병저항성에 중요한 역할을 하고, *CaLLR1* 유전자가 *CaPR10* 조절자임이 확인되었다. 따라서 이들 유전자들이 발현이 억제되는 경우 식물체의 병저항성이 감소되고, 반대로 이들 유전자가 동시에 발현되는 경우 식물체의 병저항성이 증가된다(도 17 ~ 도 35 참조).
- [0027] 또한, 본 발명은 *CaPR10* 항체 및 *CaLLR1* 항체를 프로브로 이용하여 *CaPR10* 단백질 및 *CaLLR1* 단백질이 발현 여부를 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공한다.
- [0028] 상술한 바와 같이, *CaPR10* 유전자 및 *CaLLR1* 유전자 상호발현이 식물의 병저항성에 중요한 역할을 하므로, 상기 *CaPR10* 단백질 및 *CaLLR1* 단백질이 발현 여부를 확인함으로써 식물체의 병저항성을 탐색할 수 있다. *CaPR10* 단백질 및 *CaLLR1* 단백질이 발현 여부는 본 발명의 속하는 기술 분야의 공지된 다양한 방법들을 이용하여 확인할 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, 예를 들어 *CaPR10* 항체 및 *CaLLR1* 항체를 프로브로 이용하여 상기 단백질들의 발현 여부를 확인할 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 *CaPR10* 유전자 및 *CaLLR1* 유전자를 삽입시켜 제조한 재조합백터, pET28a:*CaPR10*과 pGEX-5X:*CaLLR1*을 이용하여 제조된 *CaPR10*의 항체 및 *CaLLR1* 항체를 제작하여 이를 프로브로 이용하였다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명의 완성으로 병관련 유전자 *CaLLR1*과 상호작용하는 *CaPR10*을 선발하여 식물의 세균성 점무늬 병원균의 침입에 대한 저항성 반응에서의 역할을 하는 방어관련단백질들의 상호작용을 분자생물학적/세포화학적 방법을 통해 밝히고 이들 단백질의 항체를 이용하여 식물체의 저항성 탐색방법을 제공함으로써 저항성 식물 품종 개발 및 형질전환 식물체 제작에 기여하는 효과를 기대할 수 있게 되었다.
- [0030] 따라서 본 발명은 저항성 품종 개발에 있어 더욱 발전한 기술을 제공하는 효과가 있어 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 Yeast-two-hybrid assay를 통하여 *CaPR10*과 *CaLLR1*의 상호작용을 확인한 도면이고,
- 도 2는 BiFC assay를 통하여 *CaPR10*과 *CaLLR1*의 상호작용을 확인한 도면이고,
- 도 3은 공면역침강법(Co-immunoprecipitation, Co-IP)을 통하여 *CaPR10*과 *CaLLR1*의 상호작용을 확인한 도면이고,
- 도 4는 고추녹광품종에 세균성 점무늬 병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 및 비병원성

균주를 접종하였을 때, 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 *CaPR10*과 *CaLRR1* 유전자의 발현 결과를 나타낸 도면이고,

도 5는 고추녹광품종에 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 및 비병원성 균주를 접종하였을 때, 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 *CaPR10*과 *CaLRR1* 발현 결과를 단백질 수준에서 나타낸 도면이고,

도 6은 *CaPR10*과 *CaLRR1*를 고추녹광품종의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 단백질 수준에서 발현 여부를 면역반응을 통해 확인한 도면이고,

도 7은 *CaPR10*과 *CaLRR1*를 고추녹광품종의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 세포사멸이 일어난 표현형과 이온전도도를 나타낸 도면이고,

도 8은 *CaPR10*과 *CaLRR1*를 고추녹광품종의 잎에 농도별로 일시적 과발현을 시킨 후 세포사멸이 일어난 표현형과 이온전도도를 나타낸 도면이고,

도 9는 *CaPR10*과 *CaLRR1*를 고추녹광품종의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 아닐린 블루 염색을 통해 칼로스 축적을 확인한 도면이고,

도 10은 *CaPR10*과 *CaLRR1*를 *Nicotiana benthamiana* 식물의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 세포사멸이 일어난 표현형과 이온전도도를 나타낸 도면이고,

도 11은 *CaPR10*과 *CaLRR1*를 *Nicotiana benthamiana* 식물의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 병방어관련 유전자의 발현 경향을 나타낸 도면이고,

도 12는 인겔 리보핵산분해효소 분석(in-gel RNase assay) 실험을 통해 *CaLRR1*이 *CaPR10*의 리보핵산분해활성에 미치는 영향을 나타낸 도면이고,

도 13은 고추식물이 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 감염되었을 때 *CaLRR1*이 *CaPR10*의 인산화에 미치는 영향을 나타낸 도면이고,

도 14는 *CaPR10*과 *CaLRR1*의 세포내위치를 *Nicotiana benthamiana* 식물의 잎에서 확인하고 핵위치염기서열 조작으로 인한 정상적인 핵으로의 위치화를 확인한 한 도면이고,

도 15는 *CaPR10*과 *CaLRR1*에 핵위치염기서열을 결합시켜 상호작용을 할 수 없게 분리시킨 후 세포내 위치를 확인하고 그 발현 여부를 확인한 도면이고,

도 16은 *CaPR10*과 *CaLRR1*에 핵위치염기서열을 결합시켜 핵 또는 세포질에서 상호작용하는 동안 일어나는 세포사멸을 확인한 결과이고,

도 17은 TRV 벡터를 이용하여 *CaPR10/CaLRR1* 유전자 사일런싱이 된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 식물체 내에서 병원균 생장을 검정한 결과를 나타낸 그래프이고,

도 18은 TRV 벡터를 이용하여 *CaPR10/CaLRR1* 유전자 사일런싱이 된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 트리판 블루 염색을 통해 세포 사멸을 관찰한 그림과 이온전도도를 측정한 그래프이고,

도 19는 TRV 벡터를 이용하여 *CaPR10/CaLRR1* 유전자 사일런싱이 된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 뎀 염색을 통해 활성산소의 생성을 관찰한 그림과 이온전도도를 측정한 그래프이고,

도 20은 TRV 벡터를 이용하여 *CaPR10/CaLRR1* 유전자 사일런싱이 된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 병관련 유전자를 관찰한 그래프이고,

도 21은 TRV 벡터를 이용하여 *CaPR10/CaLRR1* 유전자 사일런싱이 된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 병저항성 호르몬인 살리실산의 생성을 관찰한 그래프이고,

도 22는 상기의 재조합벡터 pBIN35S:*CaPR10*으로 형질전환된 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물에서 *CaPR10*의 과발현 여부를 역전사 증합효소연쇄반응을 통해 확인한 도면이고,

도 23은 상기의 재조합백터 pBIN35S:CaPR10으로 형질전환된 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물과 CaLRR1 형질전환과 교배를 통해 얻어진 식물들에서 CaPR10과 CaLRR1의 단백질 수준의 과발현 여부를 면역반응을 통해 확인한 도면이고,

도 24는 CaPR10과 CaLRR1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물의 정상적인 생육 상태에서의 표현형을 나타낸 도면이고,

도 25는 도 24의 식물의 잎을 트리판 블루 염색을 통해 세포 사멸을 관찰한 도면이고,

도 26은 CaPR10과 CaLRR1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 병징을 관찰한 도면이고,

도 27은 CaPR10과 CaLRR1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 세균 생장 수를 검정한 그래프이고,

도 28은 CaPR10과 CaLRR1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 트리판 블루 염색을 하여 세포 사멸을 확인한 도면과 이온전도도를 측정한 그래프이고,

도 29는 CaPR10과 CaLRR1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 댐 염색을 하여 활성산소의 생성을 확인한 도면과 양적정량을 나타낸 그래프이고,

도 30은 CaPR10과 CaLRR1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 병방어 관련 유전자의 발현 경향을 확인한 그래프이고,

도 31은 CaPR10과 CaLRR1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 노균병균 *Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2를 접종한 후 분생자경을 확인한 도면과 댐, 아닐린 블루, 트리판 블루 염색을 통해 각각 활성산소생성, 칼로스축적, 군사 및 포자 형성을 검출한 도면이고,

도 32는 CaPR10과 CaLRR1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 노균병균 *Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2를 접종한 후 7일 후 발생한 분생포자를 정량화한 도면이고,

도 33은 도 31에서의 댐 염색한 결과를 양적으로 나타낸 그래프이고,

도 34는 도 31에서의 아닐린 블루 염색 결과를 양적으로 나타낸 그래프이고,

도 35는 CaPR10과 CaLRR1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 노균병균 *Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2를 접종한 후 7일 후 발생한 분생자경 수를 그룹별로 나누어 정량화한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다. 그러나 이러한 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것임으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명이 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0033] [실시예 1] CaPR10과 CaLRR1의 단백질 수준의 상호작용 확인

[0034] [단계 1]

[0035] 고추 세균성 점무늬 병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성 균주 Bv5-4a를 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* cv. Kockwang)에 접종한 뒤에 28℃에서 18시간 동안 습실 처리한 후 과민성반응으로서 세포사멸이 일어나는 잎을 수거하였다. 이 잎으로부터 mRNA를 추출하여 역전사중합효소연쇄반응 (Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 반응을 통해 cDNA를 합성 및 증폭하여 라이브러리(library)를 제작하였다. 이 라이브러리로부터 cDNA 클론(clone)을 제조한 후 GAL4-activating 도메인(domain)을 갖는 gGADT7 벡터(vector)에 도입하는 재조합 벡터를 만들고, GAL4 DNA binding 도메인을 갖는 pGBKT7 벡터에 CaLRR1(NCBI Accession no. AY237117)을 도입시킨 후 이 재조합 벡터를 통해 라이브러리로부터 CaLRR1

과 상호작용하는 클론을 탐색하였고 이들 확인된 유전자 중에 고추의 세균성 점무늬 병균에 대해 저항성 반응이 일어나는 동안에 발현하는 것으로 알려진 (참고문헌, Choi, D.S. and Hwang, B.K. 2011. Plant Cell 23: 823-842) CaPR10(NCBI Accession no. AF244121)을 선별하였다.

[0036] [단계 2]

[0037] CaLRR1과 CaPR10의 상호작용을 확인하기 위하여 pGBKT7과 pGADT7 벡터에 각각의 유전자를 도입하여 재조합 벡터 쌍 (pGADT7:CaLRR1/pGBKT7:CaPR10, pGADT7:CaPR10/pGBKT7:CaLRR1)을 제조하여 yeast AH109에 lithium acetate 방법을 이용하여 형질전환시킨 후 Yeast-two-hybrid assay를 실행하여 두 단백질의 상호작용을 확인하였다 (참고문헌 Jung, H.W. and Hwang, B.K. 2007. Mol. Plant Pathol. 8:503-514, 도 1 참조).

[0038] [단계 3]

[0039] 다음으로 CaLRR1과 CaPR10의 세포내 상호작용을 확인하기 위하여 Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay 방법(참고문헌 : Walter et al., 2004. Plant J. 40:428-438.)을 이용하였다. 각각의 유전자를 pSPYNE, pSPYCE 벡터에 도입하여 재조합 벡터쌍 (pSPYNE:CaLRR1/pSPYCE:CaPR10, pSPYNE:CaPR10/pSPYCE:CaLRR1)을 제조하고 아그로박테리움 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)에 형질전환시킨 후 *Nicotiana benthamiana* 식물 잎에 접종하고 48시간 후에 공초점레이저현미경 (Confocal laser scanning microscope)를 이용하여 상호작용을 확인하였다. 상호작용은 pSPYNE, pSPYCE 벡터가 가지고 있는 반쪽의 yellow fluorescence protein (YFP)이 결합하면서 발산하는 노란색 형광을 통해 확인이 가능하다. 두 단백질은 세포내 세포질 부위에서 상호작용하는 것으로 관찰이 되었다 (도 2 참조).

[0040] [단계 4]

[0041] 또한 CaLRR1과 CaPR10의 상호작용을 더욱 확실하게 알아보기 위하여 공면역침강법(Co-immunoprecipitation, Co-IP)을 이용하였다(참고문헌 Jung, H.W. and Hwang, B.K. 2007. Mol. Plant Pathol. 8:503-514). 35S promotor에 6개의 HA가 포함되어 있는 35S:HA 벡터에 CaLRR1을 8개의 Myc을 가진 35S:Myc 벡터에 CaPR10을 도입시킨 후 단계 3에서와 같이 아그로박테리움에 형질전환시키고 *N. benthamiana* 식물에 접종한 후 24시간 후에 잎을 수거하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 anti-HA agarose affinity gel을 이용하여 면역침강을 수행하고 전기영동한 후 나이론 막(Hybond P⁺)에 전이시키고 이 막을 anti-cMyc 항체와 반응하여 두 단백질의 상호작용을 확인하였다 (도 3 참조).

[0042] [실시예 2] 병원균 접종에 의한 고추식물에서의 CaPR10 유전자의 탐색방법

[0043] 상기 실시예 1에서 나타난 CaPR10 유전자의 저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다.

[0044] [단계 1]

[0045] 먼저 저항성 탐색방법을 구체적으로 제시하기 위하여, 고추 세균성 점무늬 병원균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 고추식물과 친화적 반응(병)을 일으키는 병원성 균주 Ds1과 불친화적 반응(저항성)을 일으키는 비병원성 균주 Bv5-4a를 10⁸ cfu/ml의 농도로 6엽기의 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)의 3~4엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 인필트레이션(Infiltration)하여 접종하고, 접종 후에는 28℃, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 두었다. 접종 후 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 접종된 잎을 수거하여 total RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론 막(Hybond P⁺)에 전이시켰다.

[0046] 다음으로 CaPR10 유전자의 오픈리딩프레임 (open reading frame) 부위를 중합효소연쇄반응으로 증폭시킨 후 이를 방사성이 표지된 32^P-ATP와 반응시킨 후 노던 블로팅 (northern blotting)을 수행하였다. 이때 리보솜 RNA의 양을 에티디움브로마이드 (ethidium bromide, EtBr) 염색을 통해 동일량이 로딩되었음을 확인하였다. 이상의 실험결과는 도 4에 나타내었으며 실험결과 CaPR10은 고추 세균성 점무늬 병균 감염시 고추 식물에서 발현하지만 비병원성 균주에 대해서 더욱 빠르고 강하게 발현이 나타났다. 더욱 자세하게는 병원성 균주에 감염되었을 때는 5시간 이후부터 발현이 나타나서 서서히 증가하는 경향을 보였지만, 비병원성 균주에 감염되었을 때는 5시간부터 이미 강하게 발현되어 25시간까지 비교적 강한 발현이 유지되는 것을 관찰할 수 있었다 (도 4 참조).

[0047] [단계 2]

- [0048] 또한, 단백질 수준에서의 발현을 확인하기 위해 병원균 접종식물의 잎을 접종 후 5, 15, 25, 35 시간 후에 수거한 후 단백질을 추출하고 전기영동한 후 나이론 막(Hybond P⁺)에 전이시켰다. 이전에 CaPR10을 pET28a 벡터에 클로닝을 한 후 *Escherichia coli* BL21에 형질전환시켜 순화된 CaPR10 단백질을 얻고 이것을 토끼에 주사하여 항체를 얻었다. 이 항체를 이용하여 면역반응 (immunoblotting)을 수행하였다. 노던블로팅 결과와는 다르게 단백질 수준에서는 CaPR10의 발현이 고추 세균성 점무늬 병균의 비병원성 균주에 감염되었을 때의 불친화적 반응에서 강하게 발현되는 것으로 확인되었다 (도 5 참조).
- [0049] [실시예 3] 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)을 매개로 한 유전자 일시적 발현 (*Agrobacterium*-mediated transient expression) 방법을 통한 CaPR10과 CaLRR1의 발현이 식물에 미치는 영향
- [0050] 고추 식물에서 과민성 세포 사멸이 일어나는 동안에 CaPR10 유전자의 발현이 강하게 일어났기 때문에 이러한 생리적 반응에서의 CaPR10 유전자의 관련성을 알아보기 위하여 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)을 이용하여 고추 식물에서 CaPR10 유전자를 일시적으로 과발현시켰다. CaPR10 유전자를 식물 발현 벡터 pBIN35S에 도입시켜 pBIN35S:CaPR10 재조합벡터를 제조한 후 이것을 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)에 형질전환시키고 고추 식물 잎에 접종하여 CaPR10 유전자의 과발현을 유도하였고 같은 방법으로 CaLRR1 유전자도 함께 발현시켰다.
- [0051] [단계 1]
- [0052] 먼저, 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 접종 이후 0, 6, 24, 48 시간에 잎을 수거하여 단백질을 추출한 뒤 실시예 2에서와 같이 CaPR10과 CaLRR1 특이적인 항체를 이용하여 단백질 수준의 발현을 확인하였다 (도 6 참조). 항체는 재조합벡터 pET28a:CaPR10과 pGEX-5X:CaLRR1을 *Escherichia coli* BL21에 형질전환시킨 후 발현시켜서 토끼에 주사하고, 이 토끼로부터 얻어진 항체를 순화하여 얻었다 (영인프런티어, 서울). 위 식물을 지속적으로 관찰한 결과 CaPR10이 과발현한 잎에서는 대조구 및 CaLRR1에서는 나오지 않는 세포 사멸이 나타났으며 특히 CaLRR1과 함께 과발현한 잎에서는 세포 사멸 반응이 증가하였으며 이들 식물에서 세포 사멸의 정도를 정량화하기 위하여 이온전도도 분석을 수행하였고 이는 CaPR10의 세포 사멸에서의 역할을 지지하여 주었다 (도 7 참조).
- [0053] [단계 2]
- [0054] 다음으로 CaLRR1과의 상호작용이 CaPR10이 일으키는 세포 사멸에 어떠한 영향을 일으키는 지 알아보기 위하여 각각의 유전자 재조합 벡터를 함유하고 있는 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)의 농도를 조절하여 고추 식물 잎에 접종해 보았다. 그 결과 CaLRR1 농도에 의존적으로 CaPR10 발현에 의한 세포 사멸이 증가하는 것이 관찰되었다. 이는 또한 상기 실험과 마찬가지로 이온전도도 분석을 통해 확인되었다 (도 8 참조).
- [0055] [단계 3]
- [0056] 칼로스 (callose)는 병원균 침입 주위에 축적되는 물질로서 병저항성 반응의 일환으로 알려져 있다. CaPR10 유전자의 발현이 칼로스 형성에 어떠한 영향을 알아보기 위하여 아닐린블루 (aniline blue) 염색 방법을 통하여 확인하였다. 상기 실험에서 CaPR10과 CaLRR1 유전자를 과발현시킨 고추 잎을 아닐린블루로 염색한 뒤 자외선 (UV) 램프가 달린 광학현미경을 통해 관찰한 결과 CaPR10이 과발현한 잎에서 칼로스의 유의적인 축적 증가를 확인하였다 (도 9 참조).
- [0057] [단계 4]
- [0058] 식물 세포 사멸에서의 CaPR10의 역할을 더욱 확실히 알아보기 위하여 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 매개 일시적 발현에 모델 식물로 이용되는 *Nicotiana benthamiana*에서 고추 식물과 마찬가지로 일시적 과발현 시스템을 도입하였다. *N. benthamiana* 식물 잎에서도 CaPR10 유전자가 과발현하였을 때 세포 사멸의 결과가 나타나지 않았지만 CaLRR1 과 함께 발현하였을 경우에는 세포 사멸 반응이 일어났다 (도 10 참조). 이것은 CaPR10에 의한 세포 사멸 반응에 있어서 CaLRR1의 필요성을 시사하고 있다. 위 결과 역시 이온전도도 분석을 통해 정량화 되었다. 동물에서 유래한 세포 사멸 유도 유전자로 알려진 Bax와 식물/세균 상호작용에서 이펙터(effector)와 저항성(R) 유전자 조합으로 알려진 AvrPto/Pto의 발현실험이 여기서 적용된 시스템이 정상적으로 작동하고 있음을 보여주고 있다.

- [0059] 상기 모델 식물에서 알려진 세포 사멸 표지 유전자인 *NbHSR203J*와 *NbVPE1a*의 발현 여부를 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(Real-time RT-PCR) 실험을 통하여 확인해보니 *CaPR10*과 *CaLRR1*이 함께 발현하여 세포사멸을 일으키는 동안 이 표지 유전자들이 발현하고 있어서 *CaPR10/CaLRR1*의 공발현이 *N. benthamiana*의 세포 사멸 신호전달 경로를 활성화시키고 있음을 알 수 있었다 (도 11 참조).
- [0060] [실시예 4] *CaLRR1*이 *CaPR10*의 인산화(phosphorylation)와 리보핵산분해활성(ribonuclease activity) 기능에 미치는 역할
- [0061] 이전에 PR10 family에 속하는 유전자들이 인산화(phosphorylation)가 되고 또한 리보핵산분해활성(ribonuclease activity)을 가진다는 보고가 있었다. *CaLRR1*이 *CaPR10*이 일으키는 세포 사멸에 긍정적 조절자로서 역할을 하고 있기 때문에 *CaLRR1*이 *CaPR10*의 인산화와 리보핵산분해활성에 어떠한 영향을 미치는 지를 확인하였다.
- [0062] [단계 1]
- [0063] 리보핵산분해활성은 torula yeast (*Candida utilis*)의 RNA (Sigma)를 이용한 인겔 리보핵산 활성 분석 (in-gel RNase activity assay) 방법을 통해 확인하였다. Histidine (His) 태그(tag)를 포함하는 pET28a 벡터에는 *CaPR10*을 도입하고 Glutathione S-transferase (GST) 태그를 포함하는 pGEX-5X 벡터에는 *CaLRR1*을 도입하고 *Escherichia coli*에 형질전환하여 재조합 단백질을 순화하였다. 이것을 torula yeast (*Candida utilis*)의 RNA를 포함하는 아크릴아마이드 겔 (acrylamide gel)에 로딩하고 전기영동을 한 뒤에 톨루이딘 블루 O(Toluidine blue O) 염색을 통해 RNA의 분해정도를 확인하였다. 그 결과 *CaLRR1*이 *CaPR10*의 리보핵산분해활성을 농도에 의존적으로 증가시키는 것으로 나타났다 (도 12 참조). 또한, 리보핵산분해활성은 흡광도 분석을 통해 양적으로 정량하였고 이는 상기 결과와 같은 경향을 보였다 (도 12 참조).
- [0064] [단계 2]
- [0065] *CaPR10*의 인산화 분석을 위해서 고추 식물에 세균성 점무늬 병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성 균주 Bv5-4a를 접종한 뒤 접종한 잎을 수거하여 잎 추출물로 *CaPR10* 인산화 반응을 시켰다. 이것을 겔에 전기영동한 뒤 His와 GST 항체로 각각의 단백질 발현을 확인하였고 phosphoserine 항체로 *CaPR10*의 인산화를 확인하였다 (도 13 참조). 또한 Pro-Q diamond로 염색하고 그 이미지를 취하여 발산하는 형광을 540/25 nm 자극 (excitation) 과 590/30 nm 배출(emission) 조건하에서 정량하였다. 그 결과 *CaPR10*은 세균성 점무늬 병원균에 감염되었을 때에 인산화되며 이 반응 동안에 *CaLRR1*이 농도에 의존적으로 인산화를 증가시키는 역할을 한다는 것을 알 수 있었다 (도 13 참조).
- [0066] [실시예 5] *CaPR10*과 *CaLRR1*의 세포 사멸 유도에서의 세포질 발현의 중요성
- [0067] *CaPR10*과 *CaLRR1*의 세포내 발현 위치와 세포 사멸 기능과의 연관 관계를 알아보기 위하여 green fluorescence protein (GFP)를 포함하는 pBIN35S 벡터에 *CaPR10*과 *CaLRR1*을 도입시켜 pBIN35S:*CaPR10-GFP*와 pBIN35S:*CaLRR1-GFP* 재조합벡터를 제조하였다. 이것을 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)에 형질전환한 후 *Nicotiana benthamiana* 잎에 접종한 후에 공초점레이저현미경 (Confocal laser scanning microscope)를 이용하여 세포내 발현 위치를 확인하였고 두 단백질은 모두 세포질에 위치함을 관찰하였다 (도 14 참조).
- [0068] [단계 1]
- [0069] *CaPR10*과 *CaLRR1*의 세포질 발현이 세포사멸기능에 있어 필수적인지를 알아보기 위하여 핵위치염기서열(Nuclear localization sequence, NLS, GGCCCTAAAAAGAAGCGTAAGGTT; 서열번호 1)을 각각의 유전자에 도입하여 pBIN35S:*NLS-CaPR10-GFP*, pBIN35S:*NLS-CaLRR1-GFP*를 제조하여 인위적인 핵발현조절을 시도하였다. 뿐만 아니라 대조구 실험을 위해 NLS에 염기서열 돌연변이(GGCCCTAAAAACAAGCGTAAGGTT; 서열번호 2)가 포함되어 핵위치를 하지 못하는 염기서열(nls)을 도입한 pBIN35S:*nls-CaPR10-GFP*와 pBIN35S:*nls-CaLRR1-GFP* 재조합벡터도 제조하였다. 이들 재조합 벡터를 상기 실시예들과 마찬가지로 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)에 형질전환하여 *Nicotiana benthamiana* 잎에 접종한 후에 공초점레이저현미경 (Confocal laser scanning microscope)를 이용하여 세포내 발현 위치를 확인하였고 NLS를 포함하는 단백질은 핵에서 발현이 되고 돌연변이 서열을 가진 단백질은 모두 세포질에 위치함을 관찰하여 이들 염기서열이 정상적으로 작동하는 것을

확인하였다 (도 14 참조).

[0070] [단계 2]

[0071] CaPR10과 CaLRR1의 핵과 세포질 발현 조합을 달리하여 두 단백질의 발현위치를 분리함으로써 상호작용을 억제하기 위하여 실시예 1에서 이용한 pSPYNE, pSPYCE 벡터에 단계 1에서의 NLS/nls를 도입하여 pSPYNE:NLS-CaLRR1, pSPYCE:NLS-CaPR10, SPYNE:nls-CaLRR1, pSPYCE:nls-CaPR10 재조합 벡터를 제조하였고 이들 벡터를 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)에 형질전환한 후 *Nicotiana benthamiana* 잎에 접종하고 공초점레이저현미경 (Confocal laser scanning microscope)를 이용하여 상호작용 여부를 확인하였다. NLS/NLS 조합의 경우 핵에서 상호작용이 나타났고 nls/nls 조합에서는 세포질에서의 상호작용이 관찰되었지만 NLS/nls 혹은 nls/NLS 조합에서는 상호작용이 관찰되지 않았다 (도 15 참조). 아그로박테리움이 접종된 잎으로부터 단백질을 추출하여 핵단백질과 세포질 단백질을 분리하여 각각의 단백질 발현을 면역반응 통해 확인하였고 핵에서 발현되는 것으로 알려진 Histone 3(H3)와 세포질에서 발현되는 것으로 알려진 Heat shock complex 70(HSC70)의 항체를 이용하여 면역반응을 살펴봄으로써 각각의 단백질 발현이 유의함을 확인하였다 (도 15 참조).

[0072] [단계 3]

[0073] 상기 실시예에서 상호작용의 여부에 관련한 세포 사멸 반응을 관찰한 결과 CaPR10과 CaLRR1 단백질이 모두 세포질에서 발현하여 상호작용했을 경우에만 세포 사멸 반응이 일어났고 핵에서 모두 발현했을 때와 핵과 세포질로 분리되었을 때는 세포 사멸 반응이 나타나지 않았으며 이는 이온전도도 분석을 통해 양적으로 확인되었다 (도 16 참조).

[0074] [실시예 6] *CaPR10* 유전자 발현의 억제에 의한 병 감수성 증가

[0075] 고추 식물에서 *CaPR10* 유전자와 *CaLRR1* 유전자의 발현이 억제되었을 때 병저항성 변화를 알아보기 위하여 *CaPR10* 유전자와 *CaLRR1* 유전자를 바이러스 유래 Tobacco rattle virus (TRV) 벡터에 도입하여 TRV2:*CaPR10*과 TRV2:*CaLRR1* 재조합 벡터를 제조하여 바이러스 유도 유전자 침묵 (virus-induced gene silencing, VIGS)을 수행하였다(참고문헌: Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2:109-113). 이들 벡터를 상기 실시예에서 적용한 아그로박테리움에 형질전환시키고 이 균주를 고추 떡잎 생육기에 떡잎에 접종하여 새로 생성되는 잎에서의 이들 유전자의 발현 억제를 유도하였다.

[0076] [단계 2]

[0077] *CaPR10*과 *CaLRR1*의 발현이 억제된 고추식물에서 세균성병에 대해 저항성이 감소되는지 알아보기 위하여 상기 제조된 고추 식물에 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 접종한 후 각각의 식물에서 0일과 3일에 세균 증식을 살펴보았다. *CaPR10*과 *CaLRR1*의 발현이 억제된 고추식물에서 비병원성 균주에 감염되었을 때는 세균 증식에 변화가 없었지만 비병원성 균주에 감염되었을 때에는 *CaPR10*이 억제된 고추 식물과 *CaPR10/CaLRR1*이 모두 억제된 고추 식물에서 모두 세균 증식이 대조구 식물에서 보다 증가하였다 (도 17 참조). 그러므로 *CaPR10* 유전자가 세균성 점무늬 병균에 대한 병저항성에 관여함을 알 수 있었다.

[0078] [단계 3]

[0079] 상기 실시예 3, 5에서 *CaPR10*이 세포 사멸에 역할을 하고 있기 때문에 *CaPR10* 유전자 발현 억제 동안에 세포 사멸 변화를 관찰하였다. 트리판 블루 (trypan blue) 염색을 통해 죽은 세포를 관찰하여 보니 대조구 식물과 *CaLRR1* 유전자 발현이 억제된 식물에서는 비병원성 균주에 감염되었을 때 과민성 세포 사멸 반응이 일어나고 있었지만 *CaPR10* 유전자 발현이 억제된 식물에서는 세포사멸 반응이 감소하였다 (도 18 참조). 또한 이온전도도 분석을 통하여 세포 사멸을 양적으로 정량하여 *CaPR10* 유전자 발현 억제가 세포 사멸 감소에 영향이 있음을 확인하였다 (도 18 참조).

[0080] [단계 4]

[0081] 일반적으로 세포 사멸을 일으키는 신호전달경로가 활성화되면 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 증가가 수반되는 것으로 알려져 있다. 상기 식물에 세균성 점무늬 병균을 접종한 후 댁 (DAB) 염색을 통하여 활성산소를 확인한 결과 단계 3에서의 세포 사멸 결과와 일치하게 대조구 식물과 *CaLRR1* 유전자 발현이 억제된 식물에

서는 비병원성 균주에 감염되었을 때 강한 활성산소가 검출되었지만 *CaPR10* 유전자 발현이 억제된 식물에서는 검출이 되지 않았다 (도 19 참조). 댕 염색이 된 잎은 이미지를 취해 염색된 세포의 색 강도를 ImageJ 프로그램으로 분석하여 댕 염색 결과를 양적으로 정량하였다 (도 19 참조).

[0082] [단계 5]

[0083] *CaPR10* 유전자의 발현이 억제된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균에 대한 저항성 감소 결과에 따라 병방어관련 표지 유전자들의 발현을 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(Real-time RT-PCR) 실험을 통해 확인하였다. *CaPR1*, *CaDEF1*, *CaSAR82*, *CaPO2* 유전자들의 발현이 *CaPR10/CaLRR1*이 모두 억제된 식물에서 모두 감소하였고 이것은 *CaPR10/CaLRR1* 상호발현이 고추 식물의 저항성에 중요한 역할을 하고 있는 것과 *CaLRR1*이 *CaPR10* 조절자임을 알려주었다 (도 20 참조).

[0084] [단계 6]

[0085] 살리신산(salicylic acid, SA)은 병저항성 호르몬으로 알려져 있다. 상기 실험에서 이용된 세균성 점무늬 병균이 접종된 *CaPR10/CaLRR1* 발현 억제 고추 식물의 잎으로부터 살리실산을 추출하여 정량한 결과 비병원성 균주에 감염된 잎에서 *CaPR10* 유전자의 발현이 억제되었을 때 살리실산의 생성이 감소되었다 (도 21 참조).

[0086] [실시예 7] *CaPR10* 유전자와 *CaLRR1* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 병저항성 탐색

[0087] *CaPR10* 유전자와 *CaLRR1* 유전자의 식물체 내에서의 병 저항성 역할을 알아보기 위하여 실시예 3에서 이용된 재조합벡터 pBIN35S:*CaPR10*을 가지는 아그로박테리움 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)을 애기장대식물(*Arabidopsis thaliana*)에 꽃침지(floral dipping) 방법을 이용하여 도입하여 *CaPR10* 유전자의 구조적인 과발현을 유도하였다. 도 22에서 나타낸 또한 #9, #10, #13은 형질전환 식물의 계통번호이며 여기에서 *CaPR10* 유전자가 과발현되고 있음을 역전사 중합효소연쇄반응을 통해 확인하였다. 또한 이들 식물을 *CaLRR1*을 과발현하는 형질전환 애기장대 식물과 교배(crossing)를 통하여(참고문헌 Jung, H.W. and Hwang, B.K. 2007. Mol. Plant Pathol. 8:503-514) *CaPR10*과 *CaLRR1*을 모두 발현하는 형질전환 식물체를 제작하였고 각각의 식물에서 단백질을 추출하여 *CaPR10*과 *CaLRR1*에 특이적인 항체를 이용하여 발현 여부를 확인하였다 (도 23 참조).

[0088] [단계 1]

[0089] *CaPR10*과 *CaLRR1*을 과발현하는 애기장대식물의 생육 표현형을 관찰한 결과 단일 유전자 과발현 식물은 야생형(wild-type) 식물과 차이가 없었지만 두 유전자를 모두 과발현하는 애기장대식물은 생육속도가 다소 지연되는 표현형을 나타내었다 (도 24 참조).

[0090] 또한 이러한 생육 지연이 세포 사멸과 연관이 있는지를 알아보기 위하여 이들 식물의 잎을 트리판 블루(trypan blue) 염색을 실시한 결과 *CaPR10*과 *CaLRR1*을 모두 과발현하는 애기장대식물에서 미세한 세포 사멸이 관찰되었다 (도 25 참조).

[0091] [단계 2]

[0092] 상기와 같이 *CaPR10*과 *CaLRR1*이 과발현된 형질전환식물에 세균성 병균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*와 이 병원균의 비병원성 균주 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*avrRpm1*) 균주를 5×10^4 cfu/mL 농도로 접종하고 식물체의 변화를 관찰한 결과 *CaPR10*이 과발현된 식물에서는 이들 병균이 일으키는 병징이 나타나지 않았다 (도 26 참조). 또한 이 식물에서 접종 후 0, 3일에 잎을 수거하여 잎의 세균 증식을 측정한 결과 *CaPR10* 유전자가 과발현한 식물들에서 병원성 균주와 비병원성 균주의 증식이 모두 야생형 식물에서보다 억제되었다 (도 27 참조).

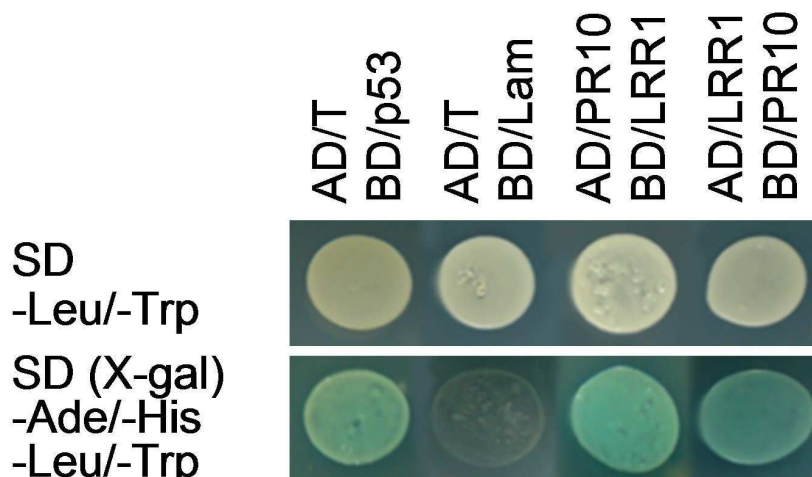
[0093] [단계 3]

[0094] 상기 단계 2에서와 같은 균주를 형질전환 식물에 10^8 cfu/mL 농도로 접종하고 트리판 블루 (trypan blue) 염색을 통해 죽은 세포를 관찰한 결과 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*) 접종되었을 때 *CaPR10* 유전자가 과발현한 식물에서 모두 세포 사멸이 증가하였고 이온전도도 분석을 통해 이것을 양적으로 측정하였다 (도 28 참조). 특히 *CaLRR1* 유전자가 함께 과발현한 식물에서는 단일 형질전환 식물에서보다 세포 사멸이 증가하였다 (도 28 참조).

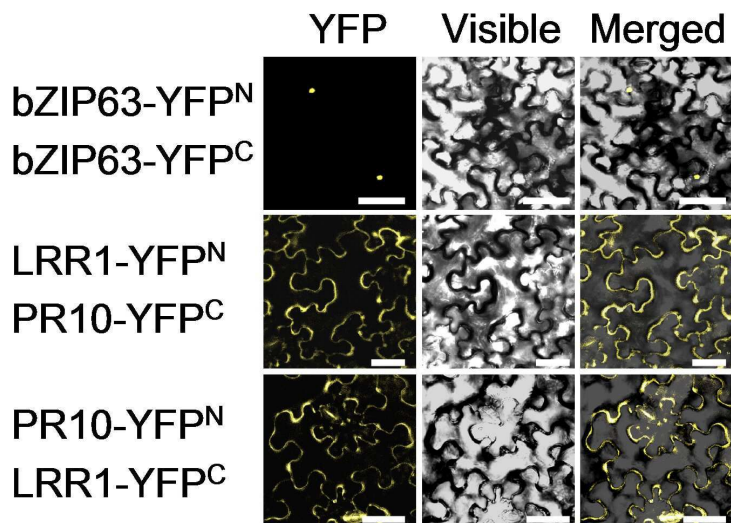
- [0095] [단계 4]
- [0096] 상기 단계 3에서 세포 사멸 관찰과 더불어 댐 (DAB) 염색을 통하여 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 확인한 결과 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*) 접종되었을 때 *CaPR10* 유전자가 과발현한 식물에서 모두 활성산소 생성이 증가하였고 양적으로 정량하였을 경우에도 마찬가지였다 (도 29 참조). 또한 *CaLRR1* 유전자가 함께 과발현한 식물에서는 단일 형질전환 식물에서보다 활성산소의 생성이 증가하였다 (도 29 참조).
- [0097] [단계 5]
- [0098] 상기 단계 4에서 실험한 식물로부터 RNA를 추출하여 병방어관련 유전자의 발현 여부를 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Real-time RT-PCR) 실험을 통하여 확인한 결과 *CaPR10* 유전자가 과발현한 식물에서 세포 사멸 표지 유전자인 *PR1*과 *SAG13* 유전자 발현이 증가하였으며 활성산소 표지 유전자인 *RbohD*의 발현도 증가하였다 (도 30 참조).
- [0099] [단계 6]
- [0100] 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)식물에 노균병(Downy mildew)을 일으키는 *Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2 병균을 상기 단계에서 이용된 형질전환식물에 접종하여 노균병에 대한 저항성 시험을 수행하였다. 야생형(wild-type)과 형질전환식물에 노균병균을 5×10^4 spore/mL 농도로 스프레이하여 접종한 뒤 17°C에서 습실처리하였다. 접종 후 1일 후 댐(DAB) 염색을 통하여 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 확인하였고, 2일 후에는 아닐린 블루(aniline blue) 염색을 통하여 칼로스(callose) 축적을 확인하였고, 5일 후에는 트리판 블루(trypan blue) 염색을 통하여 균사 및 포자 형성을 확인하였다. 7일 후에는 떡잎에 발생한 분생자경(sporangiophore) 수를 확인한 결과 *CaPR10*과 *CaLRR1*이 과발현한 식물에서 노균병균에 대한 저항성이 증가됨을 관찰할 수 있었다 (도 31 ~ 도 35 참조).
- [0101] 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

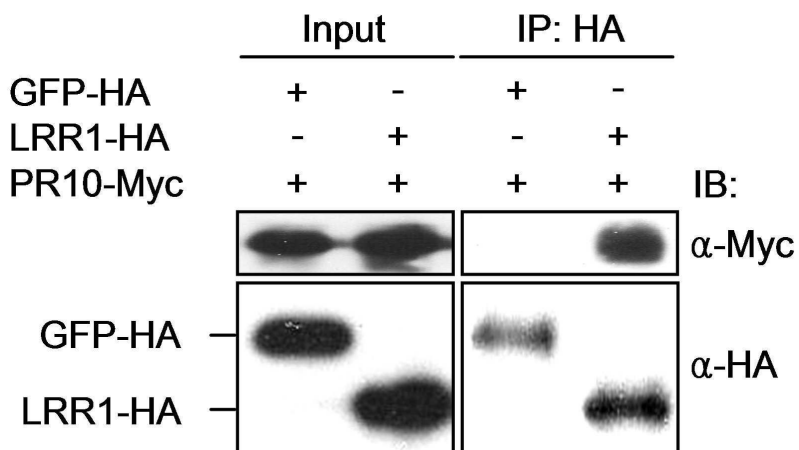
도면1



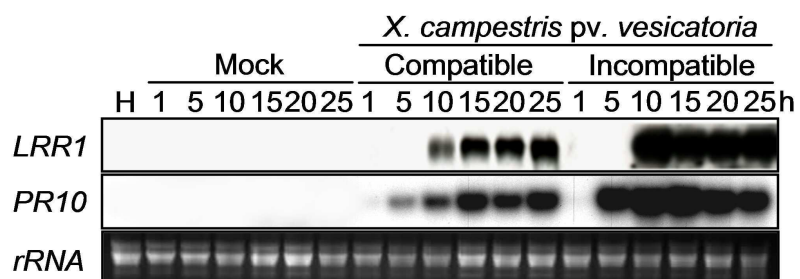
도면2



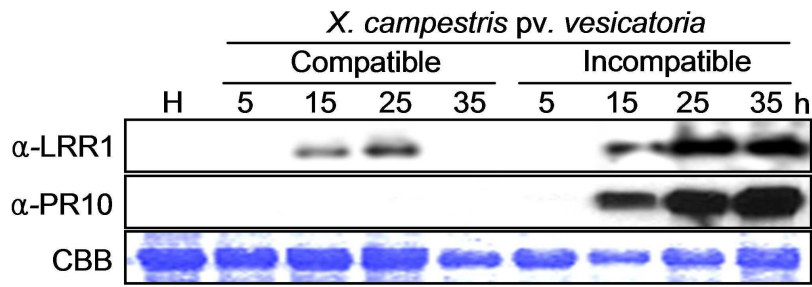
도면3



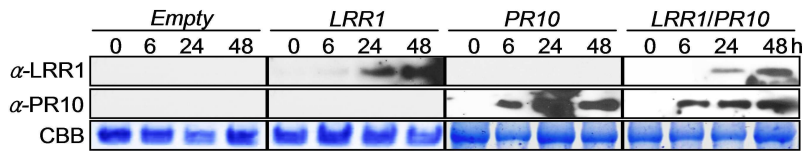
도면4



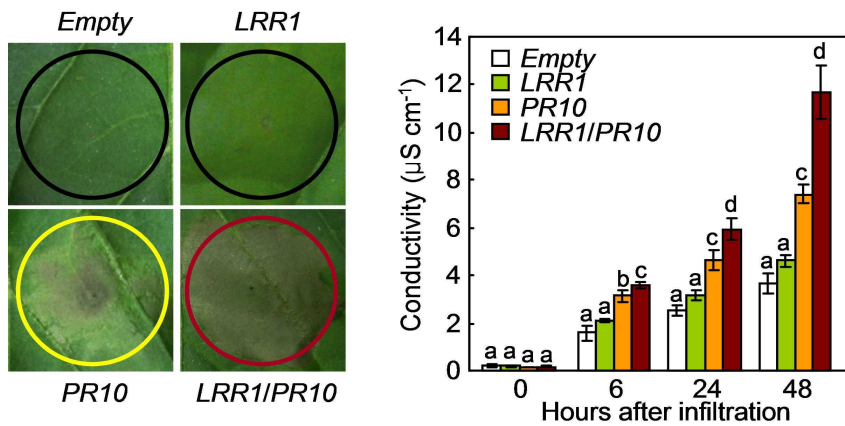
도면5



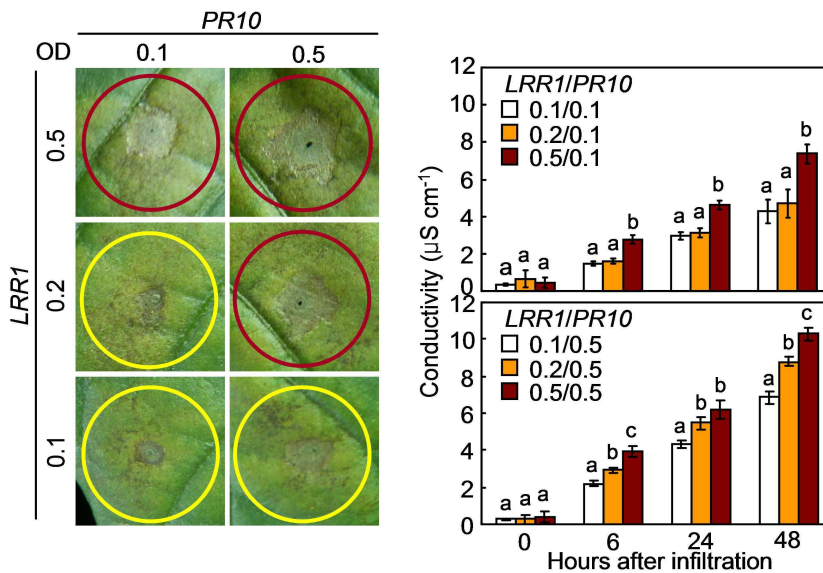
도면6



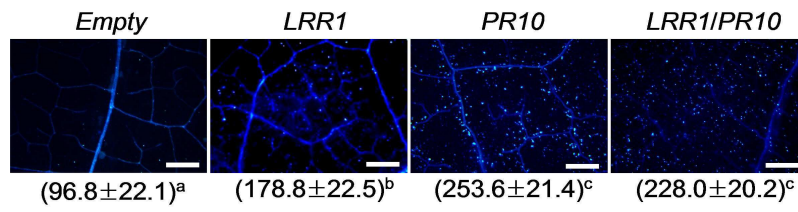
도면7



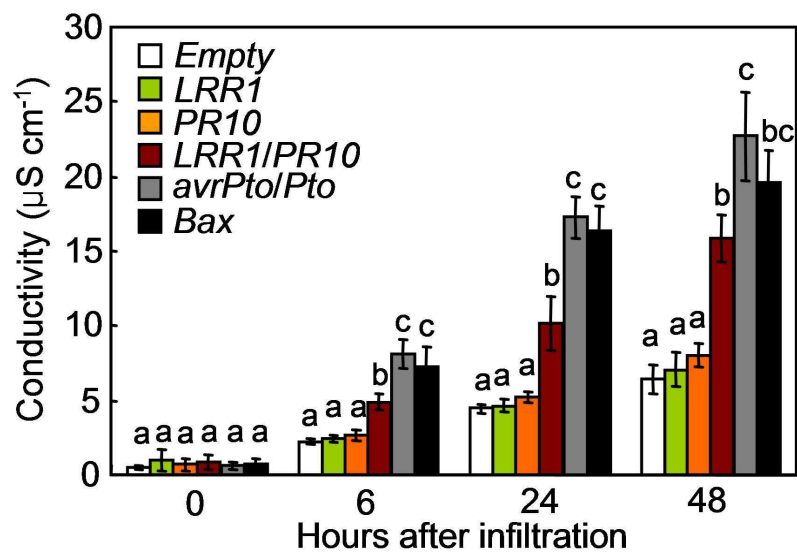
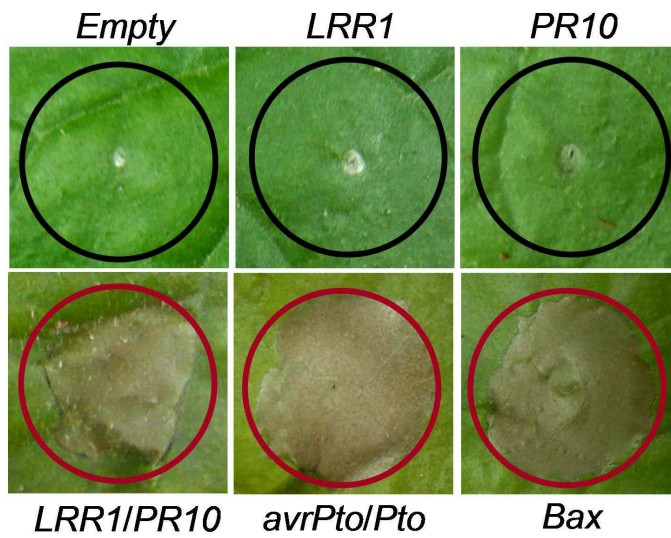
도면8



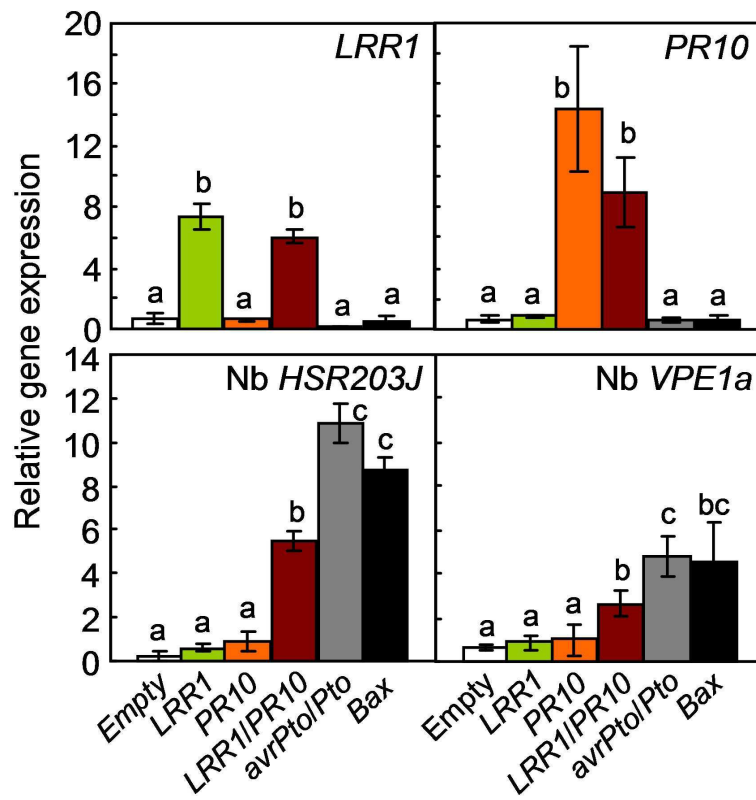
도면9



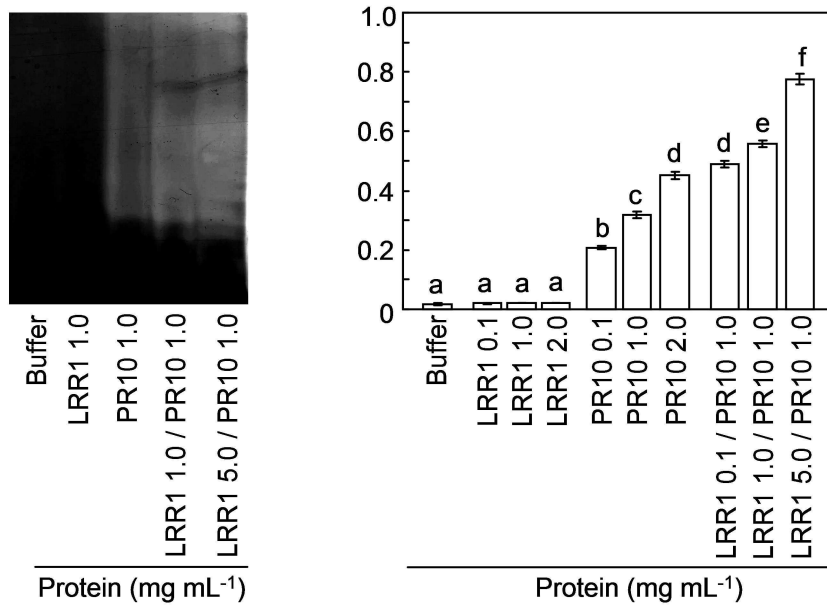
도면10



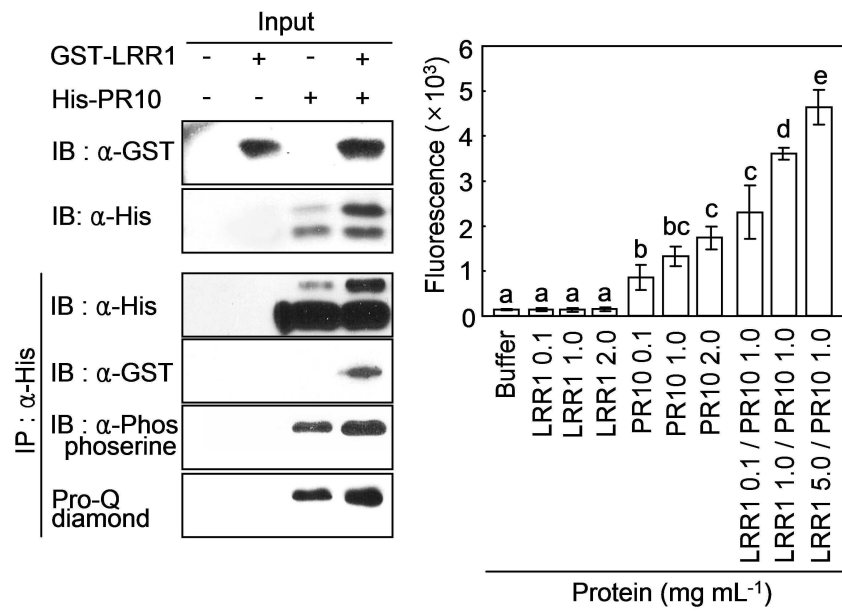
도면11



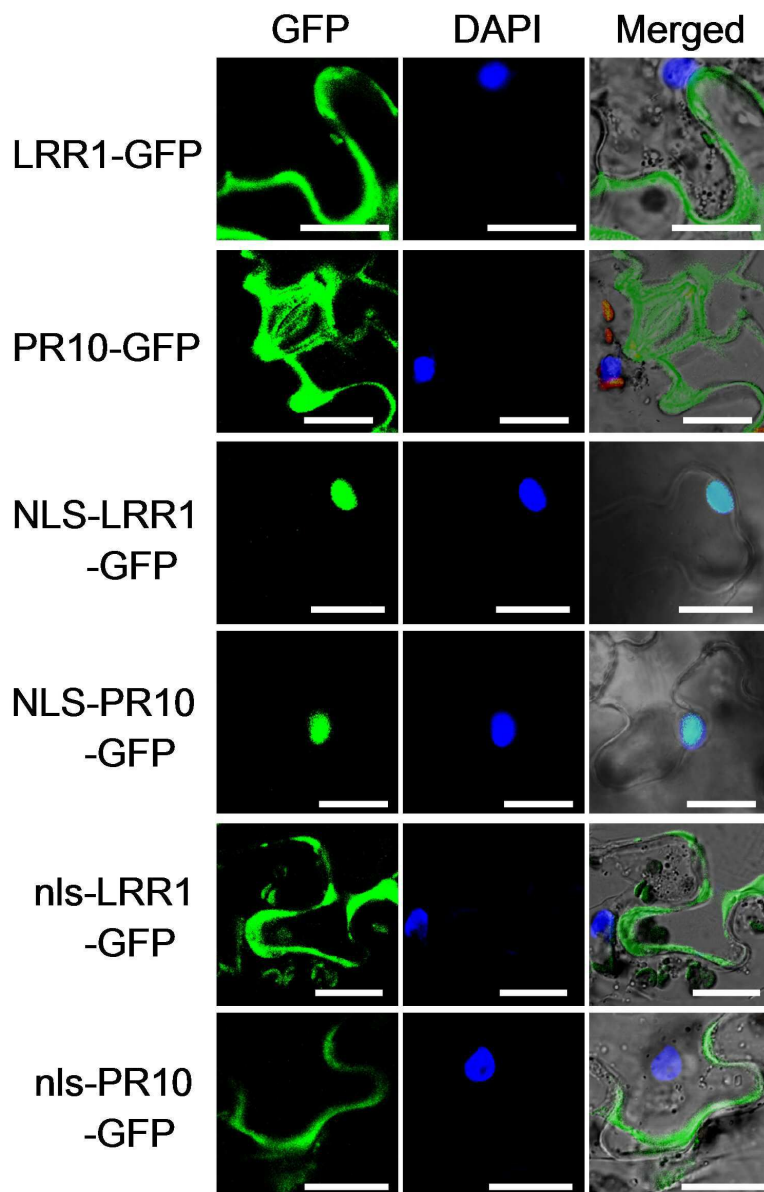
도면12



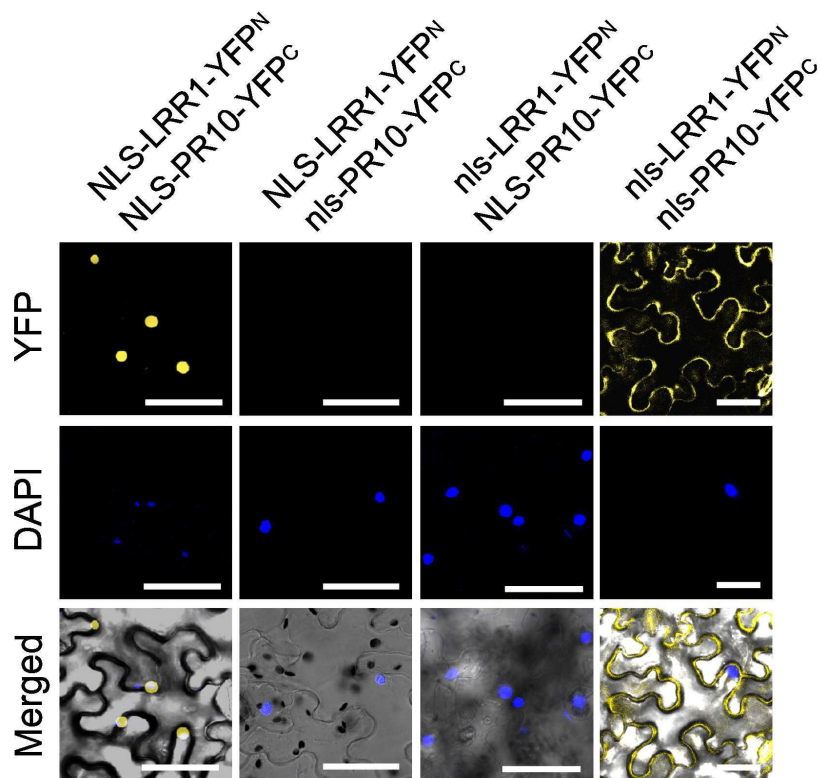
도면13



도면14

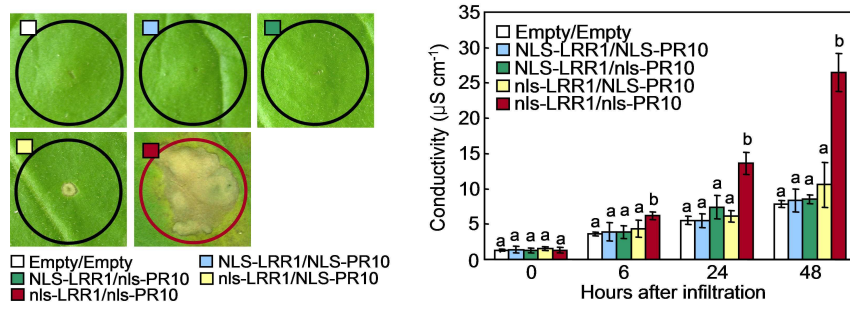


도면15

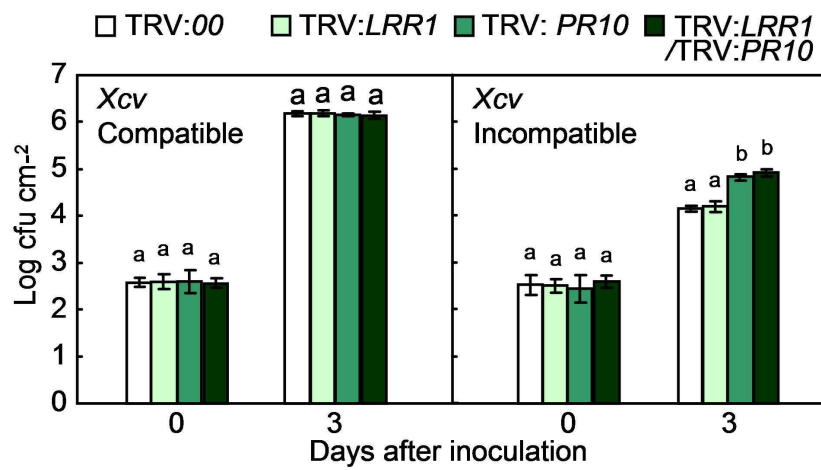


	Total				Nuclear				Cytoplasmic			
NLS-LRR1-Myc	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
NLS-PR10-HA	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
nls-LRR1-Myc	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
nls-PR10-HA	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
IB: anti-HA												
IB: anti-Myc												
IB: anti-H3												
IB: anti-Hsc70												

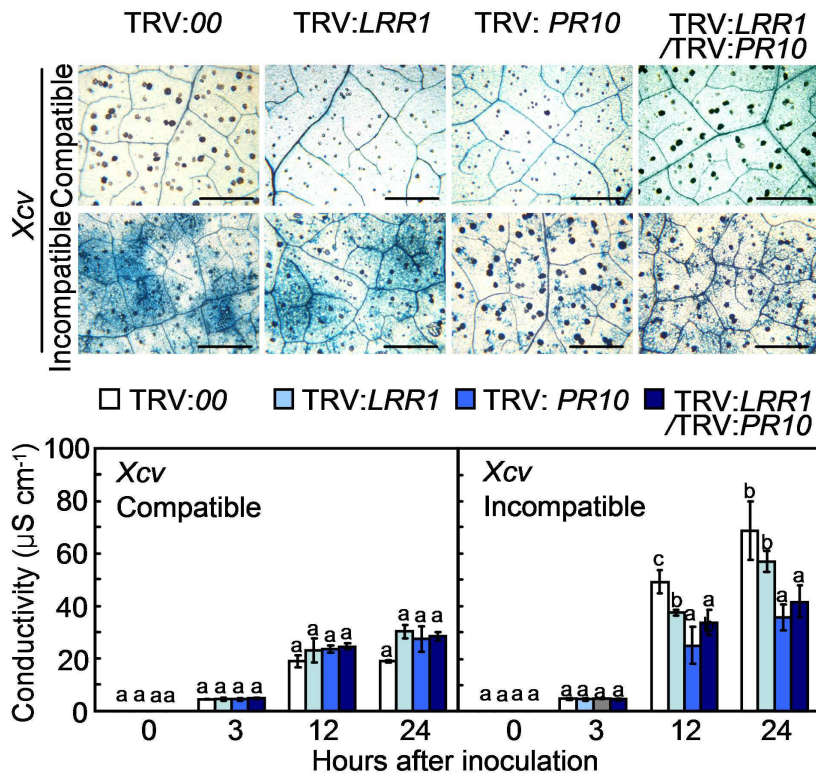
도면16



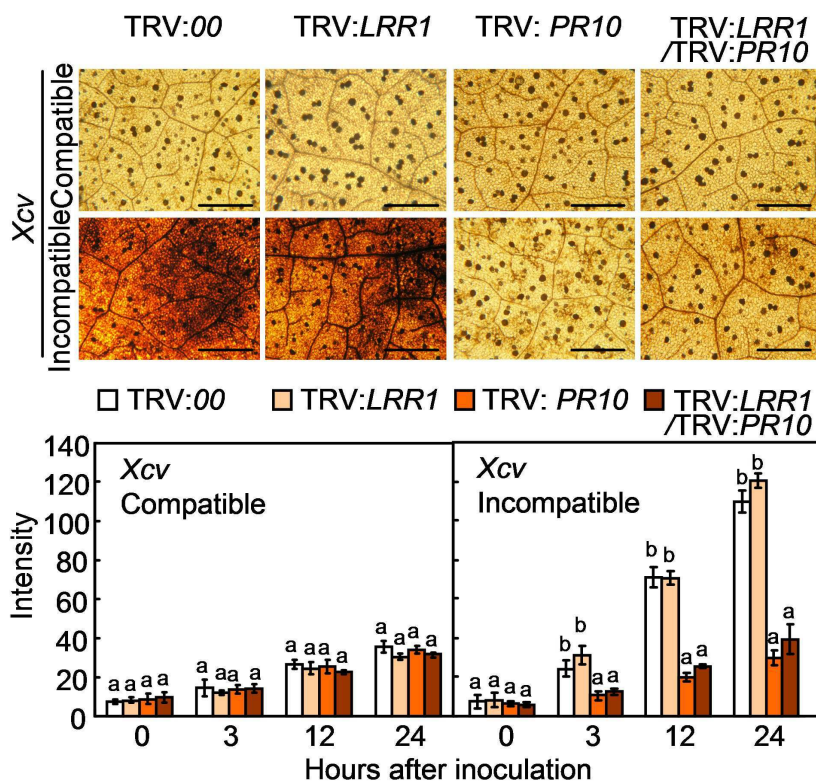
도면17



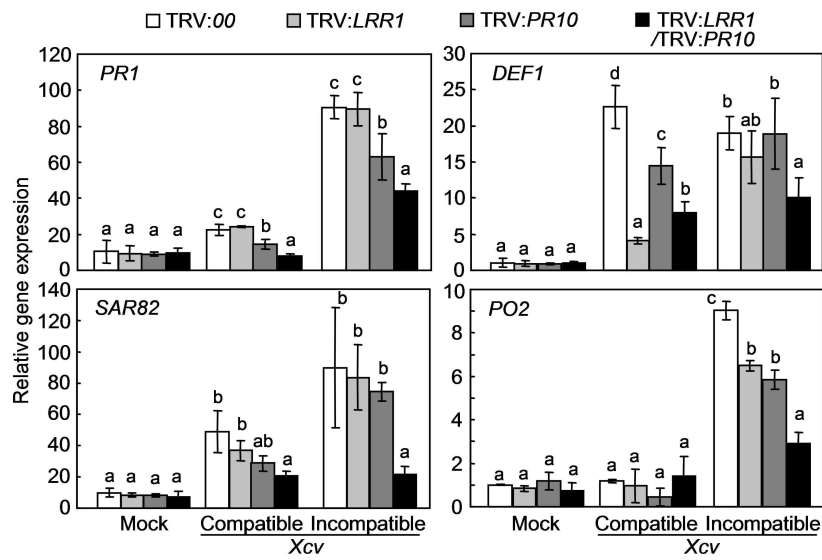
도면18



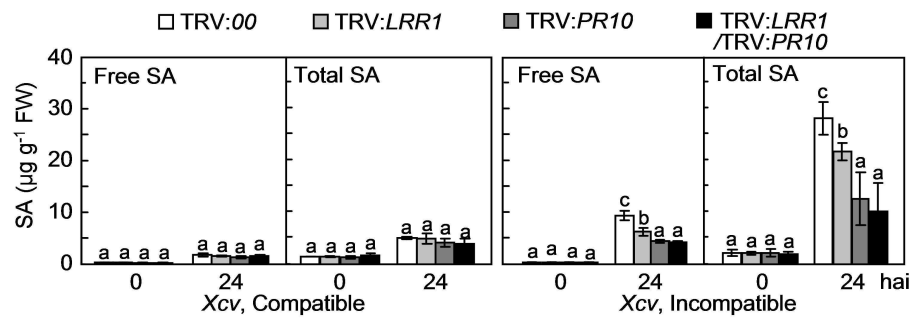
도면19



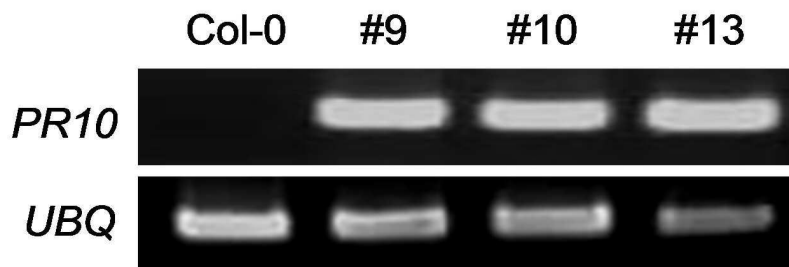
도면20



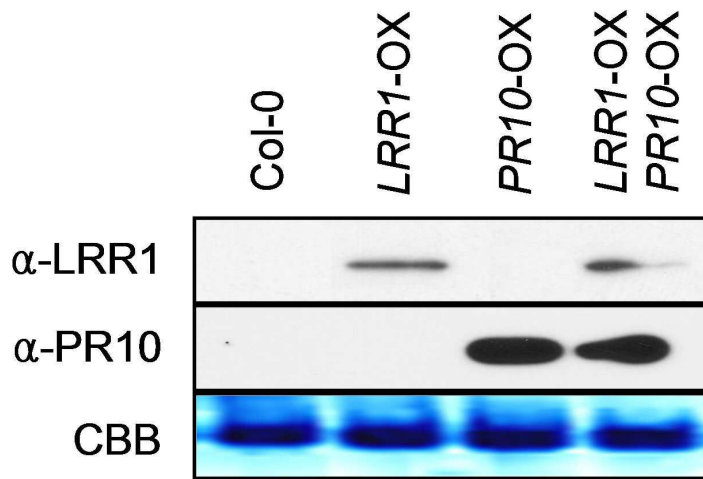
도면21



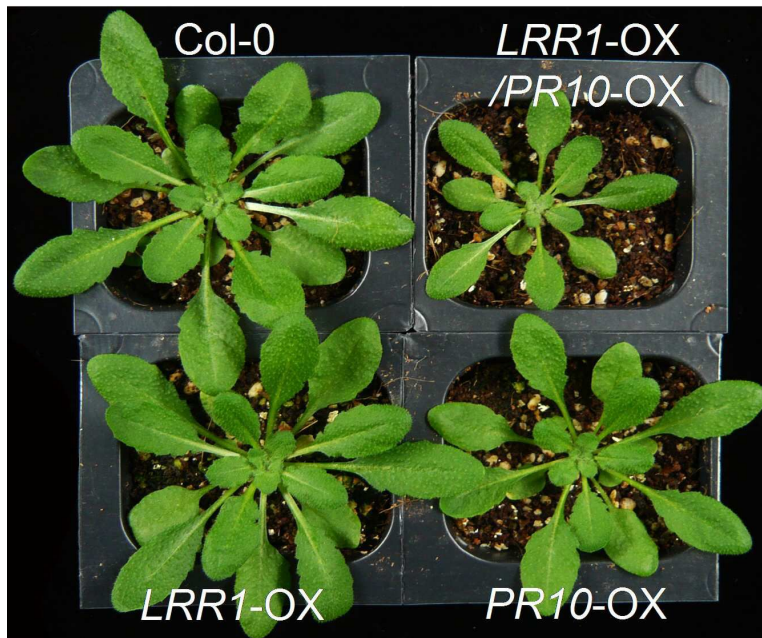
도면22



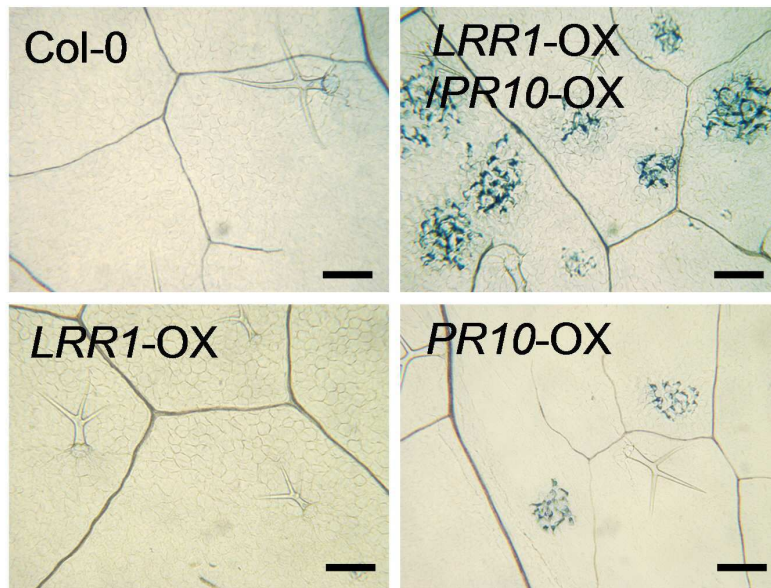
도면23



도면24



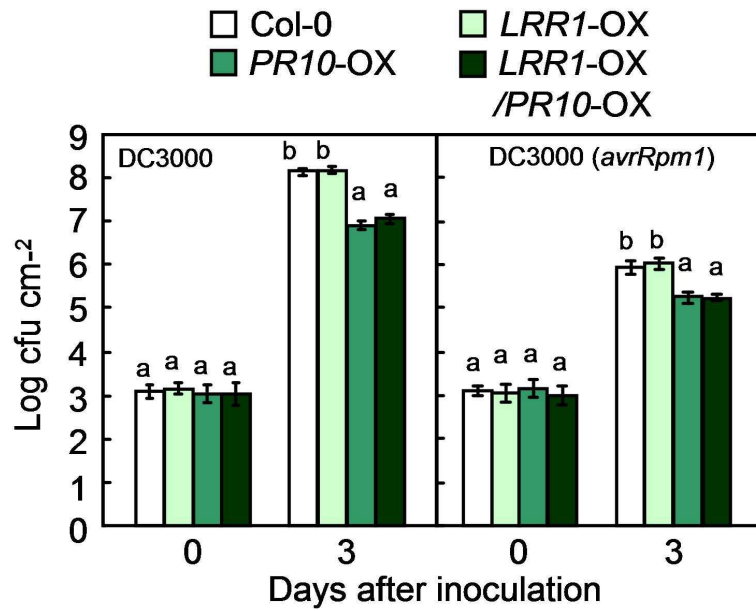
도면25



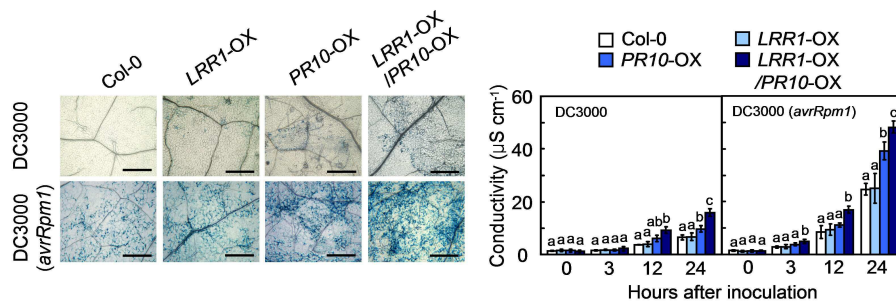
도면26



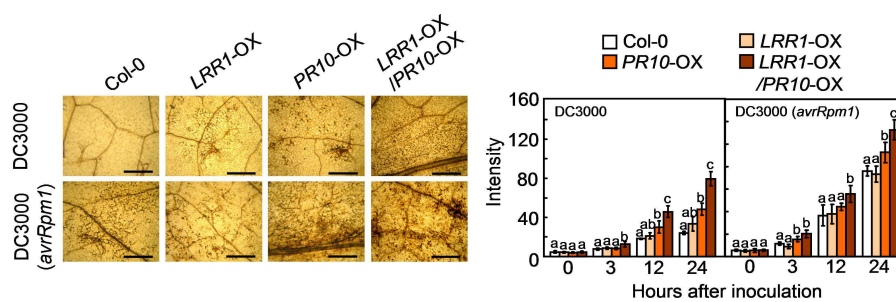
도면27



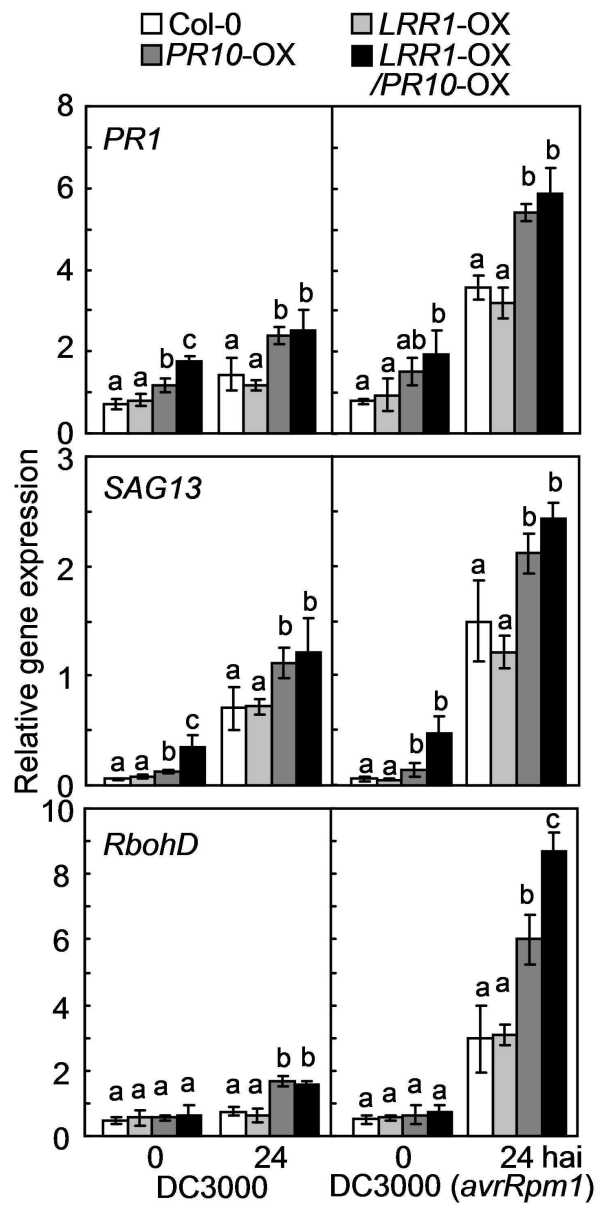
도면28



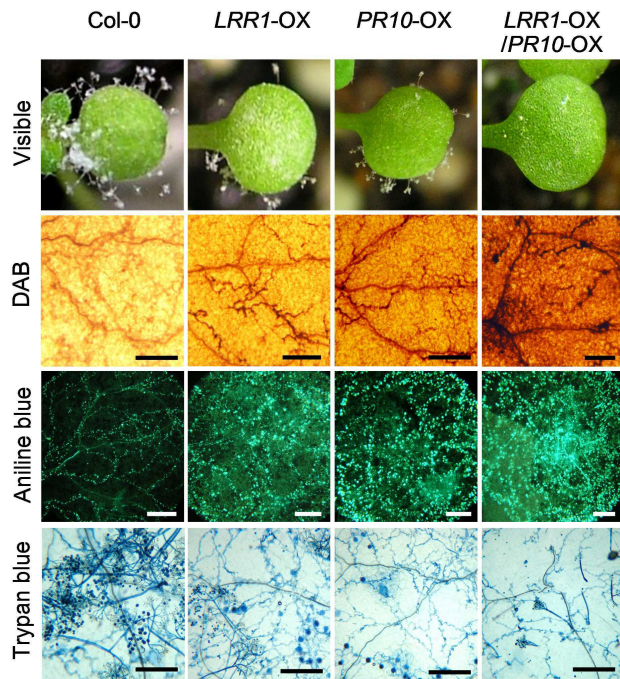
도면29



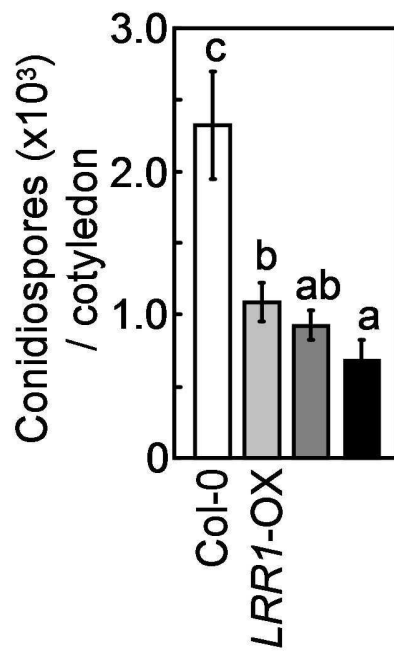
도면30



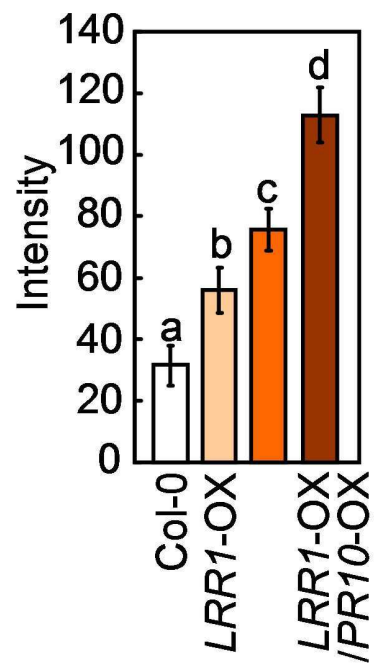
도면31



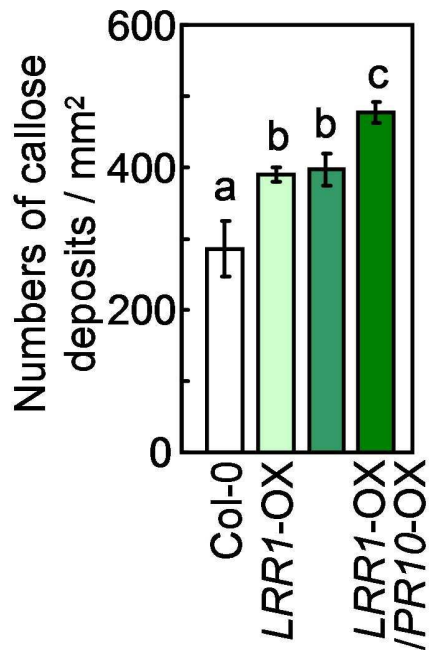
도면32



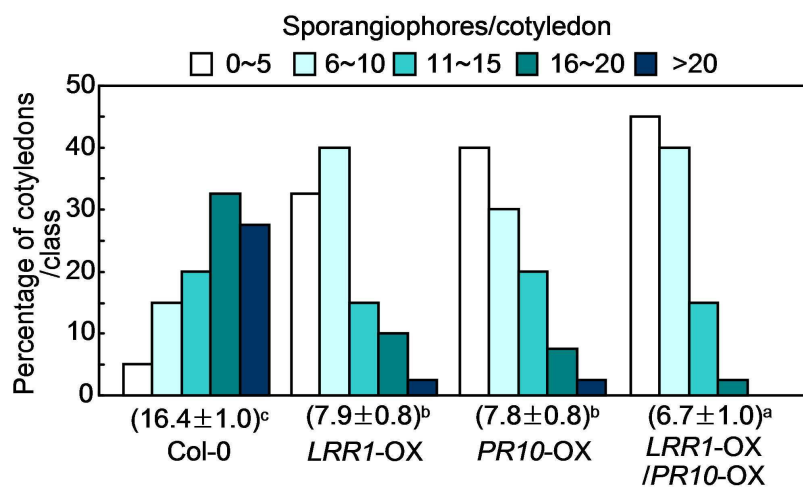
도면33



도면34



도면35



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Method for preparation transgenic plants disease-resistant and screening method of plant disease resistance using plant

pathogenesis-related protein and plant leucine-rich repeat
protein gene

<130> P11-120222-01

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nuclear localization sequence

<400> 1

ggccctaaaa agaagcgtaa gggt 24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutation of Nuclear localization sequence

<400> 2

ggccctaaaa acaagcgtaa gggt 24