

|                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                |                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                                                                                                            | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A)                                                                                                                                             | (11) 공개번호 10-2012-0079704<br>(43) 공개일자 2012년07월13일 |
| <hr/>                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                |                                                    |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C12N 15/29 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)<br>C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2011-0001046<br>(22) 출원일자 2011년01월05일<br>심사청구일자 2011년01월05일 | (71) 출원인<br>고려대학교 산학협력단<br>서울 성북구 안암동5가 1<br>(72) 발명자<br>황병국<br>서울특별시 서초구 사임당로17길 116, Apt 103<br>동1405호 (서초동, 서초삼성래미안)<br>황인선<br>서울특별시 성북구 동선동3가 35번지 301호<br>(74) 대리인<br>김선애 |                                                    |

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **고추의 병생성 관련 단백질 4 b 유전자 C a P R 4 b 및 이를 이용한 식물체의 병 저항성 탐색 방법**

### (57) 요약

본 발명은 고추식물의 세균병인 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균과 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 유도되는 유전자인 고추식물의 CaLRR1(Leucine-rich repeat protein1)과 상호작용하는 신규 유전자인 병생성 관련 단백질 4b의 유전자 (pepper pathogenesis-related protein 4b ; *CaPR4b*), 이를 이용한 저항성 식물체의 제작 및 항진균 제제에 관한 것이다. 상술한 본 발명에 의하면, 병 저항성 식물체의 육종을 위한 재료 및 항진균 제의 원료를 제공할 수 있고, 식물병 저항성에 대한 작용기작을 규명하는 도구로서 이용되어질 수 있는 이점이 있다.

### 대표도 - 도1

```

ctaactagagaacccactgcttactggcttatcgaaatataacgactcaactatagggg 59
attcactgttggcctactgggacaacacattatagcagctcttttagaaagaaaaagaa 119
ATGGAGAAAGGACTAGTACTACTTCTTAGCCCTAGTCTCTTCATCGTATCCGGA 179
[M E K R T S T T I L L A L V L F I V S G] 20
GTGGCCACGACAGCACTGCGGAGGCGAAGGGCGGAGCCTTATGCGGCGAAGCTTA 239
[V A N A] Q Q C G R Q R G G A L C G S N L 40
TGTTCAGCCAAATTGGATGGTGGATCGACACCGAATCTGTTCACCTAGCCAGGT 299
C C S Q F G W C G S T P E Y C S P S Q G 60
TGCCAGAGCCAAATGCGAGTGGTGGTCCGACTCCAGAGGAGCGCGCAAAATGTAGCT 359
C Q S Q C S G S G P T P E G S A Q N V R 80
GCAACGTATCATTTGTATAACCCGCAAGATGTGGTGGGACTTGAATGCTGTAGTGT 429
A T Y H L Y N P Q N V G W D L N A V S A 100
TATTGCTGACATGGGATGCTAATAAGCCTTTGGCTTGGAGGAGCAATATGTTGGACT 479
Y C S T W D A N K P L A W R S K Y G W T 120
GCTTTCGTGGTCTGTTGGACCTGGTCAAGCCTCCTGTGGCAATGCTTAAGGGTC 539
A F C G P V G P R G Q A S C G K C L R V 140
ACAAACAGACGACACGAGCTCAACACACGGTGAGAAATCGTGATCAATGACGACACGGT 599
T N R R T R A Q T T V R I V D Q C S N G 160
GGACTAGACTTGGACATTAACGTTTTCGGCAATCGACACAGACGAGTGGGAATCAA 659
G L D L D I N V F R Q I D T D G V G N Q 180
CAAGGTCACTTATGGTGACTACCAATTGTTAATTGCGGTGACAAATGTGAATGTTCT 719
Q G H L M V D Y Q F V N C G D N V N V P 200
CTCTTGTCTGTAGTTGACACAAATGAGGagccacatggctctgttttagtctgatgaata 779
L L S V V D T Q * 208
8 780

```

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

식물병 방어 관련 유전자로서 고추 유래 병생성 관련 단백질 4b를 코딩하는 하기 (a) 또는 (b)의 분리된 유전자(*CaPR4b*):

- (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자;
- (b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자.

### 청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(*CaPR4b*).

### 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 *CaPR4b* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성 탐색방법.

### 청구항 6

제2항 기재의 *CaPR4b* 단백질의 항체를 프로브로 이용하여 *CaPR4b* 단백질 발현여부를 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성 탐색방법.

### 청구항 7

제2항 기재의 단백질을 유효성분으로 포함하는 식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 항진균 제제.

## 명세서

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 식물병 방어 관련된 신규 유전자인 고추식물의 Leucine-rich repeat protein (LRR)인 CaLRR1과 상호작용하는 고추 병생성 관련 단백질4b의 유전자 (pepper pathogenesis-related protein 4b, *CaPR4b*), 이를 이용한 병저항성 형질전환 식물체 및 병 저항성 탐색방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주와 비병원성 균주에 감염될 때 저항성 반응에서 강하게 발현되는 식물병 방어 관련 신규 유전자인 *CaPR4b* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 제공하며, 이를 이용하여 생물적/화학적/물리적 저항성 유도 처리 시 저항성 관련 유전자 *CaPR4b*의 차별적인 발현여부 및 *CaPR4b*의 펩타이드를 사용하여 제작된 항체를 이용한 면역반응으로 *CaPR4b*의 단백질 수준의 발현 여부를 탐색하는 식물체의 저항성 탐색방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 아그로박테리움 매개 일시 발현(Agrobacterium-mediated transient expression) 방법을 통하여 식물에서 *CaPR4b* 유전자의 저항성에서의 역할을 탐색하였고, 상기 *CaPR4b* 유전자를 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에 형질전환을 통해 도입, 과발현(overexpression)시켜 *CaPR4b* 유전자의 식물체 병저항성 증대효과를 확인하여, 이를 통한 식물병 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 고추는 가지과에 속한 우리나라에서는 오래전부터 김치등의 한식요리에서 중요한 조미료로 사용되고 있는 대표적인 경제작물로 원산지인 남미의 여러 나라를 비롯하여 전 세계적으로 재배되고 있는 작물이다. 국내 채소 종자 중 단일 품목으로는 가장 큰 규모를 자랑할 정도로 많은 재배량을 보이고 있는 대표적인 경제작물이다. 국내의 연간 소비량은 일인당 건고추 기준으로 3.5kg이며 소비량은 20만 톤 규모로 시장규모는 1조원에 이르는 것으로 추정되고 있는 쌀 다음으로 주요한 작물이라고 할 수 있다. 그러나 선진국에서는 고추의 중요도가 상대적으로 낮아 연구가 취약하고 본격적인 투자와 연구가 이루어지지 않은 상태이다.
- [0003] 또한 고추는 세균병, 진균병, 바이러스병이 다양하게 보고되고 있으며 난균류에 의한 역병과 진균에 의한 탄저병 및 세균에 의한 세균점무늬병에 대한 피해가 가장 심각하게 보고되고 있다. 병원균들의 피해는 고추의 수확량 감소 및 질적 저하를 가져오고 있어 이러한 문제들을 해결하기 위하여 안정적인 생산, 농약과 노동력 절감에 따른 생산비의 절감 및 환경을 고려한 고추의 내병성 품종의 육종이 중요한 목표로 인식되어지고 있다.
- [0004] 특히, 고추의 세균성 점무늬병은 잎, 잎자루, 줄기, 과경 및 열매에 나타나며 암갈색의 원형이나 부정형의 작은 점무늬를 형성하여 낙엽을 유발하고 수확량을 감소시키는 병으로서 더듬이병 또는 반점세균병으로도 불리우며 심각한 수준의 피해를 보이고 있다. 이러한 고추 세균성 점무늬병은 농약을 이용한 화학적 방제가 어려우므로 고추 세균성 점무늬병에 대한 피해를 최소화하기 위하여 고추 식물의 재배환경을 조절하여 경종적으로 방제하고 저항성 고추품종의 개발 및 생물학적 방제등을 적절히 사용하는 것이 농민들에게 가장 효율적이고 경제적인 방제방법이다. 이들 방제 방법 중에서 병에 대하여 저항성을 가지고 있는 고추 품종의 개량 및 육종을 위하여 생명공학 기술을 이용한 유용한 고추방어유전자를 이용하는 분자적 육종기술개발이 21세기 고추생산에 가장 바람직하다고 할 수 있다.
- [0005] 병해충에 의한 작물생산 피해를 최소화하기 위하여 고추를 비롯한 다양한 경제 작물의 병 저항성 품종의 육성 프로그램들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 병 저항성에 대한 이해 및 이의 실제적 응용을 위해 식물에서의 저항성 기작에 대한 연구에서 고추가 모델식물로서 사용되고 있다.
- [0006] 식물이 병에 감염되면, 기주식물은 여러 가지 세포내 대사 경로에서 방어기작을 작동시켜서, 병원균 감염 초기에 기주식물과 식물병원균간의 상호작용에서 친화적, 불친화적 반응으로 나뉘어 결정되고, 이에 따라 병의 진전을 제한시킬 수 있는지의 저항성(방어)반응 여부가 결정되는 것이다.
- [0007] 불친화적 저항성 반응에서, 감염된 식물은 병원균의 침입을 인식(recognition)하고, 이에 대하여 감염부위의 세포에 국부적 세포 죽음과 같은 과민성 반응(hypersensitive response), 켈러스(callose)의 축적, 리그닌(lignin)화에 의한 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 피토알렉신(phytoalexin) 등 여러 종류의 항균성 물질을 생성하고, 소위 병생성 관련 단백질[pathogenesis related (PR) protein]이라 불리우는 방어관련단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 이러한 식물방어 기작들은 병원균이 침입하는 경우뿐만 아니라, 에틸렌이나 메틸 자스모네이트 등 인위적인 자극에 의해서도 나타나며, 물리적 상처나 염도, 온도 등의 환경적 스트레스에 의해서도 나타난다고 보고되고 있다.
- [0009] 인위적인 생물학적/물리적/환경적 스트레스에 대하여 식물은 방어 반응을 나타내게 되는데 특히 식물이 병원체에 대하여 방어할 수 있는 능력에서 중요한 역할을 하는 것에는 식물과 병원균의 상호작용에 의한 식물의 병 저항성의 발현과 이에 관련된 신호전달경로이다. 이에 관하여, 식물의 병 방어 기작 및 그와 관련된 유전자가 어떻게 병원균을 인식하고 인식의 결과 어떠한 전달 경로를 통하여 식물 전체에 반응을 하게 되는지 중요하게 연구되어져 왔으며 주된 관심사는 생물학/생화학/세포생물학적인 방법을 이용한 병 저항성(방어) 유전자의 기능에 대한 연구를 통하여 이루어져 왔다.
- [0010] 이러한 병 저항성(방어) 유전자의 기능에 대한 연구는 식물의 생리 및 저항성에 관련된 기작을 연구에 대한 가치를 가짐은 물론, 연구 대상 작물의 분자유종을 통한 저항성 품종의 개발에 기여할 수 있다. 근래의 작물 분자유종기술에 대한 연구는 유전공학적 기술의 개입에 의하여 가속화 되었으며, 병 저항성(방어) 유전자를 통한 작물 분자유종은 모든 종의 유전자를 재료로 사용할 수 있으며 기존의 계통단위로 가능하던 육종기술을 유전자 수준에서 가능하도록 하여 보다 효과적인 육종 효과를 보이며 이러한 육종의 효과에 대한 조절이 가능하다는 면에서 현재의 육종의 기술을 극대화시킬 수 있다는 장점이 있다.

[0011] 한편, 병생성 관련 유전자 4b (pathogenesis-related protein 4b, *PR4b*)는 감자, 담배, 토마토, 애기장대, 보

리, 벼, 미, 옥수수과 같은 많은 식물들이 함유하고 있으며 특히 밀에서 연구된 병생성 관련 유전자 4 (pathogenesis-related protein 4, *PR4*)는 in vitro에서 병원성 진균에 대하여 생장을 억제시킨다는 보고가 있었다. 또한 도열병균과 담배모자이크바이러스의 감염 후에도 유도되어지는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 *PR4* family는 병원균이나 외부자극에 의하여 강하게 유도되어지고 있으며, 특히 애기장대 식물에서는 병원균의 감염 이후에 자스모닉 산과 에틸렌 경로에 의존적이라는 보고가 있었다. 또한 *PR4* family는 키틴결합 도메인을 포함하고 있는 형태와 그렇지 못한 형태로 나눌 수 있다. 그러나 이러한 연구결과와는 달리 *PR4* family에 대한 기능에 대한 연구는 아직은 미비하다. 본 발명은 고추의 병생성 관련 유전자 4b (pathogenesis-related protein 4b, *CaPR4b*)의 기능을 *CaPR4b* 유전자를 과발현 시킨 애기장대 식물과 이 유전자를 담배식물에 아그로박테리움 매개 일시 발현(*Agrobacterium*-mediated transient expression)를 통한 평가 및 재조합 단백질의 세균성 및 진균성 병원균에 대한 *CaPR4b*의 반응을 통하여 저항성 검정 평가가 가능하게 하였다. 이러한 발명은 고추의 방어 관련 유전자 4b의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 저항성 반응의 유전자 정보를 축적할 수 있게 되어 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병 저항성이 증진되는 유전공학적 식물을 개발하거나 식물의 저항성 유전기작을 촉진하도록 작동하는 식물보호 화학물질을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있을 것이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 방어 관련 유전자의 하나인 고추식물의 Leucine-rich repeat protein (LRR)인 *CaLRR1*과 상호작용하는 신규 유전자인 고추의 병생성 관련 유전자 4b (pathogenesis-related protein 4b)를 코딩하는 *CaPR4b* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.
- [0013] 또한 본 발명의 목적은 상기 *CaPR4b* 유전자를 이용하여 식물병 또는 화학물질에 대한 저항성 존재 여부를 탐색하는 식물체의 저항성 탐색방법을 제공하고자 하는 것이다.
- [0014] 더 나아가, 본 발명은 상기 *CaPR4b* 유전자를 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제작하는데 그 목적이 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

### 과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 상기 목적은, 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광 고추 품종으로부터 분리한 고추식물의 Leucine-rich repeat protein (LRR)인 *CaLRR1*과 상호작용하는 신규 병생성 관련 유전자 *CaPR4b*를 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 생물적/화학적 처리를 통하여 *CaPR4b*의 발현 여부를 조사하고, 고추식물과 이 유전자를 아그로박테리움 매개 일시 발현(*Agrobacterium*-mediated transient expression) 방법을 이용하거나, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 형질전환을 통한 *CaPR4b* 유전자의 과발현을 통하여 식물병 저항성 유도를 확인하여 달성하였다.
- [0017] 따라서 본 발명은 식물병 방어 관련 유전자로서 (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 병생성 관련 단백질 4b를 코딩하는 유전자 또는 (b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자(*CaPR4b*)를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 병생성 관련 단백질 4b(*CaPR4b*)를 제공한다.
- [0019] 또한 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 제조한 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 상기 재조합 벡터는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 pBIN35S:: *CaPR4b*이다.
- [0020] 나아가, 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터를 이용하여 제조한 형질전환된 식물체를 제공한다. 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른

잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 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-코딩된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시엔스 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] 나아가 본 발명은 식물체로부터 RNA 분리하여 *CaPR4b* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계 또는 상기 *CaPR4b* 단백질의 항체를 프로브로 이용하여 *CaPR4b* 단백질 발현여부를 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명은 상기 *CaPR4b* 단백질을 유효성분으로 포함하는 식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 항진균 제제를 제공한다. 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 진균은 바람직하게 *Alternaria brassicicola*이다.

[0023] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0024] 본 발명은 고추식물의 세균병인 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균과 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 유도되는 유전자인 고추식물의 Leucine-rich repeat protein (LRR)인 CaLRR1을 GAL4 DNA binding 도메인을 포함하는 pGBKT7에 도입시켜 pGBKT7:CaLRR1을 제조한다. 또한 비병원성 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 감염된 식물에서 추출한 cDNA library는 GAL4-activating 도메인을 포함하는 pGADT7 벡터에 도입시켜 재조합 벡터를 만든다. 이렇게 만들어진 pGBKT7:CaLRR1과 pGADT7 벡터에 도입시킨 고추식물의 cDNA library를 yeast AH109에 lithium acetate 방법을 이용하여 Yeast-two-hybrid assay를 실행하여 형질전환시켜준다. 이렇게 형질전환한 형질전환체들은 서로간의 상호작용을 확인할 수 있는 선택배지 (아데닌(Adenine)-히스티딘(Histidine)-류신(Leucine)-트립토판(Tryptophan)이 결여되어있는 배지)로 옮겨준 후 상호작용이 확인된 유전자들 중에서 병 방어(저항성)에 관련될 것으로 추정되는 유전자를 선발하여 클론을 수득하고, 이 클론 중 병생성 관련 단백질 4b(*CaPR4b*) 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독(Sequencing)함으로써, *CaPR4b*로 명명된 고추 녹광 품종의 *CaPR4b* 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그로부터 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).

[0025] 본 발명에 의한 상기 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트(Blast) 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 *CaPR4b* 단백질 코딩 유전자를 확인하고 병생성 관련 단백질 4b(*CaPR4b*)의 유전자(*CaPR4b*)로 명명하였다. *CaPR4b* 단백질은 아미노산 서열의 비교결과 전체 해독이 이루어지지 않은 다른 품종의 고추식물 (*Capsicum chinense*)과 100%의 상동성을 나타내었고, 감자, 애기장대의 PR family와 80% 이상의 상동성을 나타내었다. 이 유전자는 고추 세균성점무늬병 이외에도 여러 가지 병원균에 대하여도 저항성 작용을 갖는 22kDa의 분자량을 지닌 단백질이다. 확인된 *CaPR4b* 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다. 본 발명에 의한 병생성 관련 단백질 4b(*CaPR4b*)은 식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 따라서 본 발명에 의한 단백질을 이용하여 항진균 제제를 제공할 수 있다.

[0026] 또한 상기 *CaPR4b* 단백질의 항체를 프로브로 이용하여 *CaPR4b* 단백질 발현여부를 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 상기 *CaPR4b* 단백질의 항체를 제작하는 방법 및 *CaPR4b* 단백질 발현여부를 확인하는 방법은 본원발명이 속하는 당업계에서 공지된 다양한 기술을 이용할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은, 식물 호르몬성 화학물질인 살리실산, 또는 메틸자스모네이트 등 병원성 세균이 아닌 비생물적 유도방법을 식물체에 처리하고, 이에 대하여 상기 저항성 탐색방법을 이용하여 *CaPR4b* 단백질 발현 여부를 확인함으로써, 더 용이하고 시간을 절약할 수 있는 새로운 저항성 유도방법을 제공한다.

[0028] 다음에, 본 발명은 생물적/화학적 처리를 한 식물체로부터 RNA 분리하여 *CaPR4b* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균 등 병원균을 예로 들 수 있다. 상기 화학적 유도체는 살리실산 (Salicylic acid) 및 메틸자스모네이트 (Methyl jasmonate) 등을 예로 들 수 있다. 상기 *CaPR4b* 유전자 발현 여부 확인은 노던 블롯, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다

양한 방법들이 이용될 수 있다. 본 발명에 의한 *CaPR4b* 유전자가 식물병원균, 식물 호르몬 또는 화학적 유도체에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다. 따라서 본 발명에 의한 *CaPR4b* 유전자는 식물체의 저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 담배식물에서 상기의 *CaPR4b* 유전자가 일시적으로 과발현을 일으키도록하는 아그로박테리움 매개 일시 발현(Agrobacterium-mediated transient expression) 방법을 이용하여 식물에 상기의 유전자가 미치는 영향을 확인하고, 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성 생성여부를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다.

[0030] 나아가 본 발명에 의한 *CaPR4b* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S::*CaPR4b*)를 식물체에 도입하여 본 발명에 의한 *CaPR4b*이 과발현된 형질전환 애기장대 식물을 제조하여 식물병 저항성의 증대를 확인할 수 있었다.

[0031] 본 발명에 의한 병생성관련 유전자 4b을 과발현 시킨 애기장대 식물을 통하여 식물병원균에 대한 저항성 검정평가를 수행하여 병 저항성 발생여부를 알아 볼 수 있게 되었다. 이러한 본 발명으로 병생성관련 유전자 4b의 병에 대한 반응 및 이 고추식물의 Leucine-rich repeat protein (LRR)인 CaLRR1과의 상호작용을 통한 저항성 반응의 변화 등의 연구를 통하여 관련 정보를 축적할 수 있게 되어 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병 저항성이 증진되는 생명공학식물을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있을 것이다.

### 발명의 효과

[0032] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 고추 식물 세균병인 고추 세균성 점무늬병에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 방어 관련 유전자인 신규한 병생성 관련 단백질4b을 코딩하는 *CaPR4b* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공함과 동시에, 이 유전자 및 단백질의 항체를 이용하여 식물체의 저항성 탐색방법을 제공할 뿐 아니라 저항성 식물 육종 및 형질전환 식물체 제작에 기여하는 효과를 도모할 수 있게 되었다.

[0033] 따라서 본 발명은 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있는 효과가 있으므로 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 병생성 관련 단백질 4b (*CaPR4b*) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 병생성 관련 단백질 4b (*CaPR4b*) 유전자의 아미노산 서열을 다른 식물들의 아미노산 서열과 비교한 alignment 도면이다.

도 3은 고추식물의 세균병인 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균과 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 유도되는 유전자인 고추식물의 Leucine-rich repeat protein (LRR)인 CaLRR1과 상호작용하는 신규 유전자인 병생성 관련 단백질 4b 유전자 (pepper pathogenesis-related protein 4b ; *CaPR4b*)의 상호작용을 확인하기 위한 yeast-two-hybrid 실험의 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 CaLRR1과 *CaPR4b*의 식물에서의 상호작용을 확인하기 위한 Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay를 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 CaLRR1과 *CaPR4b*의 식물에서의 상호작용을 확인하기 위한 co-immunoprecipitation을 수행한 도면이다.

도 6은 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 접종하였을 때 접종되지 않은 고추잎과 접종된 고추잎에서의 *CaPR4b* 유전자 유도 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 고추 녹광 품종에 화학적/물리적 자극을 처리한 후 시간의 경과에 따른 *CaPR4b* 유전자 발현 유도 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 접종하였을 때 접종되지 않은 고추잎과 접종된 고추잎에서의 *CaPR4b* 단백질 유도 결과 및 살리실산과 메틸자스모네이트를 처리한 후 시간의 경과에 따른 *CaPR4b*의 단백질의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 *CaPR4b* 단백질 순화 후의 *CaPR4b*의 순화된 단백질을 확인한 도면이다.

도 10은 *CaPR4b* 단백질의 식물 병원균에 대한 항균활성의 결과를 나타낸 도면이다.

도 11은 *CaPR4b* 단백질의 *Alternaria brassicicola*에 대한 항균활성의 결과를 나타낸 사진이다.

도 12는 *CaPR4b* 단백질의 *Alternaria brassicicola*에 대한 항균활성을 확인하기 위하여 병원균의 발아율을 측정한 결과를 나타낸 사진이다.

도 13은 *CaPR4b* 단백질의 *Alternaria brassicicola*에 대한 항균활성을 확인하기 위하여 병원균의 균사생장을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 14는 *CaPR4b* 단백질의 *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiolae*에 대한 항균활성의 결과를 나타낸 사진이다.

도 15는 담배 식물에 *CaPR4b*의 일시적 발현(transient assay)을 수행한 후의 세포사멸 결과를 나타낸 사진이다.

도 16은 담배 식물에 *CaPR4b*, *CaLRR1*과 두 유전자를 혼합한 후 접종하여 일시적 발현(transient assay)을 수행한 후의 세포사멸 결과를 나타낸 사진이다.

도 17은 담배 식물에 *CaPR4b*의 일시적 발현(transient assay)을 수행한 후의 세포사멸의 비율을 나타낸 도면이다.

도 18은 담배 식물에 *CaPR4b*의 일시적 발현(transient assay)을 수행한 후의 이온전도도를 나타낸 도면이다.

도 19는 담배 식물에서 *CaPR4b*의 과발현에 의하여 유도되는 세포사멸을 억제하는 *CaLRR1*이 농도에 의존적인지 알아보기 위하여 *CaLRR1*의 각기 다른 농도와 *CaPR4b*의 일시적 발현(transient assay)을 수행한 후의 결과를 나타낸 도면이다.

도 20은 담배 식물에서 *CaPR4b*의 과발현에 의하여 유도되는 세포사멸을 억제하는 *CaLRR1*이 농도에 의존적인지 알아보기 위하여 *CaLRR1*의 각기 다른 농도와 *CaPR4b*의 일시적 발현(transient assay)을 수행한 후 세포사멸 비율을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 21은 담배 식물에서 *CaPR4b*의 과발현에 의하여 유도되는 세포사멸을 억제하는 *CaLRR1*이 농도에 의존적인지 알아보기 위하여 *CaLRR1*의 각기 다른 농도와 *CaPR4b*의 일시적 발현(transient assay)을 수행한 후의 이온전도도를 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 22는 고추 *CaPR4b* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 *CaPR4b* 유전자의 과다발현에 대한 결과 및 애기장대의 저항성 관련 유전자의 발현에 대한 결과를 나타낸 도면이다.

도 23은 고추 *CaPR4b* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 *CaPR4b* 단백질의 과다발현에 대한 결과를 나타낸 도면이다.

도 24는 고추 *CaPR4b* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)를 접종하였을 때 이 병에 대해 저항성을 보이고 있는 애기장대 잎의 사진이다.

도 25는 고추 *CaPR4b* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)을 접종하였을 때 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000의 접종 후 세균생장 감소로 병저항성 발현결과를 나타낸 도면이다.

도 26은 고추 *CaPR4b* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000접종 후 이온전도도와 활성산소의 변화를 나타낸 도면이다.

도 27은 고추 *CaPR4b* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게

패소바 토마토 DC3000접종 후 NO(nitric oxide)의 변화를 나타낸 도면이다.

도 28은 *CaPR4b*이 과발현된 애기장대에서 애기장대에 노균병을 일으키는 하이알로 페르노스포라 *Noco2(Hyaloperonospora arbidopsisidis Noco 2)*를 접종한 후 떡잎의 병징변화와 병징 확대, 과민성세포사멸 및 군사의 생장(트리판블루 염색)의 변화에 관한 도면이다.

도 29는 *CaPR4b*이 과발현된 애기장대에서 애기장대에 노균병을 일으키는 하이알로 페르노스포라 *Noco2(Hyaloperonospora arbidopsisidis Noco 2)*를 접종한 후 분생자경 형성에 대한 결과를 나타낸 도면이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

#### [실시예 1] *CaPR4b* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정

고추세균성점무늬병에 대한 병생성 관련 단백질(PR protein) 중 하나인 병생성 관련 단백질 4b(*CaPR4b*) 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다. 다음에, 이 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR(Polymerase Chain Reaction) 증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로 부터 개개의 cDNA 클론을 제조하여 GAL4-activating 도메인을 포함하는 pGADT7 벡터에 도입시켜 재조합 벡터를 만들었다. 또한 고추식물의 세균병인 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균과 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 유도되는 유전자인 고추식물의 Leucine-rich repeat protein (LRR)인 CaLRR1을 GAL4 DNA binding 도메인을 포함하는 pGBKT7에 도입시켜 pGBKT7:CaLRR1을 제조하였다.

이렇게 형질전환한 형질전환체들은 서로간의 상호작용을 확인할 수 있는 선택배지(아데닌(Adenine)-히스티딘(Histidine)-류신(Leucine)-트립토판(Tryptophan)이 결여되어있는 배지)로 옮겨준 후 상호작용이 확인된 유전자들 중에서 병 방어(저항성)에 관련될 것으로 추정되는 유전자를 선발하여 클론을 수득하고, 이 클론 중 병생성 관련 단백질 4b(*CaPR4b*)의 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독(Sequencing)함으로써, *CaPR4b*로 명명된 고추 녹광 품종의 *CaPR4b* 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그로부터 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).

본 발명에 의한 상기 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트(Blast) 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 *CaPR4b* 단백질 코딩 유전자를 확인하고 방어 관련 유전자 4b(*CaPR4b*) 유전자로 명명하였다. *CaPR4b* 단백질은 아미노산 서열의 비교결과 전체 해독이 이루어지지 않은 다른 품종의 고추식물 (*Capsicum chinense*)과 100%의 상동성을 나타내었고, 감자, 애기장대의 PR family와 80% 이상의 상동성을 나타내었다. 또한 *CaPR4b*의 아미노산 서열의 비교결과 PR family 중에서도 키틴결합 도메인을 포함하는 형태이다. 이 유전자는 고추 세균성점무늬병 이외에도 여러 가지 병원균에 대하여도 저항성 작용을 갖는 22kDa의 분자량을 지닌 단백질이다 (도 2 참조).

#### [실시예 2] *CaPR4b* 유전자의 CaLRR1과의 상호작용 확인

상기 실시예 1에서 수득한 *CaPR4b* 유전자의 CaLRR1과의 상호작용 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

##### [단계 1]

먼저 저항성 탐색방법을 구체적으로 제시하기 위하여, screening 과정 중에 제작되어 있던 GAL4 DNA binding 도메인을 포함하는 pGBKT7에 도입시켜 pGBKT7:CaLRR1과 GAL4-activating 도메인을 포함하는 pGADT7:CaPR4b의 상호작용을 확인하기 위하여 각각의 유전자를 서로 다른 벡터에 재조합 (pGAD:CaPR4b/pGBKT7:CaLRR1)시켜 yeast AH109에 lithium acetate 방법을 이용하여 Yeast-two-hybrid assay를 실행하여 형질전환시켜 준 후 서로의 상호작용을 확인하였다. 또한 이들의 상호작용이 *CaPR4b*의 두 도메인인 키틴결합 도메인과 BARWIN 도메인 중 어떠한 곳과 결합하는 것인지를 확인하기 위하여 각각의 도메인만을 포함하는 재조합 벡터를 이용하여

CaLRR1과의 상호작용을 확인하였다. 확인 결과 CaPR4b과 CaLRR1의 상호작용은 CaPR4b의 키틴결합도메인에서 가장 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. (도 3 참조)

[단계 2]

다음으로 이러한 CaPR4b과 CaLRR1의 상호작용이 실제 식물내에서도 이루어지는 지를 확인하기 위하여 Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay 방법을 이용하였다. 두 유전자를 각각 PUC-pSPYNE 벡터와 PUC-pSPYCE 벡터에 도입하여 재조합벡터를 만든 후 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 담배식물에 접종한 후 공초점현미경(confocal laser scanning microscope (CLSM))을 이용하여 상호작용을 확인하였다. 상호작용이 식물에서 발생할 경우 각각의 벡터의 C-terminal과 N-terminal가 결합하여 노랑형광을 발산하여 고초점 현미경에서 관찰이 가능하게 된다. (Walter et al., 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. Plant J. 40:428438.) 이러한 방법으로 확인한 결과 CaPR4b과 CaLRR1은 서로 강하게 상호작용 한다는 것을 확인할 수 있었고, 특히 CaPR4b의 키틴결합도메인 부분이 CaLRR1과의 상호작용에서 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다. (도 4 참조)

[단계 3]

또한 CaPR4b과 CaLRR1의 상호작용이 식물의 단백질 수준에서 이루어지는 지를 확인하기 위하여 co-immunoprecipitation 방법을 이용하였다. 두 단백질의 상호작용을 확인할 수 있는 벡터인 pSPYCE과 pSPYNE에 도입시킨 후 재조합 벡터를 제작하였다. 이렇게 재조합된 벡터는 HA가 포함되어 있는 HApSPYCE:HA:CaLRR1과 c-Myc이 포함되어 있는 pSPYNE:c-Myc:CaPR4b의 형태를 가지게 된다. 각각의 재조합벡터는 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하여 담배식물의 접종에 이용된다. 특히 각각의 재조합벡터를 단독으로 접종한 담배식물과, 두 개의 재조합벡터를 같이 접종한 담배식물을 수거하여 총 단백질을 추출한다. 각각의 추출되어진 단백질은 동량을 4℃에서 항-HA agarose affinity gel과 항-c-Myc agarose affinity gel을 이용하여 immunoprecipitation을 수행한다. 이렇게 얻어진 단백질은 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용 전기영동 한 후 나이론막 (Hybond P+)으로 전이시켰다. 전이시킨 후 1:5,000의 희석비율의 항체 (항-c-Myc)를 이용 발현을 확인하였다. 그 결과 두 단백질의 상호작용이 확인되었다(도 5 참조).

[실시예 3] 병원균 접종에 의한 고추식물에서의 CaPR4b 유전자의 발현 탐색방법

상기 실시예 1에서 수득한 CaPR4b 유전자의 저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[단계 1]

먼저 저항성 탐색방법을 구체적으로 제시하기 위하여, 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬 병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)중 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양한 후,  $10^8$  cfu/ml의 농도로 4엽기의 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)의 1, 2엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 인필트레이션(Infiltration)하여 접종하고, 접종 후에는 28℃, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실처리 하였다. 접종 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 각각 1, 2엽을 샘플링하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

다음으로 실시예 1에서 수득된 CaPR4b 유전자를 14-dCTP-비오틴(14-dCTP-biotin)을 이용하여 표지한 후 PCR(Polymerase Chain Reaction)로 증폭 시킨 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 텍스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65℃로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다. 이렇게 비오틴(biotin)이 표지된 상기의 DNA 프로브는 나이론막에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 비오틴(biotin)이 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 이것으로 발현 여부를 알아볼 수 있게 하였다.

상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩 (loading) 되었음을 확인하였다. 이상의 실험결과를 도 6에 나타내었으며 실험의 결과 CaPR4b 유전자는 고추 세균성점무늬병에 대

한 고추식물의 저항성 반응은 병원성 균주와 비병원성 균주에 대하여 모두 발현이 나타났다. 보다 구체적으로 병원성 균주 즉, 친화적 반응에서는 *CaPR4b* 유전자의 발현이 5시간 이후에 발현이 증가하여 25시간까지 발현이 관찰되었다. 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주에서는 15시간에서 가장 강하게 발현되고 그 이후에도 증가된 발현양이 25시간째까지 유지되었으며 친화적 반응보다 *CaPR4b* 유전자 발현이 매우 더 강하였다. (도 6 참조)

#### [실시예 4] 화학적/물리적 유도체에 의한 *CaPR4b* 유전자의 유도 발현

본 발명의 *CaPR4b* 유전자가 통상 저항성 유도에 사용되는 화학적 유도체에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

##### [단계 1]

먼저, *CaPR4b* 유전자의 발현 유도에 유용한 유도체를 탐색하기 위하여, 식물병 저항성 발현의 유도에 관여한다고 알려진 화학물질들 중 살리실산 및 메틸자스모네이트를 사용하여 저항성 유도 시험을 실시하였다. 모든 실험에 6엽기의 고추잎이 이용되었다. 5 mM의 살리실산, 100  $\mu$ M의 메틸자스모네이트는 분무기를 이용하여 고추잎의 앞뒷면에 뿌려 처리하였다.

각각의 식물들은 1, 5, 10, 15, 20, 25시간 후에 잎을 수거하였고 각각의 샘플에서 RNA를 추출하였고 추출된 RNA를 이용하여 다음과 같이 노던블러팅을 수행하였다.

다음으로 실시예 1에서 수득된 *CaPR4b* 유전자를 14-dCTP-비오틴 (14-dCTP-biotin)을 이용하여 표지한 후 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 증폭 시킨 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 텍스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65°C로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션(hybridization)을 실시하였다. 이렇게 비오틴(biotin)이 표지된 상기의 DNA 프로브는 나이론막에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 비오틴(biotin)이 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 이것으로 발현 여부를 알아볼 수 있게 하였다.

상기 노던블러팅 수행 시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였다. 이상의 실험결과를 도 7에 나타내었으며 실험의 결과 *CaPR4b* 유전자는 살리실산의 처리 후에는 5시간 이후에 강하게 축적이 됨이 관찰되었다. (도 7) 또한, 메틸자스모네이트의 처리 후에는 살리실산에 비하여 약하게 축적되는 것이 관찰되었다.

##### [단계 2]

위와 같은 방법으로 화학적/물리적 스트레스에 대한 *CaPR4b* 유전자의 반응을 관찰하였다. 에틸렌은 10  $\mu$ l/L의 농도로 하여 기체상태로 식물체가 있는 밀폐된 유리 용기에 주입하는 방법으로 처리하였다. 염화나트륨은 200 mM의 농도로 수용액을 만들어 식물체의 뿌리가 담기게 하여 처리하였다. 100  $\mu$ M의 메틸 비올로젠, 앱시식산은 100  $\mu$ M의 앱시식산 수용액에 식물체의 뿌리를 담고 같은 수용액을 고추잎에 스프레이하는 방법으로 처리하였다. 각각의 식물들은 1, 5, 10, 15, 20, 25시간 후에 잎을 수거하였고 각각의 샘플에서 RNA를 추출하였고 추출된 RNA를 이용하여 다음과 같이 노던블러팅을 수행하였다. 건조 및 상처 스트레스에 대한 발현 양상 또한 노던블러팅을 통하여 확인하였다. (도 7 참조)

#### [실시예 5] 병원균 접종 및 화학적 유도체에 의한 고추식물에서의 *CaPR4b* 단백질의 발현 탐색방법

상기 실시예 4와 같은 방법으로 처리되어진 식물을 샘플링하여 단백질을 분리하여 실험을 수행하였다. 다음으로 실시예 1에서 수득된 *CaPR4b* 유전자를 펩티드 합성을 이용하여 토끼에서 항체를 제작하여 *CaPR4b*의 단백질 발현을 확인하였다. 상기 항체는 항체 전문 제작업체(AbFRONTIER, Korea)에 의뢰하여 제작하였고, 이를 이용하여 실험을 수행하였다.

먼저 저항성 탐색방법을 구체적으로 제시하기 위하여, 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬 병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 중 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10<sup>8</sup> cfu/ml의 농도로 4엽기의 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)의 1, 2엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 인필트레이션(Infiltration)하여 접종하고, 접종 후에는 28°C, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실처리 하였다. 접종 5, 15, 25, 35 시간 후에 각각 1, 2엽을 샘플링하여 단백질

을 추출하였고, 추출한 단백질을 15% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용 전기영동 한 후 나이론막 (Hybond P+)으로 전이 시켰다. 전이 시킨 후 1:5,000의 희석비율의 항체 ( $\alpha$ -CaPR4b)를 이용하여 발현을 확인 하였다. 단백질 발현의 실험의 수행 시 단백질량을 정량함으로서 동일한 양의 단백질이 로딩되었음을 확인하였다. 이상의 실험결과를 도 8에 나타내었다.

[0067] 도 8에 나타난 바와 같이 실험의 결과 *CaPR4b* 유전자는 세균성 점무늬병에 대한 고추식물의 저항성 반응은 병원성 균주와 비병원성 균주에 대하여 모두 발현이 나타났으나 병원성 균주 즉, 진화적 반응에서는 *CaPR4b* 유전자의 발현이 약하게 나타남이 확인되었고, 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주에서는 25시간에서 가장 강하게 발현되었다. 도 8에 나타난 바와 같이, 살리실산은 12시간에 발현이 증가되어 24시간에 가장 강하게 발현되었으며 메틸 자스모네이트의 단백질 수준의 발현 또한 관찰되었다.

#### [0068] [실시예 6] CaPR4b 단백질의 항균활성 확인

[0069] 대장균에서의 *CaPR4b* 유전자를 과발현 시킨 후 발현 산물인 CaPR4b의 단백질 기능을 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaPR4b* 유전자를 maltose binding protein을 포함하는 pMAL 벡터에 도입시켜 재조합백터를 제조하였다. 이렇게 재조합백터를 대장균(*Escherichia coli* strain BL21)에 형질전환시키고 이 재조합백터가 들어가 있는 대장균을 배양하여 얻어진 단백질을 다음 실험에 이용하였다. (도 9)

#### [0070] [단계 1]

[0071] CaPR4b 단백질의 항균활성을 확인하기 위하여 순화된 CaPR4b 단백질과 대조군으로서 maltose binding protein만을 순화한 단백질을 이용하여 *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium oxysporum* sp. *matthiola*e, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*와 같은 병원균의 CaPR4b 단백질의 최소억제농도를 측정함으로서 항균활성을 확인하였다(도 11 참조). 각각의 병원균은 농도를 다르게 한 CaPR4b 단백질을 포함하는 배지에 접종시킨 후 maltose binding protein만을 순화한 단백질을 포함하는 배지에 접종된 병원균과의 생장을 비교하였다. 비교 결과 병원성 세균에서는 CaPR4b 단백질이 큰 영향을 주지 못했으나, 병원성 진균에서는 강한 항균활성을 보인다는 것을 확인할 수 있었다. (도 11, 14 참조)

#### [0072] [단계 2]

[0073] 특히 *Alternaria brassicicola*에 대한 CaPR4b 단백질의 항균활성을 측정하기 위하여 병원균의 포자 발아율과 균사의 생장을 측정하였다. (도 12, 13 참조) 농도를 다르게 한 CaPR4b 단백질을 포함하는 배지에 접종시킨 후 maltose binding protein만을 순화한 단백질을 포함하는 배지에 접종된 *Alternaria brassicicola*의 발아율과 균사생장을 비교하였다. 도 12, 13에서 나타나는 바와 같이 CaPR4b 단백질은 *Alternaria brassicicola*의 발아율과 균사생장을 강하게 억제하였다.

#### [0074] [실시예 7] 아그로박테리움 매개 일시 발현(Agrobacterium-mediated transient expression) 방법을 통한 CaPR4b 유전자 발현이 식물에 미치는 영향

[0075] 고추식물에서 *CaPR4b* 유전자를 아그로박테리움 매개 일시적 발현(Agrobacterium-mediated transient expression) 방법을 통하여 과발현을 시켰을 때 고추식물의 변화를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaPR4b* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN3S 벡터에 도입시켜 pBIN3S::CaPR4b를 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN3S::CaPR4b를 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciense* strain GV3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합백터가 들어가 있는 GV3101 균주를 식물에 농도별로 주사기를 사용하여 인필트레이션(infiltration) 방법을 이용하여 고추식물에 도입함으로써 *CaPR4b* 유전자의 과발현을 유도시켰다.

#### [0076] [단계 1]

[0077] 도 15 및 16에서와 같이 *CaPR4b*이 과다로 발현된 식물에서는 *CaPR4b*이 도입되지 않은 대조구와 비교하여 식물의 세포사멸이 관찰되었으며 이들 식물에서 저항성 반응의 결과를 알아보기 위하여 세포사멸의 비율과 이온전도도를 수행하였다. 도 17에서와 같이 *CaPR4b*이 과발현된 식물이 대조구에 비하여 세포사멸이 강하게 증가되

는 것을 관찰할 수 있었고, 도 18에 나타난 바와 같이 이온전도도 또한 *CaPR4b*이 과발현된 식물에서 더 증가됨을 알 수 있었다.

[단계 2]

*CaPR4b*의 과발현에 의하여 일어나는 세포사멸이 이 단백질과 상호작용하는 *CaLRR1*에 의하여 어떠한 영향을 미치는 영향을 알기 위하여 두 유전자를 혼합한 후 식물에 접종하였다. 결과 *CaLRR1*이 과발현된 접종 부위에서는 세포사멸이 발생하지 않았다. 그러나 *CaLRR1*의 과발현은 *CaPR4b*의 과발현에 의하여 일어나는 세포사멸을 억제시켰다. 이러한 결과는 세포사멸 비율과 이온전도도를 통해서도 확인되었다. (도 16, 17, 18 참조)

[단계 3]

*CaLRR1*의 과발현에 의하여 억제되는 *CaPR4b*의 과발현에 의한 세포사멸이 *CaLRR1*의 농도에 의존적인지를 확인하기 위하여 *CaLRR1*의 비율을 달리하여 *CaPR4b*와 혼합한 후 식물에 접종하였다. 접종 결과, *CaPR4b*의 과발현에 의한 세포사멸이 *aLRR1*의 농도에 의존적으로 억제되어짐이 관찰되었다. (도 19 참조) 세포사멸의 비율과 이온전도도를 수행 결과 또한 같은 비율로 *CaLRR1*과 *CaPR4b*가 접종되었을 때 *CaPR4b*의 과발현에 의한 세포사멸이 가장 강하게 억제됨을 확인 할 수 있었다. (도 20, 21 참조)

[실시예 8] *CaPR4b* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 *CaPR4b* 유전자의 과다발현에 의한 병 저항성의 증가

식물체에서 *CaPR4b* 유전자의 과다발현 시 다른 병 발생과 관련된 유전자들의 유도여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaPR4b* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN3S 벡터에 도입시켜 pBIN35S::*CaPR4b*을 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S::*CaPR4b*를 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물에 도입함으로써 형질전환 시켜서 *CaPR4b* 유전자의 과다발현을 유도시킨 후 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[단계 1]

*CaPR4b* 유전자가 과다발현된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여, 먼저 상기 *CaPR4b* 유전자가 과다발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에서 *CaPR4b*의 발현을 유전자와 단백질 수준에서 관찰하였으며 그 결과를 도 22, 23에 나타내었다. 도 25에서 #6, #8, #18은 사용된 형질전환 식물의 계통번호를 나타내고 실험결과 애기장대 식물에서 *CaPR4b*이 과발현됨을 관찰할 수 있었다.

[단계 2]

상기와 같이 *CaPR4b*이 과다발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)균주를  $10^5$  cfu/ml 농도로 접종하고 식물체의 변화를 관찰하였다(도 26). 그 결과 도 24 및 25에 나타난 바와 같이 *CaPR4b*이 과다발현된 식물체에서 야생형에 비하여 세균성 병에 대하여 저항성 증가를 나타내고 있음이 관찰되었고, 접종 후 0일과 3일에 잎을 수거하여 식물 잎의  $1\text{ cm}^2$  세균수를 측정한 후 그 결과를 도 25에 나타내었다. 특히 도 25에서는 *CaPR4b* 유전자가 과다발현된 식물에서 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000의 접종 후에 야생형 식물과 비교해서 병원세균의 생장이 유의성 있게 감소하여 병 저항성을 가지고 있는 것으로 관찰되었다.

[단계 3]

*CaPR4b*이 과다발현된 식물에서 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000의 접종 후에 나타나는 저항성 반응을 확인하기 위하여 접종 후 이온전도도와 활성산소 및 NO (Nitric oxide)를 측정하였다. (도 26, 27참조) 이러한 측정의 결과, *CaPR4b*이 과다발현된 식물에서 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000의 접종 후 이온전도도의 증가, 활성산소의 증가 및 NO함량의 증가를 통하여 저항성에 기여하는 것으로 관찰되었다.

[실시예 9] 하이알로페르노스포라 Noco2의 접종 후에 *CaPR4b* 유전자의 과다발현된 식물에서 병 저항성의 변화

- [0091] *CaPR4b*이 과발현된 애기장대 식물체에 노균병을 일으키는 하이알로 페르노스포라 *Noco2(Hyaloperonospora arabidopsidis Noco 2)*를 접종한 후 시험을 수행하였다. *CaPR4b*이 과발현된 애기장대식물의 떡잎시기에 하이알로 페르노스포라 *Noco2*를  $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 의 농도로 스프레이를 통하여 뿌려주었다. 접종 후 17°C의 온도에서 습실 처리하였다.
- [0092] [단계 1]
- [0093] 각각의 식물체에서 하이알로 페르노스포라균에 대한 저항성 여부를 관찰하기 위하여 접종 후 6일 째에 관찰하였고, 7일에 트리판 블루 염색을 수행하였다. 도 28과 같이 *CaPR4b*이 과다발현된 식물에서 야생형에 비하여 분생자경(sporangiophores)의 형성이 감소되어 저항성 반응을 관찰 할 수 있으며 트리판 블루 염색을 통하여 야생형에 비하여 균사의 생장이 덜 발달 되고 있음을 알 수 있었다.
- [0094] [단계 2]
- [0095] 각각의 식물체에서 하이알로 페르노스포라균의 저항성 검정을 위하여 하이알로 페르노스포라균의 접종 후 형성되는 분생자경의 수를 센 후 0, 1-5, 6-10, 11-15, 15이상으로 그룹을 만든 후 평균값과 전체에 대한 비율(%)로 표시하였다. 도 29와 같이 건전한 식물에 비하여 *CaPR4b*이 과다발현된 식물에서는 평균값과 비율에서도 야생형에 비하여 저항성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [0096] 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

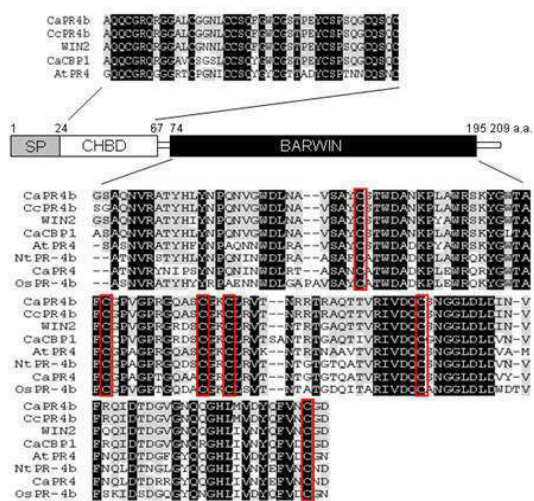
### 도면1

```

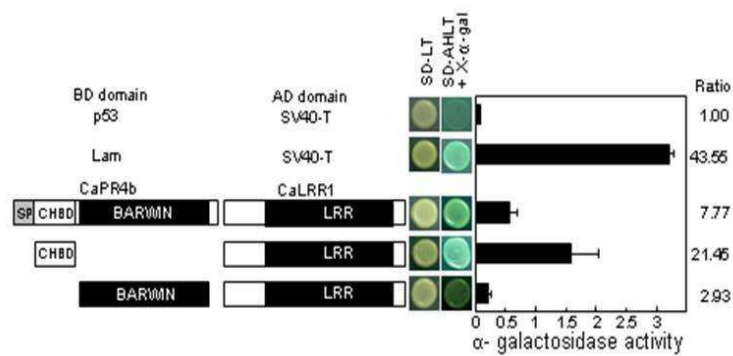
ctaactagagaacccactgcttactggcttatcgaaattaatacgactcactatagggga 59
attcactgttggcctactggacaaccacattatagcagctcttttagaagaaaaagaa 119
ATGGAGAAACGAACCTAGTACTACTATTTCTTAGCCCTAGTCCTCTTCATCGTATCCGGA 179
[M E K R T S T T I L L A L V L F I V S G] 20
GTGGCCCAACGCACAGCAGTGCAGGAAAGGGCGGAGCCTTATGCGGCGGAAACTTA 239
[V A N A] Q Q C G R Q R G G A L C G G N L 40
TGTGTGCAGCCAATTGGATGGTGTGGATCGACACCCGAATACTGTTCACCTAGCCAAGGT 299
C C S Q F G W C G S T P E Y C S P S Q G 60
TGCCAGAGCCAATGCAGTGGAAAGTGGTCCGACTCCAGAAGGAAGCGCGCAAATGTACGT 359
C Q S Q C S G S G P T P E G S A Q N V R 80
GCAACGTATCATTTGTATAACCCGAGAAATGTTGGTGGGACTTGAATGCTGTTAGTGCT 429
A T Y H L Y N P Q N V G W D L N A V S A 100
TATTGCTCGACATGGGATGCTAATAAGCCTTTGGCTTGGAGGAGCAAGTATGGTTGGACT 479
Y C S T W D A N K P L A W R S K Y G W T 120
GCTTTCTGTGGTCTGTTGGACCTCGTGGTCAAGCCTCCTGTGGCAAGTGCTTAAGGGTC 539
A F C G G P V G P R G Q A S C G K C L R V 140
ACAAACAGACGAACCAAGAGCTCAAACAACGGTGAGAATCGTGGATCAATGCAGCAACGGT 599
T N R R T R A Q T T V R I V D Q C S N G 160
GGACTAGACTTGGACATTAACGTTTTCGGGCAAAATCGACACAGACGGAGTGGGAAATCAA 659
G L D L D I N V F R Q I D T D G V G N Q 180
CAAGGTCACCTTATGGTGGACTACCAATTGTTAATGCGGTGACAATGTGAATGTTCTCT 719
Q G H L M V D Y Q F V N C G D N V N V P 200
CTCTTGTCTGTAGTTGACACACAATGAggagccacatggctctgttttagtctgatgaata 779
L L S V V D T Q * 208
a 780

```

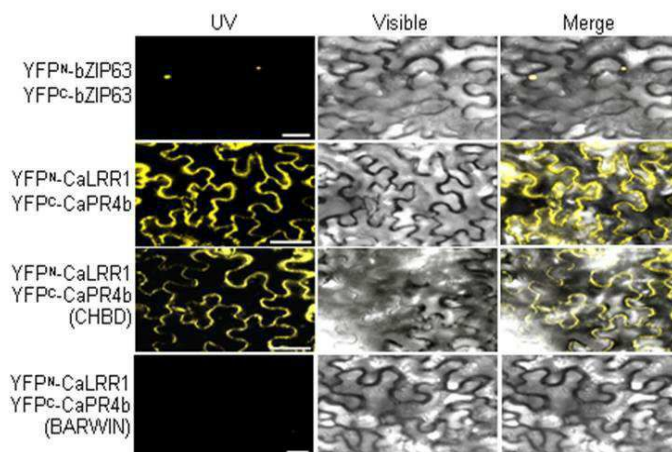
도면2



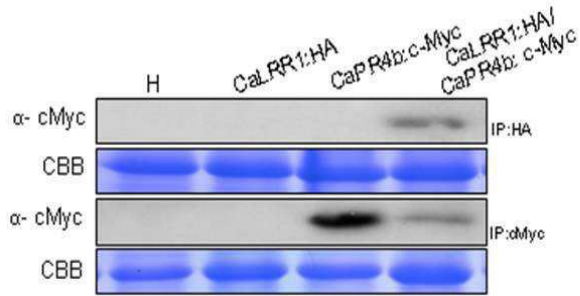
도면3



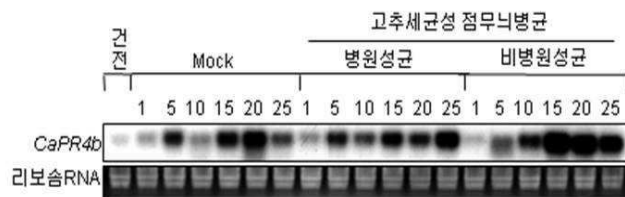
도면4



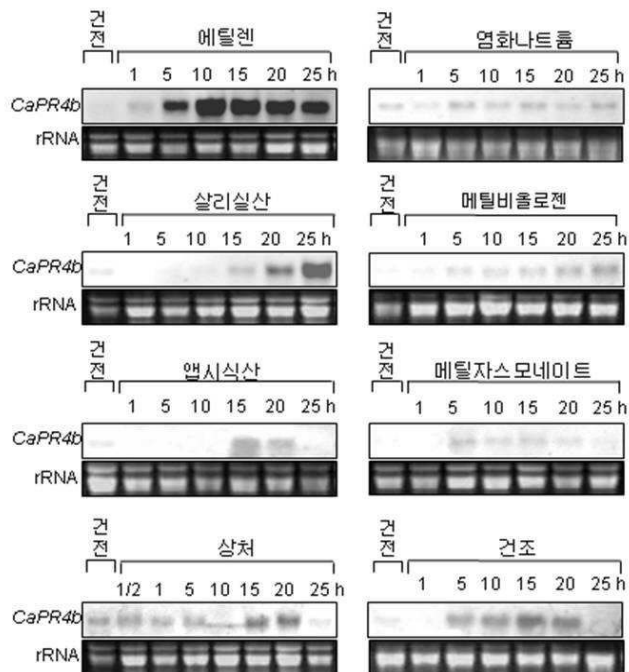
도면5



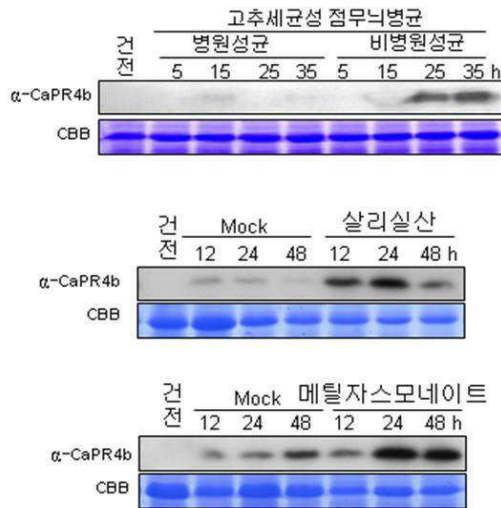
도면6



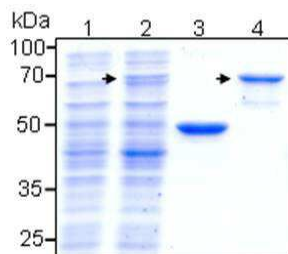
도면7



도면8



도면9

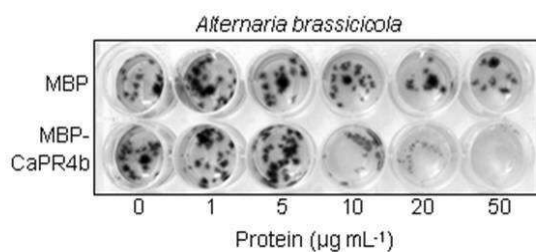


도면10

식물병원균에 대한 CaPR4b의 최소억제 농도 (Minimum inhibitory concentrations (MIC))

| Microorganism                                        | MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) |
|------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Alternaria brassicicola</i>                       | 10                            |
| <i>Botrytis cinerea</i>                              | 10                            |
| <i>Colletotrichum orbiculare</i>                     | 30                            |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>Maitiiae</i>      | 15                            |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> | > 100                         |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>        | > 100                         |

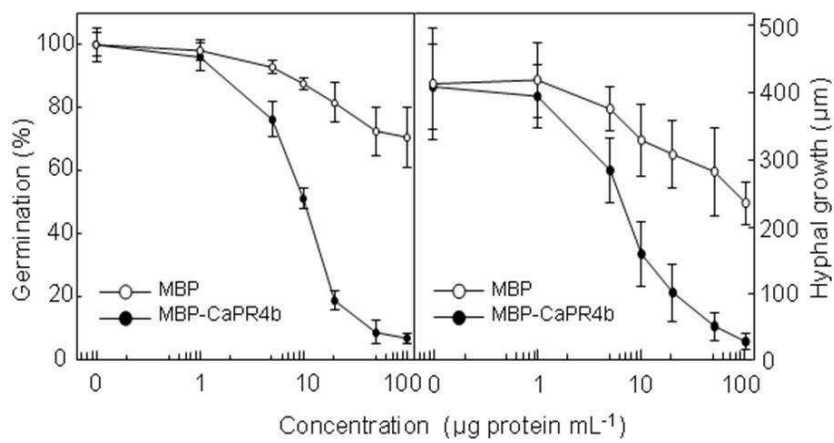
도면11



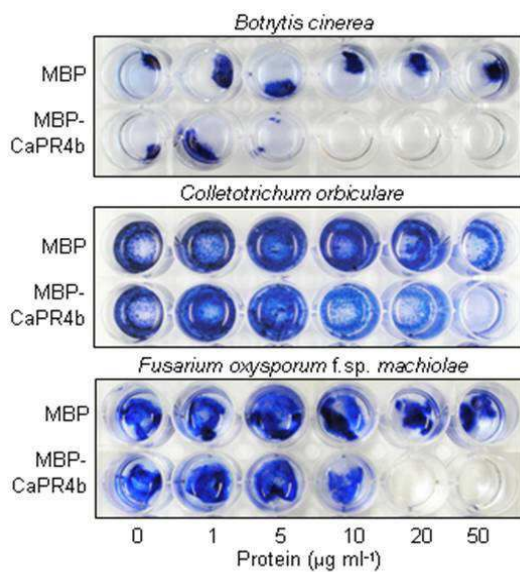
도면12



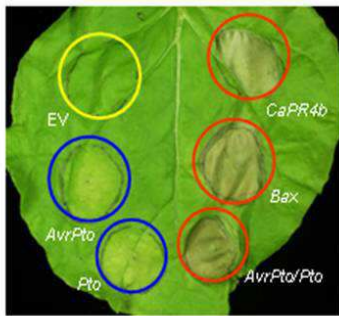
도면13



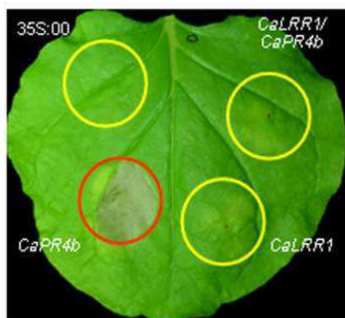
도면14



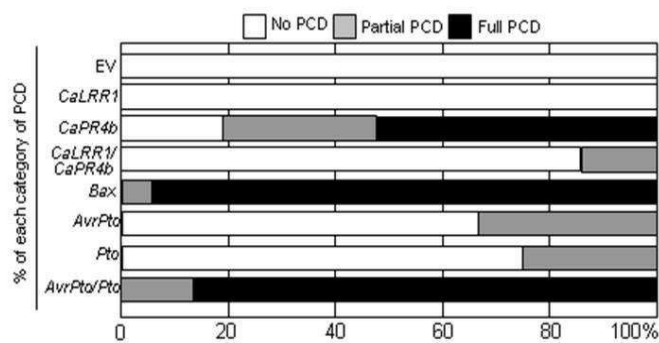
도면15



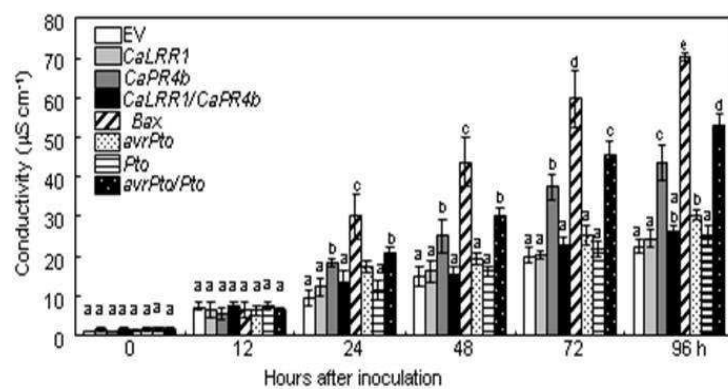
도면16



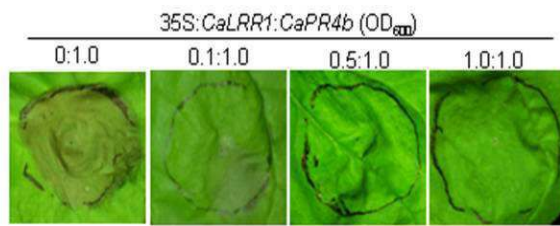
도면17



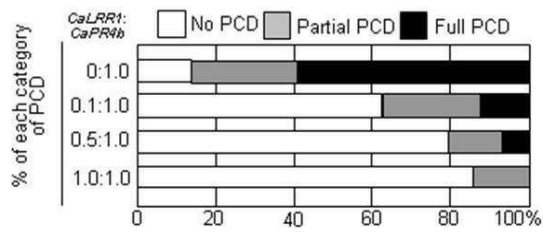
도면18



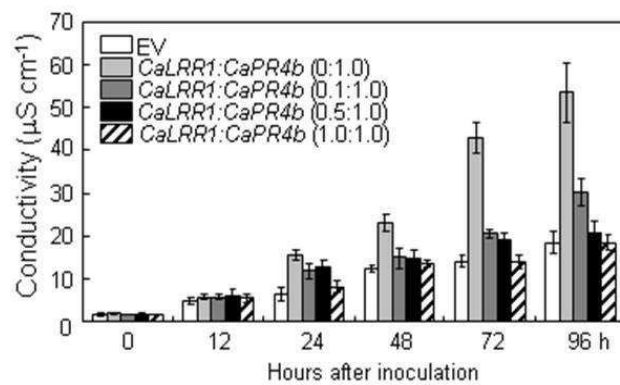
도면19



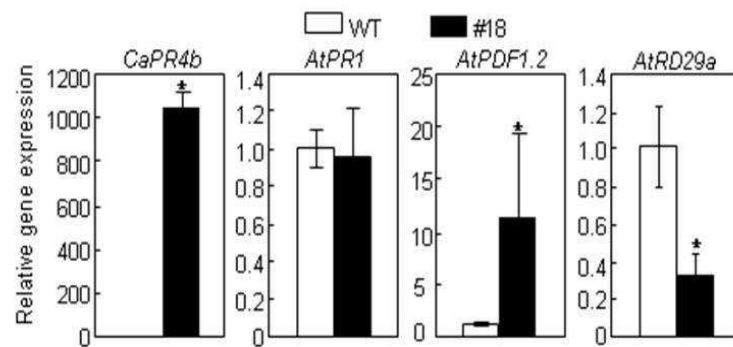
도면20



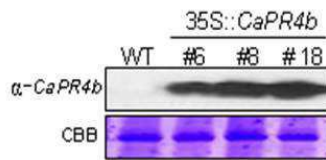
도면21



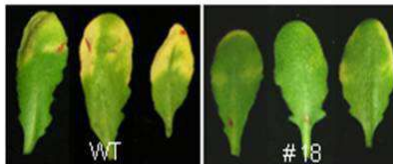
도면22



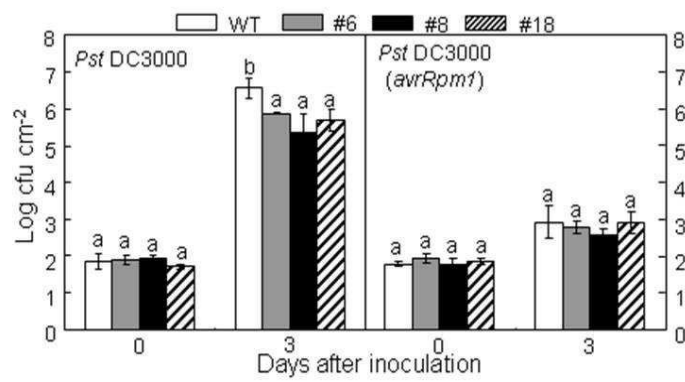
도면23



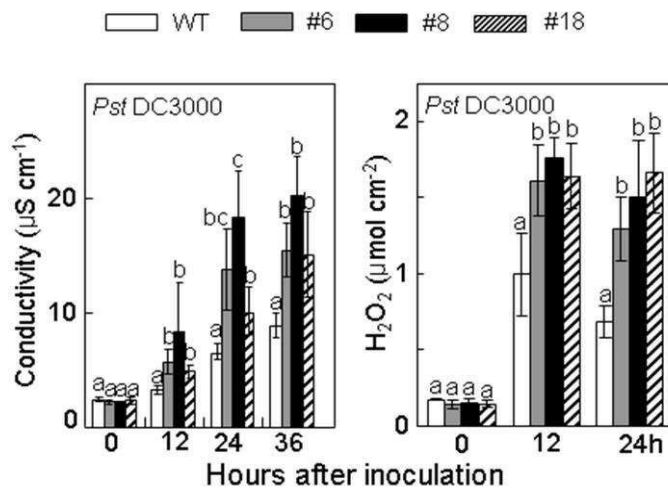
도면24



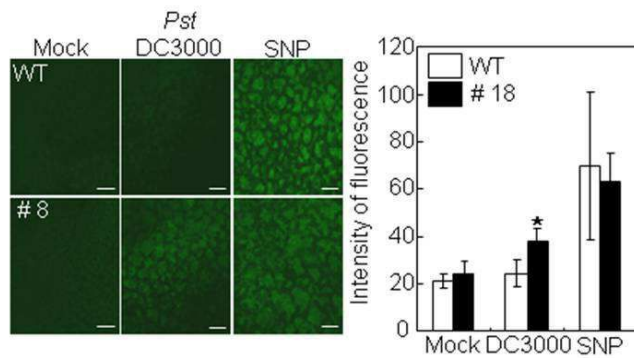
도면25



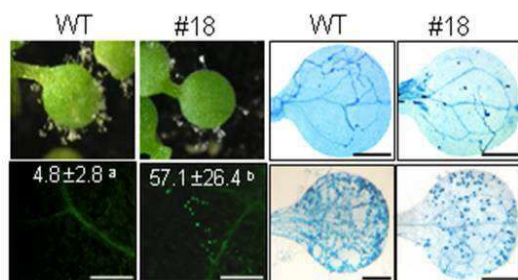
도면26



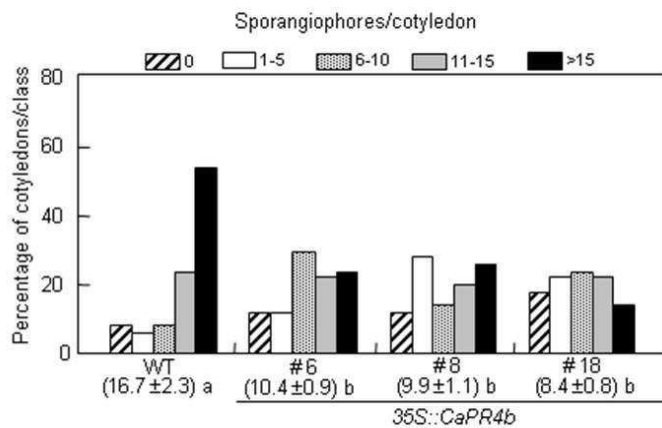
도면27



도면28



도면29



## 서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Pepper pathogenesis-related protein 4b gene and screening method of plant disease resistance using the same
- <130> P11-101209-02-CaPR4b
- <160> 2
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 627

<212> DNA

<213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang

<400> 1

atggagaaac gaactagtag tactattctt ctagccctag tcctcttcat cgtatccgga 60

gtggccaacg cacagcagtg cggaaggcaa aggggcggag ccttatgcgg cggaaactta 120

tgttcagacc aatttggatg gtgtggatcg acaccgaat actgttcacc tagccaaggt 180

tgccagagcc aatgcagtag aagtggtagc actccagaag gaagcgcgca aaatgtacgt 240

gcaacgtatc atttgtataa cccgcagaat gtgtgttggg acttgaatgc tgttagtgct 300

tattgtctga catgggatgc taataagcct ttggcttggg ggagcaagta tggttggact 360

gttttctgtg gtctgttgg acctcgtggt caagcctcct gtggcaagtg ctttaagggtc 420

acaaacagac gaaccagagc tcaaacaacg gtgagaatcg tggatcaatg cagcaacggt 480

ggactagact tggacattaa cgttttccgg caaatcgaca cagacggagt gggaaatcaa 540

caaggtcacc ttatggtaga ctaccaattt gtttaattgcg gtgacaatgt gaatgttcct 600

ctcttgtctg tagttgacac acaatga 627

<210> 2

<211> 208

<212> PRT

<213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang

<400> 2

Met Glu Lys Arg Thr Ser Thr Thr Ile Leu Leu Ala Leu Val Leu Phe

1 5 10 15

Ile Val Ser Gly Val Ala Asn Ala Gln Gln Cys Gly Arg Gln Arg Gly

20 25 30

Gly Ala Leu Cys Gly Gly Asn Leu Cys Cys Ser Gln Phe Gly Trp Cys

35 40 45

Gly Ser Thr Pro Glu Tyr Cys Ser Pro Ser Gln Gly Cys Gln Ser Gln

50 55 60

Cys Ser Gly Ser Gly Pro Thr Pro Glu Gly Ser Ala Gln Asn Val Arg

65 70 75 80

Ala Thr Tyr His Leu Tyr Asn Pro Gln Asn Val Gly Trp Asp Leu Asn

85 90 95

Ala Val Ser Ala Tyr Cys Ser Thr Trp Asp Ala Asn Lys Pro Leu Ala

100 105 110

Trp Arg Ser Lys Tyr Gly Trp Thr Ala Phe Cys Gly Pro Val Gly Pro  
 115 120 125  
 Arg Gly Gln Ala Ser Cys Gly Lys Cys Leu Arg Val Thr Asn Arg Arg  
 130 135 140  
 Thr Arg Ala Gln Thr Thr Val Arg Ile Val Asp Gln Cys Ser Asn Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Asp Leu Asp Ile Asn Val Phe Arg Gln Ile Asp Thr Asp Gly  
 165 170 175  
 Val Gly Asn Gln Gln Gly His Leu Met Val Asp Tyr Gln Phe Val Asn  
 180 185 190  
 Cys Gly Asp Asn Val Asn Val Pro Leu Leu Ser Val Val Asp Thr Gln  
 195 200 205