



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0139189

(43) 공개일자 2015년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/09 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0067373

(22) 출원일자 2014년06월03일

심사청구일자 2014년06월03일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

전중성

경기도 안양시 동안구 동안로 101 목련1단지선경아파트 103동 1302호

김치열

서울특별시 영등포구 영신로 191 동부센트레빌 104동 901호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

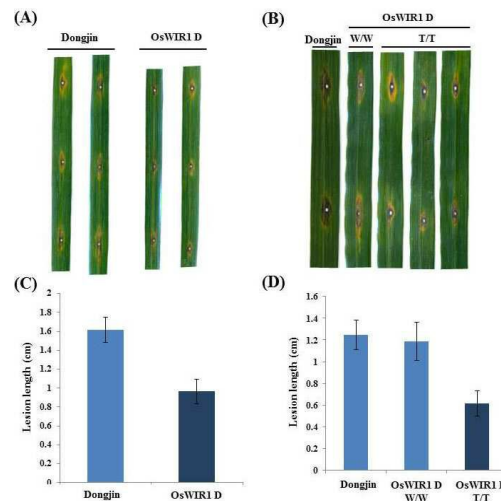
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 벼 유래 NB-LRR 면역 센서 저항성 유전자인 OsWIR1(OsWRKY67-inducible resistance gene1)을 이용한 식물의 병 저항성을 증가시키는 방법 및 그에 따른 식물체

(57) 요약

본 발명은 벼 유래 *OsWIR1*(*OsWRKY67*-inducible resistance gene1)을 이용한 식물의 병 저항성을 증가시키는 방법 및 그에 따른 식물체에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 돌연변이 벼 유래의 상기 유전자를 식물 형질전환용 발현벡터에 삽입하여 과발현시킴으로써 식물체의 도열병에 대하여 저항성을 증진시켜 생육을 촉진하고, 결과적으로 수확량 증대효과를 가져올 수 있으므로, 신품종의 육성에 효과적으로 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도13



(72) 발명자

한무호

경기도 수원시 권선구 당진로15번길 19-10 한라비
발디아파트 105동 1803호

이상규

경기도 용인시 기흥구 서천동로 60 서천마을4단지
408동 1103호

안진홍

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 탑실마을대주피
오레2단지아파트 210동 1703호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A2A2A01068887

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업 (핵심연구)

연구과제명 벼 WRKY 유전자에 의한 시토키닌 대사 조절 규명

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2016.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01110701

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21 사업 (GM작물개발사업단)

연구과제명 미네랄 강화 GM 벼 특성분석 및 도열병 저항성 GM 벼 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

벼(*Oryza sativa*) 유래의 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 OsWIR1 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 식물체의 병 저항성을 증가시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 OsWIR1 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 비형질전환체에 비해 식물체의 병 저항성을 증가시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 병 저항성은 도열병에 대한 저항성인 것을 특징으로 하는 비형질전환체에 비해 식물체의 병 저항성을 증가시키는 방법.

청구항 4

벼 유래의 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환하는 단계; 및
상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 병 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 벼 유래의 OsWIR1 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 비형질전환체에 비해 병 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 병 저항성은 도열병에 대한 저항성인 것을 특징으로 하는 비형질전환체에 비해 병 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 7

제4항의 방법에 의해 제조된 비형질전환체에 비해 병 저항성이 증가된 형질전환 식물체.

청구항 8

제7항에 따른 식물체의 종자.

청구항 9

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 식물체의 병 저항성 증가용 조성물.

청구항 10

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현이 증가되어 병 저항성이 증가된 돌연변이 식물체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 증가는 T-DNA 활성화 태깅(tagging) 방법에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 병 저항성이 증가된 돌연변이 식물체.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 병 저항성은 도열병에 대한 저항성인 것을 특징으로 하는 병 저항성이 증가된 돌연변이 식물체.

청구항 13

제10항에 따른 식물체의 종자.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 벼 유래 NB-LRR 면역 센서 저항성 유전자인 *OsWIR1*(*OsWRKY67*-inducible resistance gene1)을 이용한 식물의 병 저항성을 증가시키는 방법 및 그에 따른 식물체에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 벼(*Oryza sativa*) 유래의 *OsWIR1* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *OsWIR1* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 식물체의 병 저항성을 증가시키는 방법, 벼 유래의 *OsWIR1* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 병 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법, 상기 제조방법에 의해 제조된 형질전환 식물체 및 이의 종자, 벼 유래의 *OsWIR1* 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 식물체의 병 저항성 증가용 조성물 및 벼 유래의 *OsWIR1* 단백질을 코딩하는 유전자의 발현이 증가되어 병 저항성이 증가된 돌연변이 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

식물은 수많은 병원균의 침입으로부터 자신을 보호하기 위해 병원균 인식 및 방어 반응으로 특징되는 면역 기작을 갖는다. 식물체는 패턴 인식 수용기(Pattern recognition receptors, PRRs)에 의해 병원균- 또는 미생물-관련 분자적 패턴(PAMP/MAMP), 즉 동일한 과에 속하는 미생물들간에 고도로 보존되어 있는 분자의 일부를 지각하여 활성산소종(reactive oxygen species, ROSs)의 축적과 페놀성 화합물의 퇴적을 수반하는 PAMP-유발 면역(PAMP-triggered immunity, PTI)을 활성화시킨다. ROSs는 직접적으로 항균성을 가질 뿐 아니라 방어 반응의 신호전달 분자로서 기능을 한다. PTI는 종종 병원균의 침입과 성장을 막는 기초 방어로 불려진다(Jones and Dangl, 2006, Nature, 444:323-329).

[0003]

다른 식물 면역 체계로서, 병 저항성(*R*) 유전자에 의해 암호화된 숙주 면역 센서를 통한 병원균 반응기(effector) 분자의 인식은 ETI(effector-triggered immunity)를 유도한다. 만일 진균 반응기가 유사한 벼 유래의 *R* 단백질에 의해 인식된다면, ETI가 유발되고, 과민성 반응으로 종료되는데, 이는 48시간 내에 진균 성장을 중단시킨다. ETI는 병원균의 특이적 균주 또는 레이스(race)로부터 식물을 효과적으로 보호하는 강력한 면역 반응이다. 국부적 과민성 반응은 전신적 획득 저항성(systemic acquired resistance, SAR)이라고 불리는 장시간 지속되는 전신적 반응을 유발하고, 이것은 식물이 넓은 범위의 병원균에 대해 저항성을 갖도록 준비할 수 있게 한다.

[0004]

만일 진균 반응기가 인식하지 못하면, 제한된 PTI 반응이 키틴과 같은 진균 PAMP의 인식 하에 발생한다(Kaku 등, 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:11086-11091). 그리고 진균 군사는 식물 조직을 통해서 확산되어, 병징을 야기시킨다(Chen and Ronald, 2011, Trends plant Sci, 16:451-459). 그러므로, 병원균의 침입 이후의 조기 방어 반응이 숙주 저항성의 최종 결과에 중요하다.

[0005]

식물 방어 반응과 연관된 주요 전사 재프로그래밍(transcriptional reprogramming)은 식물 호르몬 뿐만 아니라 다양한 전사인자의 활성을 필요로 한다. WRKY, ERF, TGA, bZIP 및 Myb과 같은 전사인자는 식물의 선천적 면역 기작의 다운스트림 신호전달(downstream signaling)과 연관되어 있다(Eulgem, 2005, Trends Plant Sci, 10:71-78). 특히, WRKY 전사인자는 식물의 면역 반응에 연결된 전사 재프로그래밍에서 매우 중요하다. WRKY 유전자 패밀리는 육상식물 사이에서 널리 발달되었다(Eulgem and Somssich, 2007, Curr. Opin. Plant. Biol., 10:366-371). 예를 들어, 애기장대에서 80개 이상의 WRKY 유전자와 벼에서 130개 이상의 WRKY 유전자가 있다(Zhan 등, 2011, Nucl Acids Res, 39:D1114-D1117).

[0006]

병원균에 대한 저항성을 특정하는 *R* 유전자는 그의 단백질에서 보존되는 도메인의 구성에 따라 다섯 가지 분류군으로 분류된다(Van Ooijen 등, 2007, Annu. Rev. Phytopathol., 45:43-72). 그 중, 뉴클레오티드-결합

(nucleotide-binding, NB) 및 고류신반복(leucine-rich repeat, LRR) 도메인을 포함하는 NB-LRR 단백질은, 예를 들어 애기장대에서 약 150개, 벼에서 500개로 가장 큰 R 단백질 분류군을 나타낸다(Ellis 등, 2000, Current Opinion in Plant Biology 3: 278-284). 이는 병원균 신호의 인식 및 전달에 대한 일반적인 메커니즘이 다양한 식물중에 존재한다는 것을 시사한다.

[0007] 대부분의 경우, NB-LRR 단백질은 유전자-대-유전자 저항성(gene-for gene resistance)에 관여한다. 예를 들어, 이삭도열병(*Panicum blast*) 1(*Pb1*) 유전자는 CC-NB-LRR(coiled-coil-nucleotide-binding site-leucine-rich repeat) 단백질을 코딩하는 유전자로서, 세포 내 핵에서 OsWRKY45와의 상호 작용을 통해 벼 도열병에 대한 광범위한 스펙트럼 내성을 부여한다(Inoue 등, 2013, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 113(23):9577-9582).

[0008] 도열병균(*Magnaporthe oryzae*)에 의해 발생하는 벼 도열병은 매년 전 세계적으로 벼 생산량의 10-30% 손실을 야기시키는 가장 파괴적인 벼 질환이다(Skamnioti and Gurr, 2009, Trends Biotechnol, 27:141-150). 도열병균은 발아관의 정단에서 부착기(appressoria) 분화와 코니디아(conidia) 발아에 의해 벼 잎에 감염을 시작한 후, 좁은 침입관(penetrating peg)은 활물기생(biotrophic) 단계 동안에 세포질 막에 쌓인 침입 군사로 분화한다. 반활물기생 병원균인 도열병균은 식물 세포를 초기에 죽이지 않고, 감염 후기에 감염된 군사의 지속적인 성장으로 식물을 죽이며 병변(blast lesion)은 일반적으로 감염 7일 이내에 가시적으로 볼 수 있다. 벼 흰잎마름병균(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; *Xoo*)에 의해 발생하는 세균성 흰잎마름병(leaf blight)은 전 세계적으로 대부분의 벼 재배 국가들에서 벼 수확량 손실을 심각하게 발생시키는 벼 질환 중의 하나이다(Lino-Liu 등, 2006, Mol. Plant Pathol, 7:303-324). 흰잎마름병균은 상처나 배수조직(hydathodes)을 통해서 식물체로 침입하여 피복조직에서 증식하고 물관에 침투한다. 따라서 벼가 차지하는 농작물로서의 중요성 때문에, 상기 병원균들에 의한 벼 질환을 예방할 수 있는 연구가 매우 중요하다.

[0009] 따라서, 본 발명에서는, *OsWIR1* 유전자의 식물 방어 반응에서 기능적 역할과 병 저항성 증진에서 잠재적 유용성에 대해서 보고한다. 본 발명에서, 벼 유래 *OsWIR1* 유전자가 과발현된 돌연변이체 라인이 도열병균에 대해 저항성을 보였다. 이러한 자료는 *OsWIR1* 유전자가 기초적 방어 및 병원균에 대한 저항성에 필수적이라는 것을 뒷받침한다.

[0010] 한국등록특허 제1352035호에는 '벼 도열병 저항성 OsABP67'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0990370호에는 '벼 도열병균에 대한 내성을 증진시키는 유전자 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 벼 유래 NB-LRR 면역 센서 저항성 유전자인 *OsWIR1*(*OsWRKY67*-inducible resistance gene1)을 이용한 식물의 병 저항성을 증가시키는 방법 및 그에 따른 식물체에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 *OsWIR1* 유전자가 *OsWRKY67*에 의해 조절되는 다운스트림 유전자임을 확인하고, 상기 *OsWIR1* 유전자가 과발현되는 돌연변이 식물체는 도열병균에 대해 강한 저항성을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 벼(*Oryza sativa*) 유래의 *OsWIR1* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *OsWIR1* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 식물체의 병 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 벼 유래의 *OsWIR1* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 병 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 비형질전환체에 비해 병 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 벼 유래의 *OsWIR1* 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 식물체의 병 저항성 증가용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 벼 유래의 *OsWIR1* 단백질을 코딩하는 유전자의 발현이 증가된 돌연변이 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

발명의 효과

[0017]

본 발명은 벼 유래의 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자를 이용하여 식물체의 병 저항성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 상기 유전자를 식물 형질전환용 발현벡터에 삽입하여 과발현시킴으로써 효과적으로 식물체의 도열병에 대한 저항성을 증진시킬 수 있으며, 결과적으로 작물의 수확량 증대 등 경제성에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0018]

도 1은 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이체(*OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 돌연변이)의 분리 및 특성을 나타낸다. (A) *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 돌연변이체 내에서 *OsWRKY67* 게놈구조 및 T-DNA 삽입부위의 모식도(schematic diagram). 박스 및 실선은 엑손 및 인트론을 각각 나타내며, T-DNA의 위치는 삼각형에 의해 나타내었다. 4X35S은 35S 인핸서를 의미한다. (B) *OsWRKY67-D1*, *OsWRKY67-D2* 돌연변이체 및 야생형 벼에서 *OsWRKY67* 유전자 발현의 RT-PCR 분석 결과를 나타낸다.

도 2는 트랜스펙션(transfection)된 옥수수 엽육 원형질체에서 *OsWRKY67*-GFP 융합 단백질의 세포 내 위치를 나타낸다. 엽록소 자가형광과 *OsABF1*-RFP는 엽록체 및 핵의 마커로서 각각 사용되었다. GFP(녹색) 및 RFP(적색) 형광으로부터 구별하기 위해, 위색(false color)(청색)이 엽록소 자가형광에 대해 사용되었다.

도 3은 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이체 및 야생형 동진(*Dongjin*) 잎에 벼 도열병균(*M. oryzae*) P06-6을 접종한 후의 저항성 반응 결과를 나타낸다. (A) 벼 도열병균 P06-6로 접종된 야생형 동진, *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 활성화 돌연변이 식물체의 질환 반응. 병증은 접종 후 10일에 보여준다. 내성 대조군 RIL260을 이용하였다. (B) 벼 도열병균 P06-6로 접종된 야생형 동진, *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 활성화 돌연변이 식물체의 잎 병변의 길이. *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2*는 야생형 동진에 비해 증가된 저항성을 나타내게 된다.

도 4는 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이체 및 야생형 동진(*Dongjin*) 잎에 벼 도열병균(*M. oryzae*) KI-215를 접종한 후의 저항성 반응 결과를 나타낸다. (A) 벼 도열병균 KI-215로 접종된 야생형 동진, *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 활성화 돌연변이 식물체의 질환 반응. 병증은 접종 후 10일에 보여준다. (B) 벼 도열병균 KI-215로 접종된 야생형 동진, *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 활성화 돌연변이 식물체의 잎 병변의 길이. *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2*는 야생형 동진에 비해 증가된 저항성을 나타내게 된다.

도 5는 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이체 및 야생형 동진(*Dongjin*) 잎에 벼 흰잎마름병균 PX099를 접종한 후의 저항성 반응 결과를 나타낸다. (A) 벼 흰잎마름병균 PX099로 접종된 야생형 동진, *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 활성화 돌연변이 식물체의 질환 반응. 식물은 5주령에 접종했고 병증은 접종 후 10일에 보여준다. (B) 야생형 및 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이체의 병변의 길이. 접종 후 0, 5, 10, 및 14일에 측정되었고, 세 잎의 평균값으로 나타내었다. 막대기는 SD값을 나타낸다. (C) 흰잎마름병균 성장곡선. 성장정도는 CFU/잎 콜로니 형성 단위를 log에 의한 정도로 나타내었고, 야생형 동진, *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2*에서 유사한 성장 단계의 세 잎에 대해 측정하였다. 막대기는 SD값을 나타낸다.

도 6은 벼 도열병균 접종 후 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이체 및 야생형 동진(*Dongjin*)에서 방어 관련 유전자들(*OsWRKY67*, *PR1a*, *PR1b*, *PR4*, *PR10a* 및 *PR10b*)의 발현 패턴을 RT-PCR 분석 결과를 통하여 나타낸다. 상기 유전자들의 발현은 야생형 동진, *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 활성화 돌연변이에 벼 도열병균 P06-6 처리 0, 12 및 24시간 후 돌연변이체 및 야생형 식물에서 분석되었다. *OsUbq5*은 내부 대조군으로 사용되었다.

도 7은 벼 도열병균 접종 후 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이체 및 야생형 동진(*Dongjin*)에서 방어 관련 유전자들(*EDS1*, *PAD4*, *ICS1*, *CHS1*, *PAL2*, *PAL3*, *PAL5*, *PAL6*, *PAL8* 및 *PAL9*)의 발현 패턴을 RT-PCR 분석 결과를 통하여 나타낸다.

도 8은 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이체 및 야생형 동진(*Dongjin*)에서 키틴(A) 또는 flg22(B) 처리 후 유도되는 ROS 반응 결과를 나타낸다. 오차 막대는 표준오차를 나타낸다(n=3).

도 9는 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이체에서의 유전자 온톨로지(GO) 분석 결과를 나타낸다.

도 10은 생물학적 스트레스에서의 맵맨(Mapman) 분석을 나타낸다. 적색은 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이체에서의 상향조절을 가리킨다.

도 11은 벼 도열병균 접종 후 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이체 및 야생형 동진(*Dongjin*)에서 R 유전자들의 발현 패턴을 나타낸다.

턴을 RT-PCR 분석 결과를 통하여 나타낸다. 6가지 R 유전자들의 발현은 야생형 동진, *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 활성화 돌연변이체 및 도열병균 P06-6 처리 0, 12 및 24시간 후 돌연변이체 및 야생형 식물에서 분석되었다. *OsUbg5*은 내부 대조군으로 사용되었다.

도 12는 *OsWIR1* 활성화 돌연변이체의 분리 및 특성을 나타낸다. (A) 돌연변이 *OsWIR1-D*에서 *OsWIR1* 게놈구조 및 T-DNA 삽입부위의 모식도(schematic diagram). 박스 및 실선은 엑손 및 인트론을 각각 나타내며, T-DNA의 위치는 삼각형에 의해 나타내었다. 4X35S은 35S 인핸서를 의미한다. (B) *OsWIR1-D* 활성화 돌연변이체(T/T) 및 야생형(W/W) 벼 식물에서 *OsWIR1* 유전자 발현의 RT-PCR 분석 결과.

도 13은 *OsWIR1* 활성화 돌연변이체 및 야생형 동진(*Dongjin*) 잎에 벼 도열병균(*M. oryzae*) P06-6 또는 KI-215를 접종한 후의 저항성 반응을 나타낸다. (A) 벼 도열병균 P06-6로 접종된 야생형 동진, *OsWIR1-D* 활성화 돌연변이 식물체의 질환 반응. 병증은 접종 후 8일에 보여준다. (B) 벼 도열병균 P06-6로 접종된 야생형 동진, *OsWIR1-D* 활성화 돌연변이 식물체의 잎 병변의 길이. *OsWIR1-D* 활성화 돌연변이는 야생형 동진에 비해 증가된 저항성을 나타내게 된다. (C) 벼 도열병균 KI-215로 접종된 야생형 동진, *OsWIR1-D* 활성화 돌연변이 식물체의 질환 반응. 병증은 접종 후 6일에 보여준다. (D) 벼 도열병균 KI-215로 접종된 야생형 동진, *OsWIR1-D* 활성화 돌연변이 식물체의 잎 병변의 길이. *OsWIR1-D* 활성화 돌연변이 식물체는 야생형 동진에 비해 증가된 저항성을 나타내게 된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼(*Oryza sativa*) 유래의 *OsWIR1* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *OsWIR1* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 식물체의 병 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 상기 *OsWIR1*(*OsWRKY67*-inducible resistance gene1) 단백질의 범위는 서열번호 2의 아미노산 서열번호를 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2의 아미노산 서열번호를 갖는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체 내에서 병 저항성을 증가시키는 활성을 의미한다.
- [0021] 또한, 상기 *OsWIR1* 단백질을 코딩하는 유전자는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 *OsWIR1* 유전자 cDNA 서열은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0022] 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0023] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0024] 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다.
- [0025] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당

하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0026] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0028] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0029] 본 발명의 벡터를 원핵세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 상기 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다.

[0031] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법, 하나한 방법(Hanahan, D., 1983, J. Mol. Biol., 166:557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 병 저항성은 베타 도열병에 대한 저항성인 것일 수 있고, 바람직하게는 도열병균 P06-6 또는 KI-215에 의한 베타 도열병에 대한 저항성일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 또한, 본 발명은 베타 유래의 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 비형질전환체에 비해 병 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자는 전술한 바와 같다.

[0035] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 의해 매개될 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

- [0037] 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).
- [0038] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 비형질전환체에 비해 병 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다. 상기 식물체는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물 또는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 단자엽 식물이며, 더욱 바람직하게는 벼이다.
- [0039] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 식물체의 병 저항성 증가용 조성물을 제공한다. 본 발명의 식물체의 병 저항성 증가용 조성물은 유효성분으로 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 병 저항성을 증가시킬 수 있는 것이다.
- [0040] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현이 증가되어 병 저항성이 증가된 돌연변이 식물체를 제공한다.
- [0041] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물체에서, 상기 OsWIR1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 증가는 T-DNA 활성화 태깅(tagging) 방법에 의해 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 재료 및 방법

[0044] 식물체 재료 및 성장 조건

[0045] 벼 T-DNA 돌연변이 집단에서 OsWRKY67의 발현이 증가된 두 개의 활성화 돌연변이(*OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2*)와 그들의 야생형 식물체인 동진(*Dongjin*)이 연구에 사용하였다. 자포니카(*japocanica*) 벼 재배종인 동진을 벼 도열병균 접종 실험과 흰잎마름병 접종 실험에서 감수성 대조군으로서 주로 이용했다. 벼는 일반적으로 14/10 시간의 명/암 사이클로, 낮 동안은 30℃ 온도로 하고, 밤 동안은 20℃로 하여 온실에서 재배했다.

[0046] 병원균 접종 및 병 평가

[0047] 벼 도열병균 분리주 P06-6 및 KI-215는 모든 표현형 분석에 이용했다. 벼 도열병균 분리주들은 RIL260에는 병증을 나타내지 않는 안정한 필리핀 분리주이다. 모든 접종 및 질환 평가는 Chen 등(Chen 등, 1996, Plant Disease 80: 52-26)이 기재한 바와 같이 경희대학교의 온실에서 수행했다. 5주령의 잎을 접종 실험에 사용했다. 벼 도열병균 P06-6 및 KI-215는 귀리 아가 배지에서 2주 동안 22℃ 암실에서 배양했고, 채집 3일 전에 코니디아(conidia)를 유도했다. 접종된 식물체는 24℃의 암실로 24시간 동안 배양 챔버에서 유지한 후, 95% 습도에서 빛을 제공하며 14시간 동안 유지했다. 질환 평가는 접종 9~10일 후 수행했다. 벼 흰잎마름병 분리주 PX099는 모든 표현형 분석에 이용했다. 접종을 위해 5주령의 잎을 사용했다. 벼 흰잎마름병균 PX099는 펩톤 자당 아가 배지에 3일간 28℃에서 증식시킨 후 증류수에 농도가 0.8(OD₆₀₀)이 되도록 현탁하여 Park 등(Park 등, 2010, PLoS One 5:e9262)이 기재한 바와 같이 접종 실험을 수행했다. 질환 평가는 접종 14일 후 수행했다.

[0048] OsWRKY67-GFP 융합 단백질의 세포 내 위치

[0049] OsWRKY67 유전자는 프라이머 쌍: 정방향 프라이머 (5'-CACCATGAGGTACGAGCGAGGAGAA-3'(서열번호 3)) 및, C-말단 GFP 융합에 대한 역방향프라이머 (5'-GAAGAGCAGCGAGCCGCTGCCGAATA-3'(서열번호 4))를 이용하여 PCR에 의해 증폭되었다. 그 다음에 PCR 산물은 pENTR™/D-TOPO 벡터 (Invitrogen, Gaithersburg, MD) 내로 서브클로닝 되었다. 그 후 검증된 삽입체는 제조자의 지시에 따라 LR clonase(Invitrogen)를 이용하여 목적 벡터인 C-말단 GFP

융합을 위한 p2GWF7 내로 서브클로닝 되었다. CaMV35S 프로모터에 의해 유도된 생성된 융합 구축물(OsWRKY67-GFP)은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-칼슘 매개 방법을 이용하여 옥수수 엽육 원형질체 내로 운반되었고, 이어서, 일시적인 발현을 가능케 하는 12 내지 24시간의 인큐베이션이 수행되었다. 엽록소 자가형광 및 OsABF1-RFP가 엽록체 및 핵 마커로서 각각 사용되었다. 상기 융합 구축물의 발현은 공초점 현미경(LSM510 META, Carl Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 모니터링 되었다.

RNA 분리 및 RT-PCR 분석

총 RNA는 정상 성장 조건하에 벼 식물 및 도열병-처리 유묘 잎으로부터 Trizol 시약 (Invitrogen, Gaithersburg, MD)을 사용하여 분리되었다. 1 μ g의 정제된 총 RNA, oligo(dT) 프라이머 및 First Strand cDNA Synthesis kit (Roche)을 이용하여 제 1가닥 cDNA가 합성되었다. 벼 유비퀴틴5(*ubiquitin 5; OsUBQ5*) 유전자는 cDNA의 상대적인 양을 정량하기 위해 내부 대조군으로서 증폭되었다. 표 1에서 사용된 프라이머 서열을 나타내었다.

표 1

본 발명한 사용된 프라이머 서열

프라이머	정방향	서열 번호	역방향	서열 번호
OsWRKY67-D1	CTCATAGCATTGACCTTCACTTCCTCTA	5	TCTTTTGTGTTTCTTGCTCTAGTCCTTG	6
OsWRKY67-D2	AAATTTCCTACATCGGCTAAGAGTACAA	7	TGCTATCAAATTATCCCTCAAGAAGTGA	8
OsWRKY67-RT*	CTTCAGCAACTCCTACTCCTACT	9	TCTCGTACCTCATCATAGTGT	10
PR1a*	TTATCCTGCTGCTTGCTGGT	11	GGTCGTACCACTGCTTCTCC	12
PR1b*	GATTAACATATGGAGGTATCCAAGC	13	ACGTACGCCCCGTGTGTATAAATAA	14
PR4*	CAAACCTACCTCATCTCCATCAG	15	TCCAGTATATGATCATGCAAAGAG	16
PR10a*	ACCATCTACACCATGAAGCTTAAC	17	GTATCTCTTTCATCTTAGGCGTA	18
PR10b*	GGCACCATCCACATCATGAAGCTT	19	CACGCCACAGTAACATGACCACAA	20
EDS*	TCAGTTGGATCCCCAGCAA	21	TCCCAAGTAATCCACGCAAAAC	22
PAD4*	GCCAGCTCCCCTACGACTTC	23	CGTGTGCGGTGTAGGTTGTT	24
ICS1*	TATGGTGCTATCCGCTTCGAT	25	CGAGAACCGAGCTCTCTTCAA	26
CHS1*	CCGGCGAACTGCGTGTAC	27	TTCTGATCTGCGACTTGTCA	28
PAL2*	GTCATGAACAGCATGATGAA	29	CATTGAGCAGCTTGGTGATG	30
PAL3*	CAGCTGTGGAGAACGGCA	31	GTGTACATTGAAGAATCCTT	32
PAL5*	TCCAAGTTGAGCTGCTCAG	33	GTCCACCTTCTTGCCATCGA	34
PAL6*	GTCATGAACAGCATGATGA	35	CTGGAGCAGAGTGTTGATG	36
PAL8*	TGAATGGCACCGACACGTAC	37	GTTGAGCAGCTTGGCGATG	38
PAL9*	GTCTTCGACAGCACCATGA	39	TGGCCTCGAAGAGCACGATC	40
LOC_Os11g38480-D	TGATTGTTCAAGCCGGAGCAAGTCCTTAG	41	ACAGCCATTGATGCAAGGTAATTGCCACT	42
LOC_Os11g39310 RT*	GGCACATGGATAAGACATCTTCCAG	43	AGCTCCAGCAGCACCAACAATAAG	44
LOC_Os11g39320 RT*	AGAGGATGAAGTTGTGCGCATGTCC	45	CTCTCCACTGATGCAAGGCAAGTTT	46
LOC_Os11g38000 RT*	TTTATTCTCACAAGTTCGGCAGCA	47	CGGTTATCAACACAGCACCTCTGA	48
LOC_Os11g39190 RT*	AAGGCTGGGAGAATTGAAGGATG	49	CTGGCATGTGCTTTATTTGTGTGC	50
LOC_Os11g38480 (OsWIR1) RT*	AACGCCGTGATGATTTGGAAGATA	51	CTCAAGTTTCTTGGGATGGGGAAG	52
LOC_Os11g42040 RT*	AAGTCCTTACCGGCATCACTGACA	53	CTGAGGTCCAAAGTTTGCAGGTTG	54
OsUBQ5*	GGAACTGGTATGGTCAAGGC	55	AGTCTCATGGATACCCGACG	56
2715RB	ATCCAGACTGAATGCCACACAGG	57		

*는 RT-PCR 분석을 위해 사용된 프라이머 세트를 나타낸다.

ROS의 측정

4주령의 잎 디스크는 잘라서 멸균수에서 밤새 전배양하였다. 잎 디스크에서 유도인자(elicitor) 처리 후 ROS 생산은 루미놀 화학발광 분석(luminol chemiluminescence assay; Schwacke 및 Hager, 1992, Planta 187:136-

141)을 사용하여 모니터링하였다. 샘플마다 3개의 잎 디스크를 100 μ l의 루미놀(luminol, Bio-Rad Immun-Star horseradish peroxidase substrate 170-5040), 1.0 μ l의 겨자무 과산화효소(horseradish peroxidase) 및 유도인자(100 nM flg22, 8nM 키틴(hexa-N-acetyl-chitohexase) 또는 대조구인 물)가 포함되어 있는 마이크로원심분리 튜브에 넣었다. 처리 직후, 발광은 Glomax 20/20 luminometer(Promega)을 사용하여 20분 동안 10초 간격으로 계속 측정하였다. 각 독립 실험을 3회 반복 수행하였다. 각 처리에 대한 표준오차를 계산하였다.

[0056]

마이크로어레이 분석

[0057]

마이크로어레이 분석을 위해 *OsWRKY67-D1*, *OsWRKY67-D2* 및 그들의 야생형 식물체인 동진을 온실에서 생육시켰다. 3주령의 잎을 실험에 사용하였으며 생물학적 재현성을 위해, *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 모종은 독립적으로 3회 샘플링하고 동진 모종은 2회 샘플링했다. 총 RNA는 제조자의 지시에 따라 Mini RNA kit(Qiagen)를 사용하여 추출하고 Rice Gene Expression Microarray and Gene Expression Hybridization kit(Agilent)를 사용하여 분석했다. 신호는 Agilent DNA 마이크로 어레이 스캐너로 검색되었고, 개별 프로브에 대한 신호 강도는 Agilent Feature Extraction Software 버전 7.5.1을 사용하여 분석되었다. 강도는 분위수(quantile)법에 의해 표준화되었고 log2 스케일로 변형되었다(Bolstad 등, 2003, Bioinformatics 19:185-193).

[0058]

유전자 온톨로지(Gene Ontology) 인리치먼트 분석

[0059]

생물학적 프로세스에서 야생형과 비교하여 *OsWRKY67-D* 식물체에서 상향조절된 354개 유전자에 대해서 GO 분석을 하였다. 쿼리(querying) 유전자 목록에서 각 GO 슬림 텀(Slim term)에 대하여 폴드-인리치먼트(fold-enrichment)를 측정했고, GO 텀(term) 및 2-폴드 이상의 GO 인리치먼트값을 가지면서 하이퍼 게노믹(hypergenomic) p-값이 0.05 미만인 연관 유전자 엔트리(entry)를 동정했다(도 9). 각 GO 텀에 대해, 폴드-인리치먼트는 유전자의 예상된 수에 의해 나뉘진 유전자 목록에서 관찰된 유전자 수인데, 전체 게놈과 비교된 유전자 목록의 크기로 주어졌다.

[0060]

맵맨(MapMan) 분석

[0061]

현재 36개의 맵맨 빈(MapMan BIN)이 벼 맵맨 분류에 사용되었고, 이들 빈(BIN)은 계층적 방식에서 하위 빈(BIN)으로 확대될 수 있었다. 다양한 맵맨 툴(Tool)의 트랜스크립톰(transcriptome) 분석으로부터 중요한 유전자 발현 데이터를 통합시키기 위해서, 야생형과 비교하여 *OsWRKY67-D* 식물체에서 상향조절된 354 유전자의 평균 폴드-변화 데이터와 MSU 유전자와 ID를 포함하는 데이터 세트를 만들었다. 도 10을 위해 발명자는 맵맨에 설치된 툴킷(toolkit)의 생물적-스트레스-개요(overview)를 사용하였다. 구체적인 과정은 본 발명자 그룹에 의한 최근 연구에서 기술되었다(Jeong 및 An, 2012, J Plant Biol 55:436-449).

[0062]

실시예 1. OsWRKY67 활성화 돌연변이의 분리

[0063]

생물학적 스트레스 조건하에서 병 저항성을 조절하는 OsWRKY67의 생체내(*in vivo*) 기능을 조사하기 위한 첫 단계로, T-DNA 돌연변이 집단(Jeong 등, 2006, Plant J. 45:123-132)에서 2개의 활성화 돌연변이를 분리했다. 분리된 대립유전자들, *OsWRKY67-D1*와 *OsWRKY67-D2*는(D는 *dominant*를 의미) 각각 *OsWRKY67* 유전자의 번역 개시 코돈으로부터 약 6.4, 3.4 kb 업스트림에 T-DNA 삽입을 포함한 것이다(도 1A). *OsWRKY67* 특이적 프라이머(서열번호 5-6 또는 7-8; 표 1 참조) 및 T-DNA 특이적 프라이머(서열번호 57; 표 1 참조)를 사용하여 이들의 자손에서 동형 접합체성 돌연변이를 분리하였다. *OsWRKY67* 전사체의 획득은 서열번호 9 및 10의 프라이머(표 1 참조)를 사용한 RT-PCR 분석에 의해 확인되었다. 그 결과 활성화 돌연변이에서의 *OsWRKY67* 전사체가 야생형에서보다 높다는 것을 나타냈다(도 1B).

[0064]

실시예 2. OsWRKY67의 세포 내 위치

[0065]

OsWRKY67 단백질의 세포 내 위치를 결정하기 위해, CaMV 35S 프로모터의 조절하에 OsWRKY67-GFP 융합 구축물을 제조하였다. 그 후 구축물은 옥수수 엽육 원형질체에서 발현되었다. 상기 결과는 OsWRKY67-GFP 융합 단백질이

옥수수 원형질체의 핵에서 발현된다는 것을 보여주었다(도 2). 공위치(colocalization)는 핵 마커인 OsABF1-RFP를 이용하여 확인되었다. 상기 데이터는 OsWRKY67이 핵 단백질이며, 따라서 전사인자로서 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 보여준다.

[0066] 실시예 3. OsWRKY67 활성화 돌연변이 식물체의 분석

[0067] *OsWRKY67* 유전자가 벼 도열병균 분리주에 대한 내성을 부여하는지 여부를 시험하기 위해, 벼 도열병균 P06-6에 대해 매우 감수성인 동진과 동진을 모본으로 한 *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 접종실험은 *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 식물체가 모두, RIL260에 필적할만한 벼 도열병균 P06-6에 대한 내성을 나타낸 반면, 야생형 대조균 식물체는 감수성 표현형을 나타낸다는 것을 밝혔다(도 3). 종 특이성은 저항성(*R*) 유전자 매개 병 저항성과 다른 유형의 병 저항성을 구별하기 위한 가장 중요한 요점들 중 하나이다. *OsWRKY67* 유전자에 의한 레이스 특이적인 도열병 저항성을 조사하기 위해 P06-6과 다른 도열병 분리주인 KI-215로 접종실험을 수행하였다. 그 결과, *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 활성화 돌연변이는 벼 도열병균 분리주에 대해 저항성 표현형을 나타냈으며, 대조적으로 야생형 식물체는 감수성 표현형을 반복한다는 것을 밝혔다(도 4). 상기 결과들은 *OsWRKY67* 유전자가 광범위 벼 도열병균 분리주에 대한 내성에 필요하다는 것을 증명했다. *OsWRKY67* 유전자가 벼 흰잎마름병균 분리주에 대한 내성을 부여하는지 여부를 시험하기 위해, 벼 흰잎마름병균 PX099에 대해 매우 감수성인 동진과 동진을 모본으로 한 *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 접종실험에서 분리된 *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2* 활성화 돌연변이들은 병 저항성이 현저히 증가하였음을 확인하였고(도 5A 및 5B), 이와 일관되게 세균 증식 또한 *OsWRKY67-D* 돌연변이 식물에서는 감소하였다(도 5C). 상기 결과는 벼 도열병균균 분리주 접종과 마찬가지로 분리한 *OsWRKY67-D* 활성화 돌연변이 라인이 적어도 다른 두 가지 병원균에 동시에 강한 저항성을 가짐을 의미하며, *OsWRKY67*이 다중 식물병 저항성을 조절함을 뒷받침한다는 것을 시사한다.

[0068] 실시예 4. *OsWRKY67* 활성화 돌연변이에서의 방어-관련 유전자의 발현 확인

[0069] 증가된 병 저항성은 다면발현 발생학적 및/또는 형태학적 이상(perturbation)을 가지는 돌연변이체에서 빈번하게 관찰되고, 이러한 경우에는 방어 마커 유전자 또는 스트레스-방어 유전자의 필수 구성요소와 관련이 있다. *OsWRKY67-D* 돌연변이체는 정상 성장조건 하에서의 발생학적 및 형태학적 변화는 관찰되지 않았다. 병원균에 대한 벼 방어에서 *OsWRKY67*의 효과를 알아보기 위해서, *OsWRKY67-D* 및 야생형 동진에서의 방어-관련 유전자의 발현을 비교하는 RT-PCR 분석을 수행하였다. 야생형, *OsWRKY67-D1* 및 *OsWRKY67-D2*에 도열병균 P06-6을 스프레이 방법으로 접종 처리한 후 0, 12 및 24시간에 식물체 잎으로부터 총 RNA를 추출하여 5개의 *PR* 유전자의 발현 패턴을 조사하였다. *PR1* 전사체 축적은 병원균 접종 전 야생형에서 전혀 보이지 않는데 비해, *OsWRKY67-D* 식물체에서는 접종 전에도 상당량 검출되었다(도 6). *OsWRKY67-D* 식물체는 야생형에 비해 *PR1b* 전사체를 더 많이 축적했다(도 6). *PR4*, *PR10* 및 *PR10b* 전사체의 발현 수준에 아주 적은 변화를 나타내거나 전혀 나타내지 않았다(도 6).

[0070] SA와 JA는 식물 방어 반응에서 핵심 신호전달 분자이다. *OsPR1*의 발현은 SA 신호전달 경로 또는 SA 및 JA 신호전달 경로에 의존적인 것으로 여겨진다. *PR1b*는 벼에서 SA- 및 JA-의존적 신호전달 경로를 통해 병원균에 대한 방어반응에서 기능을 나타낸다(Xie 등, 2011, Mol Plant 4:688-696). 그러므로, 본 발명자는 방어 신호전달 네트워크(network)에서 *OsWRKY67*의 활성화 부위가 SA 및 JA의 다운스트림(downstream)일 것이라는 가설하에 *OsWRKY67-D* 돌연변이체에서 SA- 또는 JA-의존적 방어 신호전달 경로에 기능을 하는 것으로 알려진 10개 유전자의 발현을 조사하였다. 8개 유전자, *EDS1*, *PAD4*, *ISC1*, *CHS*, *PAL2*, *PAL5*, *PAL8* 및 *PAL9*의 발현은 병원균 접종에 의해 변화되지 않았다(도 7). 반면, *PAL3*의 발현 수준은 병원균 감염 전 야생형에서보다 *OsWRKY67-D*에서 현저하게 높았다(도 7).

[0071] 실시예 5. ROS 측정

[0072] 벼에서 *OsWRKY67*의 발현이 PAMP 유도인자 처리 후 ROS 생산에 영향을 미치는지 시험하기 위해서, *OsWRKY67* 활성화 돌연변이 및 야생형 식물체로부터 잎을 수거하여 키틴과 flg22 처리 후의 ROS 억제 실험을 통하여 일시적인 ROS 수준을 정량하였다. ROS 생산의 가능성을 측정하기 위해서, 4주령의 *OsWRKY67-D* 돌연변이 및 야생형 식물체 조직에 세균성 유도인자 f1a22 또는 진균 PAMP 키틴 처리 후, ROS 생산을 분석하였다. 도 8에서 보여주는 것처럼, *OsWRKY67-D* 돌연변이 식물체는 야생형 식물체에 비교하여 f1g22 또는 키틴 유도인자 처리 후 10분 내에 ROS

생산의 50%까지 유도하였고, 상기 결과는 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이에서의 기초적인 저항성의 증가가 f1g22 및 키틴-유도에 따른 빠르고 일시적인 ROS의 버스트(burst)에 의존하는 것이라는 것을 제안한다.

실시예 6. *OsWRKY67*가 특이적으로 조절하는 다운스트림 유전자를 조사하기 위한 마이크로어레이 분석

OsWRKY67-D1 및 *OsWRKY67-D2* 활성화 돌연변이 라인과 야생형 동진에서의 RNA 발현 변화를 Agilent 60K 마이크로어레이를 통해 비교했다. 그 결과 야생형과 비교하여 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이에서 0.05 미만의 p-값의 적어도 2배 이상의 상향조절을 보이는 347개 유전자를 확인하였다.

실시예 7. *OsWRKY67* 과발현과 관련된 유전자 온톨로지(GO) 분석

OsWRKY67 활성화 돌연변이에서 병원균 감염에 대하여 발현의 차이를 나타내는 유전자의 반응을 조절할 가능성이 있는 생물학적 경로를 확인하기 위하여, GO 범주 인리치먼트 분석이 0.05 이하의 p-값으로 조정된 FDR을 한계(cutoff)로 사용하여 수행되었다. 생물학적 프로세스에서의 365개 GO 텀(term) 주석이 347개 상향조절된 유전자 중 196개 탐침 세트를 부여했다. 인리치먼트된 GO 텀(term)의 분포는 *OsWRKY67* 과발현과 강하게 관련된 GO 텀(term)을 나타냈다. 또한, 질 이온 수송, 내생세균 생합성 과정, 세포적 기작 과정, 아포토시스(apoptosis) 및 방어 반응 유전자들의 적어도 2배 이상의 인리치먼트(enrichment)를 확인하였다(도 9).

실시예 8. *OsWRKY67* 과발현과 관련된 맵맨(Mapman) 분석

유전자 온톨로지 분석에서 "방어 반응" 유전자가 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이에서 발현량 증가를 보임을 확인했으므로, 맵맨(MapMan) 소프트웨어(<http://mapman.gabipd.org>)를 이용하여 발현의 차이를 나타내는 유전자 목록을 분석했다. 맵맨 그래프(도 10)에서는 야생형과 비교하여 *OsWRKY67-D* 돌연변이체에서 상향조절된 유전자로 구성된 생물적 스트레스 개요(Biotic stress overview)가 나타났는데, 이는 주요 병 저항성 경로에 관련된 효소를 코딩하는 유전자의 일반적인 조절 패턴의 개요(overview)를 나타낸다. 병원균에 대한 식물 반응의 개요를 위한 유전자의 선별은 다음의 맵맨의 기능적 범주에서의 수 많은 조절되는 유전자들을 밝혔다: "R 유전자에 의한 인식", "호흡의 폭발적인 많은 양(respiratory burst)", "열충격단백질", "여러가지 다양한 기능", "신호전달", "맵 캐스케이드(MAPK cascades)", "전사인자", "병원균-연관(PR) 단백질에 의한 방어 반응", "단백질 분해" 및 "이차대사산물". 하기에서, 각 범주의 구성성분을 기술했다.

R 유전자에 의한 병원균 인식: 마이크로어레이 실험에서, 방어 반응에 포함되는 22개의 유전자는 *OsWRKY67*에 의해 상향조절되고, 19개의 유전자는 하향조절되었다. 하기 표 2는 *OsWRKY67-D* 돌연변이체에서 상향조절된 방어 관련 R 유전자를 나타낸다. 이 6개의 방어 관련 R 유전자, *LOC_Os11g39310*, *LOC_Os11g39320*, *LOC_Os11g3800*, *LOC_Os11g39190*, *LOC_Os11g38480* 및 *LOC_Os11g42040*은 염색체 11에 클러스터되어있다. 상기 유전자 중, *LOC_Os11g38480* 유전자는 NB-LRR 도메인을 가지는, 이삭도열병(*Panicle blast*) 1(*Pb1*)-유사 유전자이다(Hayashi 등, 2010, Plant J 64:498-510). 이러한 연구는 *OsWRKY67*이 R 유전자 그룹을 높은 진폭에서 상향조절하고 더욱 강한 방어 반응을 유도한다는 것을 나타낸다.

표 2

OsWRKY67-유도 방어 관련 R 유전자에 대한 마이크로어레이 데이터의 요약

MSU_ID	annotation	Fold Change (<i>OsWRKY67-D1/Dongiin</i>)	P.Value
LOC_Os11g39310	NB-ARC domain containing protein, expressed	6.54	1.6E-05
LOC_Os11g39320	NZ-NBS-LRR class, putative, expressed	4.86	6.3E-05
LOC_Os11g38000	NB-ARC domain containing protein, expressed	4.58	1.4E-04
LOC_Os11g39190	NB-ARC domain containing protein, putative, expressed	4.60	8.6E-05
LOC_Os11g38480	NBS-LRR type disease resistance protein, putative, expressed	3.82	6.3E-04

LOC_Os11g42040	non-TIR-NBS-LRR type resistance protein, putative, expressed	2.28	4.7E-04
----------------	--	------	---------

[0081]

신호전달 구성요소: 신호전달 내에 소분류의 수용기 키나아제(receptor kinase)가 더욱 현저하게 상향조절됨을 보였다(표 3). 하기의 표 3에서 보이는 바와 같이 수용기 키나아제의 과발현은 벼 도열병균 감염에 대해 신호 지각이 광범위하게 활성화된다는 것을 제안한다. 칼슘/칼모둘린 의존 단백질 키나아제 유전자(Calcium/calmodulin dependent protein kinase gene, CDPKs)가 또한 상향 조절되었는데, 칼슘 신호전달이 잘 관련되어 있다는 것을 제안한다(표 3).

표 3

[0082]

신호전달 범주에서의 병 저항성 스트레스 반응에 관련되는 유전자 목록

Gene model ^a	Putative function	Fold change ^b
LOC_Os08g39550.1	receptor kinases.leucine rich repeat XI	1.25
LOC_Os11g36160.1	receptor kinases.leucine rich repeat XI	2.28
LOC_Os02g06270.1	receptor kinases.leucine rich repeat XI	1.06
LOC_Os11g35980.1	receptor kinases.leucine rich repeat XI	1.13
LOC_Os08g29980.1	receptor kinases. DUF 26	1.04
LOC_Os05g31600.1	receptor kinases. DUF 26	1.10
LOC_Os07g43560.1	receptor kinases S-locus glycoprotein like	1.09
LOC_Os06g13320.1	receptor kinases S-locus glycoprotein like	1.22
LOC_Os07g43570.1	receptor kinases S-locus glycoprotein like	1.07
LOC_Os11g35220.1	receptor-like kinase.WAK117	1.58
LOC_Os02g58730.1	G-proteins	1.40
LOC_Os08g34240.1	calcium.calmodulin dependent protein kinase	2.04

[0083]

^aGene model; 미시간 주립대학에서 벼 게놈 주석 프로젝트에 의해 주석이 달린 유전자 모델. ^bFold change; 야생형 및 샘플에 대한 *OsWRKY67-D* 돌연변이체 및 샘플의 log2 비율.

[0084]

호르몬 신호전달: 식물 호르몬은 다양한 성장 및 발달 과정 뿐만 아니라 생물적 및 비생물적 스트레스에 대한 다양한 식물 반응에서도 중요한 기능을 한다. 특히, WRKY 단백질들은 식물 호르몬 신호전달을 조절한다. 본 발명자는 자스모네이트(*LOC_Os02g10120*) 및 에틸렌(*LOC_Os08g30080* 및 *LOC_Os11g33394*) 신호전달과 연관된 3개 요소를 확인하였다(표 4). 에틸렌만큼 자스모네이트가 식물 병원균 저항성에서 중요한 기능을 한다는 것이 보고되어 있다.

표 4

[0085]

호르몬 신호전달 범주에서 병 저항성 스트레스 반응을 나타내는 유전자 목록

Gene model ^a	Putative function	Fold change ^b
LOC_Os02g10120.1	jasmonate.synthesis-degradation. LOX2	1.92
LOC_Os08g30080.1	ethylene.synthesis-degradation. 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	1.32
LOC_Os11g33394.1	ethylene.signal transduction. unknown protein	2.31

[0086]

^aGene model; 미시간 주립대학에서 벼 게놈 주석 프로젝트에 의해 주석이 달린 유전자 모델. ^bFold change; 야생형 및 샘플에 대한 *OsWRKY67-D* 돌연변이체 및 샘플의 log2 비율.

[0087]

이차 대사 및 단백질/세포벽 분해: 본 발명자는 11개의 이차 대사-관련 요소, 8개의 단백질 분해-관련 요소, 1개의 세포벽 분해-관련 요소를 확인하였다(표 5). 식물체에서 이차 대사산물이 생물적 및 비생물적 스트레스에

대한 방어에서의 생태학적인 역할과 연관된 기능을 수행한다고 주지되어 있다. 5가지 유형의 이차 대사산물이 확인되었다: 플라보노이드(flavonoid, 4개 요소), 페닐프로페노이드(phenylpropanoid, 2개 요소), 테르페노이드(terpenoid, 2개 요소), 카로테노이드(carotenoid, 1개 요소), 및 그 외 것(2개 요소). 또한, 본 발명자는 단백질 분해와 관련된 8개의 요소를 확인하였다(표 5). 병 저항성에서 단백질 분해의 기능은 아마 R 단백질의 수준을 조절할 것으로 추측된다. 이 가능성을 지지하여, RPM1은 RPM1-매개 신호전달의 활성화 이후 빠르게 분해됐다(Boyes 등, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 95:15849-5854). 병 저항성에서 유비퀴틴화(ubiquitination)의 기능은 신호단백질의 변형 및 전사, 단백질 수송, 막 수송 또는 단백질 카나아제의 활성화와 같은 세포적 과정을 조절할 수 있었다(Pickart, 2001, Mol. Cell 8:499-504). 세포벽 분해는 활동기생균으로부터 식물을 보호하는 기작으로서 간주되었다(Sun 등, 2011, Plant Physiol 155:1976-1987). 본 발명의 분석에서 1개의 요소는 세포벽 분해와 관련이 있는 것으로 나타났다(표 5).

표 5

이차 대사 및 단백질/세포벽 분해 범주에서의 병 저항성 스트레스 반응에 포함되는 유전자 목록

Functional category ^a	Gene model ^b	Putative function	Fold change ^c
secondary metabolism	LOC_Os07g09190.1	isoprenoids.non-mevalonate pathway.DXS1	1.34
	LOC_Os05g33840.1	isoprenoids.non-mevalonate pathway.DXS1	1.58
	LOC_Os07g43370.1	isoprenoids.carotenoids.amine oxidase	1.46
	LOC_Os02g36210.1	isoprenoids.terpenoids.ent-kaurene synthase	1.18
	LOC_Os03g22620.1	isoprenoids.terpenoids.terpene synthase	1.43
	LOC_Os10g02840.1	phenylpropanoids.O-methyltransferase	1.39
	LOC_Os12g04080.1	phenylpropanoids.transferase	3.16
	LOC_Os02g57480.1	flavonoids.anthocyanins.anthocyanin acyltransferase 5-aromatic	1.02
	LOC_Os02g28340.1	flavonoids.anthocyanins.anthocyanin acyltransferase 5-aromatic	1.27
	LOC_Os07g40974.1	flavonoids.dihydroflavonols.NAD dependent epimerase/dehydratase	3.51
protein	LOC_Os07g40986.1	flavonoids.dihydroflavonols.NAD dependent epimerase/dehydratase	3.19
	LOC_Os04g47360.1	degradation.OsPOP9	2.16
	LPC_Os05g07710.1	degradation.autophagy	1.63
	LOC_Os02g57410.1	degradation.cysteine protease	2.14
	LOC_Os03g26930.1	degradation.serine protease.OsSCP13	1.35
	LOC_Os06g12370.1	degradation.metalloprotease.OsFtsH6	1.91
	LOC_Os07g25410.1	degradation.metalloproteasepeptidase	1.41
	LOC_Os10g33620.1	degradation.ubiquitin.ubiquitin.UBQ14	1.46
	LOC_Os11g34270.1	degradation.ubiquitin.ubiquitin protease.UBP18	1.55
	LOC_Os11g19210.1	cell wall degradation	1.29

^aFunctional category; 맵맨 분석에서 최상의 수준의 팀. ^bGene model; 미시간 주립대학에서 벼 게놈 주식 프로젝트에 의해 주석이 달린 유전자 모델. ^cFold change; 야생형 및 샘플에 대한 *OsWRKY67-D* 돌연변이체 및 샘플의 log2 비율.

실시예 8. *OsWRKY67* 돌연변이에서의 다른 WRKY 전사인자들의 발현 양상 확인

본 발명자는 5개 WRKY 유전자(*OsWRKY28*, *OsWRKY45*, *OsWRKY62*, *OsWRKY76* 및 *OsWRKY125*)의 발현이 *OsWRKY67-D* 돌연변이체에서 감소됨을 확인했다(표 6). *OsWRKY28*은 벼 도열병 저항성에 네가티브 조절에서의 역할을 하였다(Delteil 등, 2012, Mol Plant Pathol 13:72-82). *OsWRKY62*의 과발현은 *Xa21*-매개 저항성을 감소시킨다(Peng 등, 2006, Mol. Plant 1:446-458). 벼에서 *OsWRKY76*의 과발현은 벼 흰잎마름병에 대한 저항성을 감소시켰다(Seo 등, 2011, PLoS Genet 7(4):e1002020. doi:10.1371/journal.pgen.1002020). 병원균에 대한 방어반응에서의 *OsWRKY45*의 역할은 이미 논의되었다. *OsWRKY125*는 NB-ARC 도메인을 함유하는데, 이것은 병원균 침입의 인식

에 중요하고, 징크 핑거 모티프를 지니는데, 이것은 방어 유전자의 전사적 조절에서 기능을 한다. 이러한 결과들은 WRKY들이 도열병균에 대한 벼 방어반응에서 핵심적 기능을 할 것이라는 것을 제안한다.

표 6

[0092] 본 발명에서 규명된 *OsWRKY67*-유도 WRKY 유전자의 마이크로어레이 데이터의 요약

MSU_ID	Annotation	Fold Change(<i>OsWRKY67</i> -D/Dongjin)	P.Value
LOC_Os06g44010	OsWRKY28	-2.88	0.026
LOC_Os03g21710	OsWRKY45	-3.16	0.012
LOC_Os09g25060	OsWRKY76	-3.23	0.010
LOC_Os09g25070	OsWRKY62	-3.44	0.003
LOC_Os11g45750	OsWRKY125	-5.85	0.000

[0093] 실시예 9. RT-PCR에 의한 *WRKY67* 돌연변이에서의 *OsWIR1* 유전자의 과발현 확인

[0094] 상기 마이크로어레이 실험으로부터, NB-LRR 형태의 6개 R 유전자들의 발현이 야생형 동진에서보다 *OsWRKY67* 활성화 돌연변이에서 현저히 증가됨을 보여주었고(표 2), RT-PCR 분석을 통해 해당 R 유전자의 특이적 발현 패턴을 조사하였다(도 11). 도 11에서 보이는 바와 같이, *LOC_Os11g39310*, *LOC_Os11g39190*, *LOC_Os11g38480*, *LOC_Os11g42040*의 기본적 발현이 현저하게 상승하였고, *LOC_Os11g39320*의 수준은 병원균 접종 전에 *OsWRKY67-D* 돌연변이체에서만 조금 상승했던 반면에, 야생형에서는 유도될 수 없었다. *LOC_Os11g38000* 유전자의 발현 차이는 야생형과 *OsWRKY67-D* 돌연변이체 사이에 관찰되지 않았다. 상기 결과는 *OsWRKY-67* 활성화 돌연변이체가 NB-ARC 및 NB-LRR 유전자의 발현 수준에 지속적으로 영향이 있음을 나타내었다.

[0095] 상기 R 유전자들 중 *OsWIR1* 유전자(*LOC_Os11g38480*)를 선별하여 기능적으로 분석하였다. TIGR 벼 게놈 Annotation 데이터베이스(http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/sequence_display.cgi?orf=LOC_Os11g38480.1)에 의해 추정된 948 bp cDNA 클론이 정방향 프라이머(5'-GGATCCATGTTACTGCTCAAGTAT-3'(서열번호 58)) 및 역방향 프라이머(5'-TCTAGAATGGTTCATTACATTAA-3'(서열번호 59))를 이용한 PCR에 의해 *OsWIR1* 유전자 cDNA로부터 분리하였다. 이어진 서열 분석으로부터, *OsWIR1* 유전자가 NB-LRR 영역을 코딩한다는 것을 밝혀냈다. Pb1은 CC-NB-LRR 단백질을 코딩하는 유전자로서 세포 내 핵에서 *OsWRKY45*와의 상호 작용을 통해 넓은 범위의 벼 도열병균에 대한 내성을 부여하였다(Inoue 등, 2013, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 113(23):9577-9582). 이러한 연구 결과는 마이크로어레이를 통해 선별된 표적 NB-LRR 유전자들의 발현 증가가 병 저항성과 밀접한 관련이 있음을 시사한다.

[0096] 실시예 10. *OsWIR1* 활성화 돌연변이의 분리

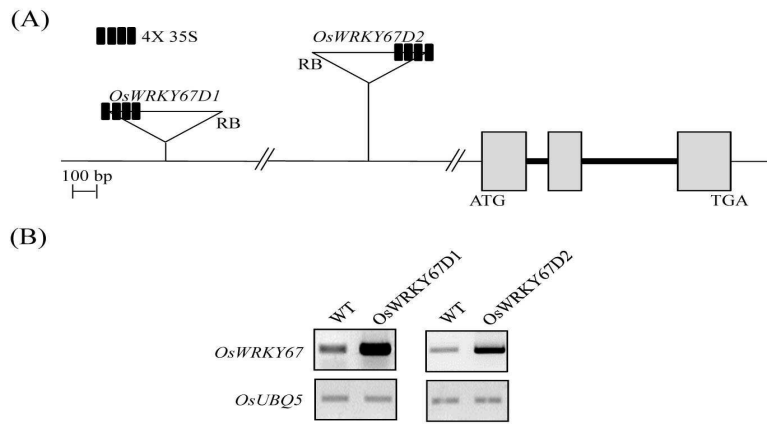
[0097] 벼 T-DNA 돌연변이 집단에서 *OsWRKY67*에 의해 매개되는 표적 NB-LRR 유전자인 *OsWIR1* 유전자의 발현이 증가된 활성화 돌연변이를 분리했다. 분리된 대립유전자인 *OsWIR1-D*(*D*는 *dominant*를 의미)는 *OsWIR1* 유전자의 번역 종결 코돈으로부터 약 0.9 kb 다운스트림에 T-DNA 삽입을 포함한 것이다(도 12A). *OsWIR1* 유전자 특이적 프라이머(서열번호 41 및 42; 표 1 참조) 및 T-DNA 특이적 프라이머(서열번호 57; 표 1 참조)를 사용하여 이들의 자손에서 동형 접합체성 돌연변이를 분리하였고 *OsWIR1* 전사체의 획득은 서열번호 51 및 52를 사용한 RT-PCR 분석에 의해 확인되었다(도 12B).

[0098] 실시예 11. *OsWIR1* 활성화 돌연변이 식물체의 분석

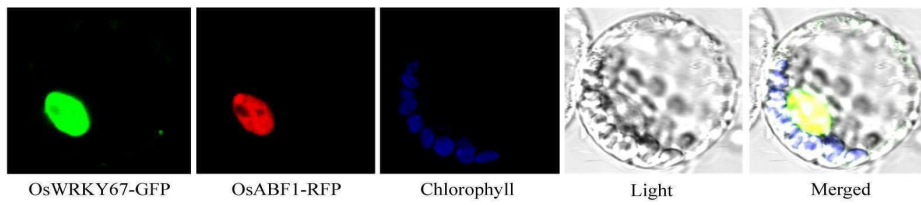
[0099] 분리한 *OsWRKY67*-매개 NB-LRR 유전자의 활성화 돌연변이에 야생형 동진벼에 대한 이병성 도열병균 분리주인 각기 다른 대표적인 두 개의 균주(P06-6 및 KI-215)로 접종실험을 수행하였다. 그 결과 *OsWIR1-D* 활성화 돌연변이 라인에서 두 가지 균주에 대하여 현저히 증가된 병 저항성을 나타낸 반면, 야생형 식물체는 감수성 표현형을 나타낸다는 것을 밝혔다(도 13). 상기 결과들은 *OsWRKY67* 매개 NB-LRR 번역 센서인 *OsWIR1* 유전자가 광범위 벼 도열병균 분리주에 증가된 저항성을 보이는 것을 의미한다.

도면

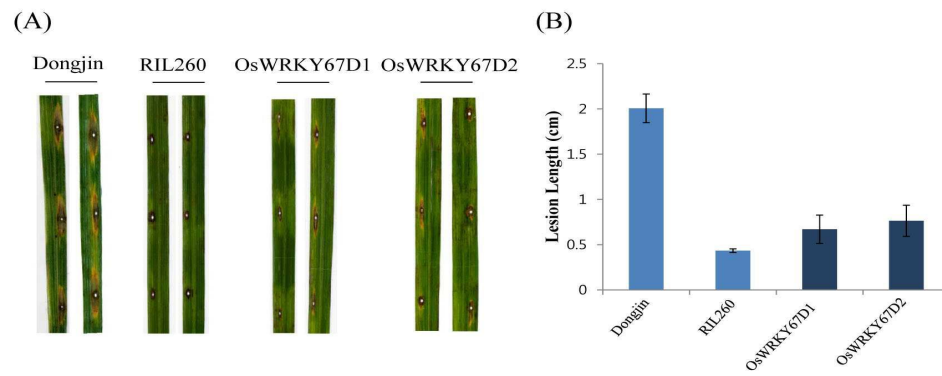
도면1



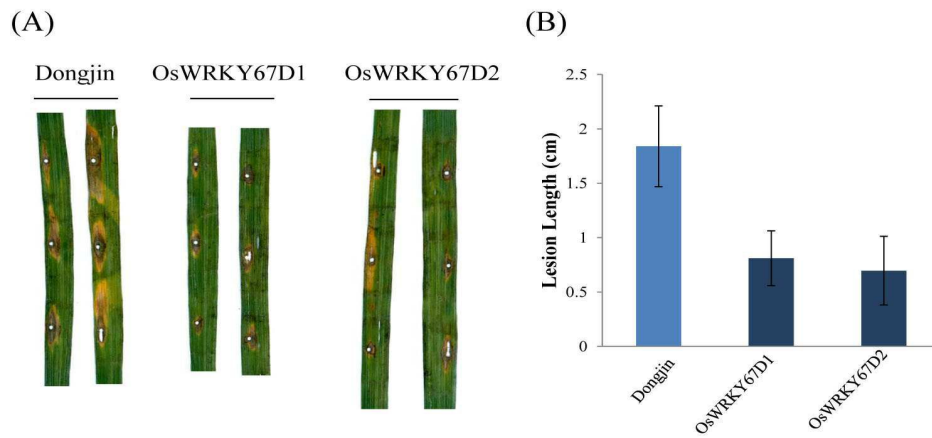
도면2



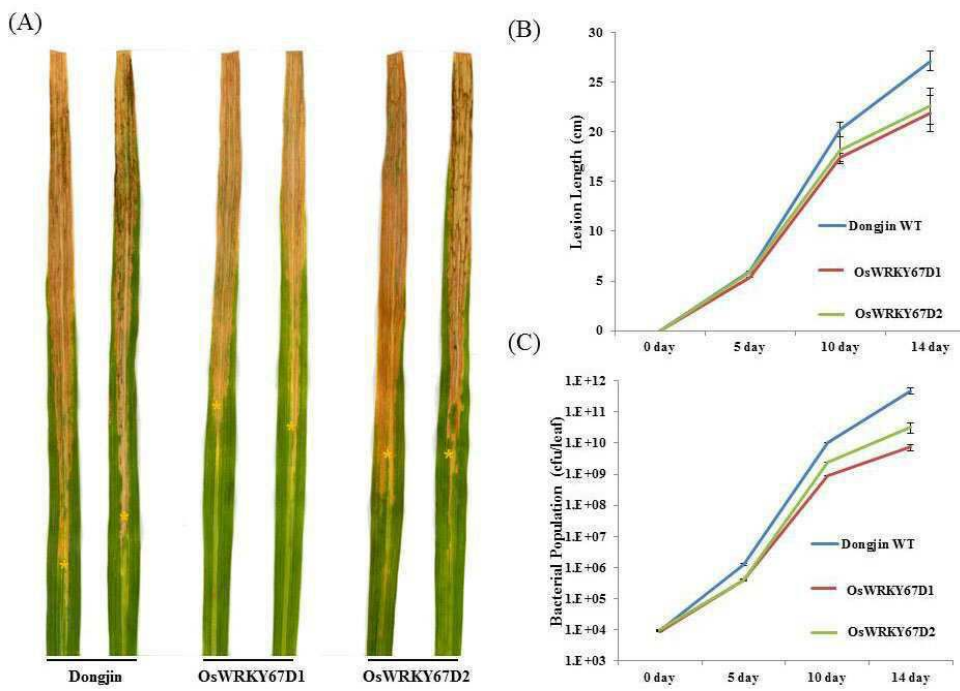
도면3



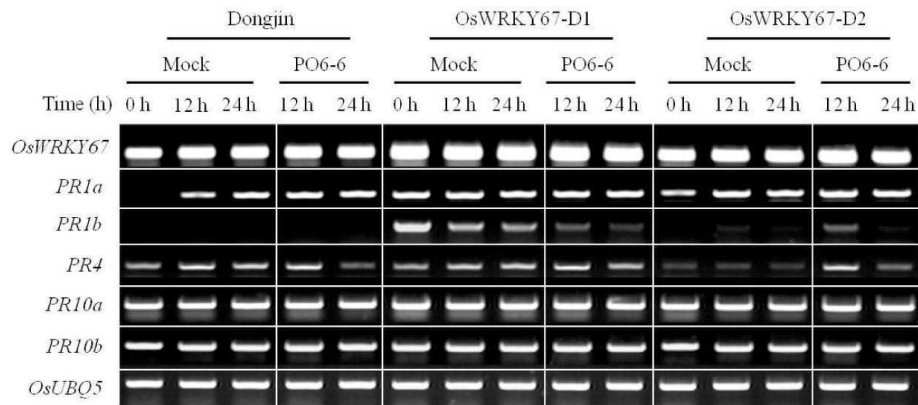
도면4



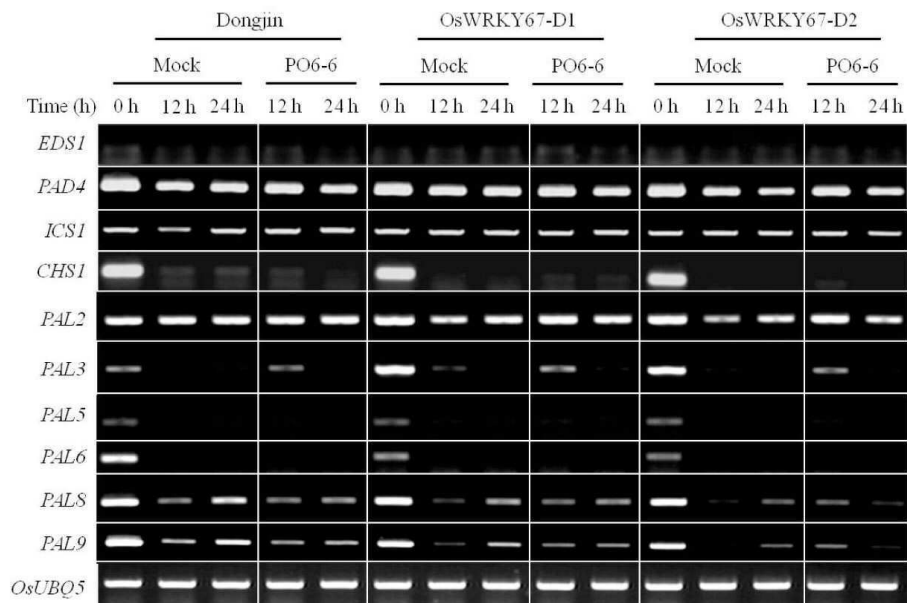
도면5



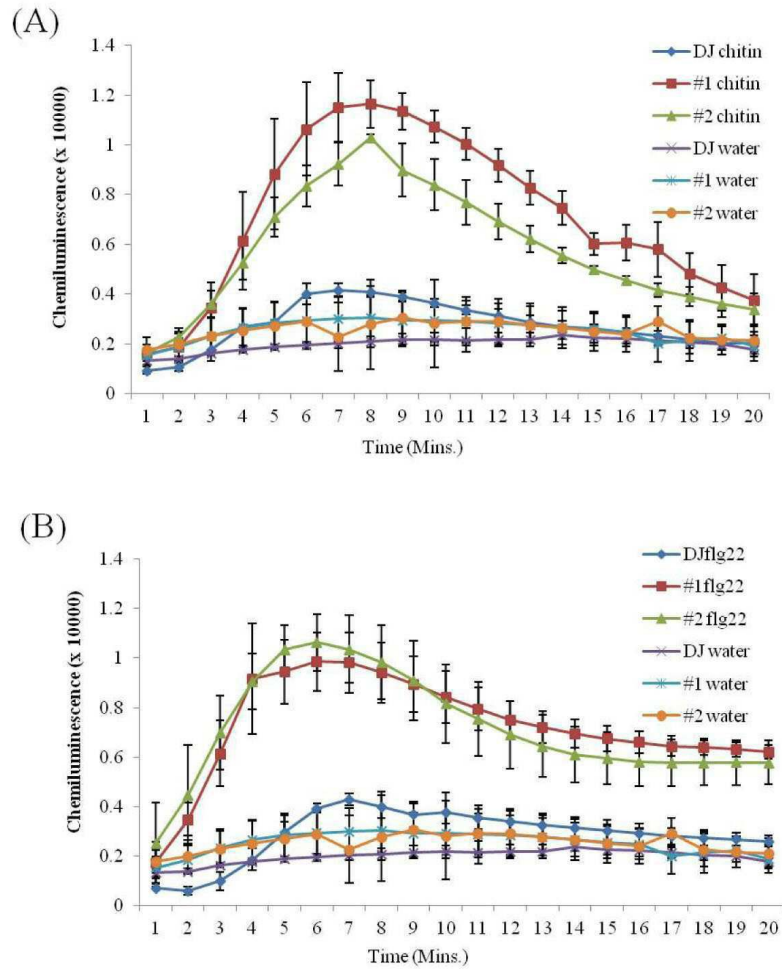
도면6



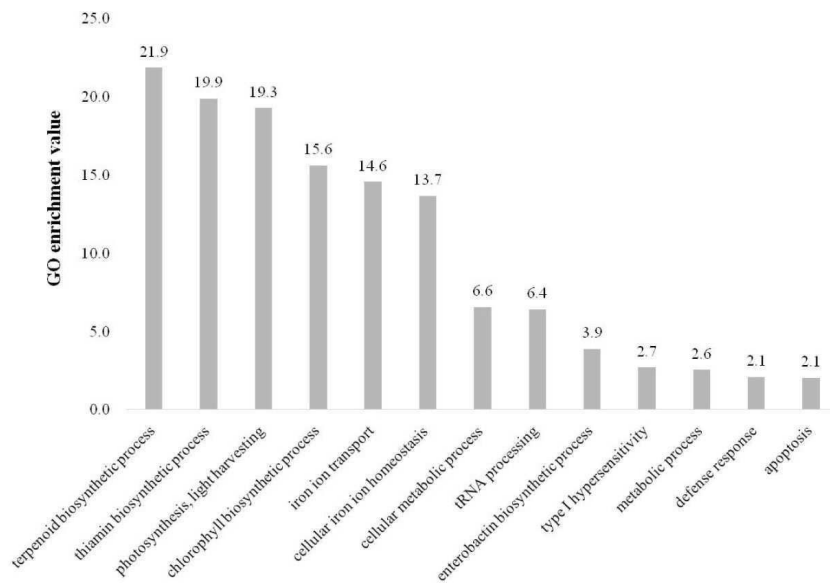
도면7



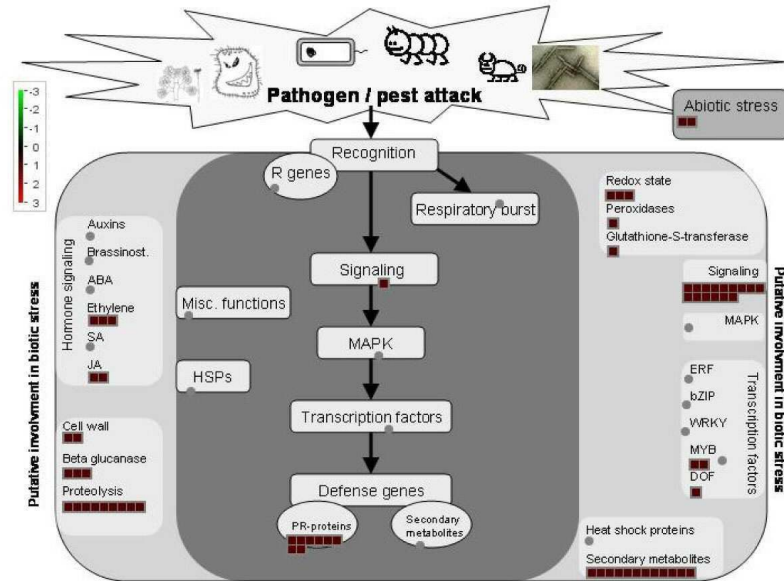
도면8



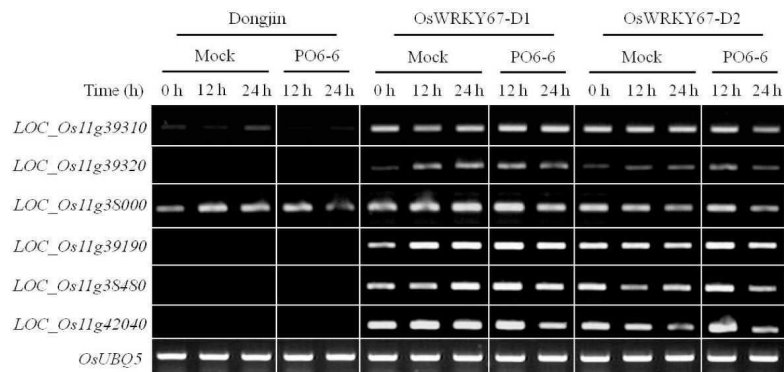
도면9



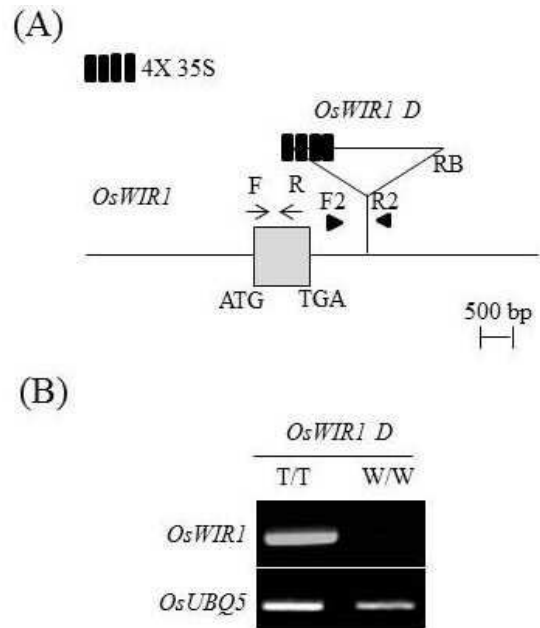
도면10



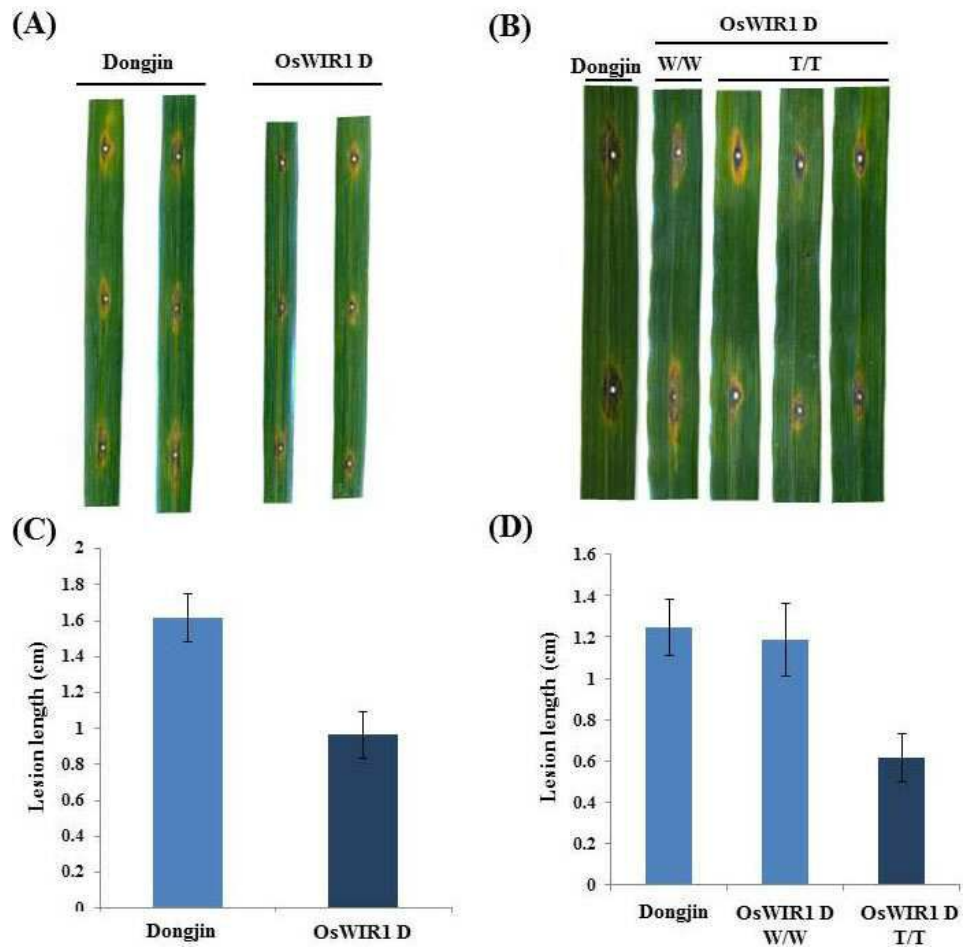
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Method for increasing plant disease resistance using
OsWRKY67-inducible resistance gene1 from Oryza sativa and the
plant thereof
- <130> PN14056
- <160> 59
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 948
- <212> DNA
- <213> Oryza sativa
- <400> 1

atgttactgc tcaagtatct gagcctaaag aaaacagaaa ttaccaact gcccagtga 60

atcaactgcc tccgtgagct agaggatatg gatatccgag aaactaaggt gcctgcaaat 120

gcaacgggta atgttctgct cttgaagcta aagcgtctac ttgctggta cattgattca 180

agtccaagaa attctggcac tagcgttcag attcctcaca ggatagacaa gatggtaaac 240

atagaggtag tatctaagt caaggcccaa cgccgtgatg atttgaaga tactggaaag 300

ctatggcagc taaggaagct aggtgtggtt gttgatgata agagaggtag ccttgggaat 360

ttgcttaaag caatcagcaa cctacatgag tgcattcgtt ctctgacaat cactatttcc 420

acaaccacac acaaggatag tccttcaaac ccagagttac cagatcatat tggctctgac 480

cttccccatc ccaagaaact tgagagtcta agcatcagtg gagccaggca tctttttcca 540

ttgttgatca aaagtataa taacaagctt gccaaagtaa ctctaagtag cacaccactg 600

aaccaagatg atctggaggt cctcgccaag ctaccaagt tacagtgtgt taggtccaa 660

cacatttcat gcatagttag tgagctcatc ttcaaggaag aaaatttcaa atgtctcaag 720

tacctactta ttgagggtt taacttgact aatatcactt ttgaggatgg atcagcctgt 780

gagctcgaga aaatgggttt atcttccacc agcatagagt ctgtctctgg agttgatgtg 840

cttccgaat tcaagagct tgagttgaac aacagccatg tcccgaatga gttgaaagaa 900

gccgttgaaa acaataaaag gataattctt aaatgtaatg aaccatga 948

<210> 2

<211> 315

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Leu Leu Leu Lys Tyr Leu Ser Leu Lys Lys Thr Glu Ile Thr Gln

1 5 10 15

Leu Pro Ser Glu Ile Asn Cys Leu Arg Glu Leu Glu Val Leu Asp Ile

20 25 30

Arg Glu Thr Lys Val Pro Ala Asn Ala Thr Val Asn Val Leu Leu Leu

35 40 45

Lys Leu Lys Arg Leu Leu Ala Gly His Ile Asp Ser Ser Pro Arg Asn

50 55 60

Ser Gly Thr Ser Val Gln Ile Pro His Arg Ile Asp Lys Met Val Asn

65 70 75 80

Ile Glu Val Leu Ser Asn Val Lys Ala Gln Arg Arg Asp Asp Leu Glu

85 90 95

Asp Thr Gly Lys Leu Trp Gln Leu Arg Lys Leu Gly Val Val Val Asp

100 105 110

Asp Lys Arg Gly His Leu Gly Asn Leu Leu Lys Ala Ile Ser Asn Leu

115 120 125

His Glu Cys Ile Arg Ser Leu Thr Ile Thr Ile Ser Thr Thr Thr His

130 135 140

Lys Asp Thr Pro Ser Asn Pro Glu Leu Pro Asp His Ile Gly Ser Asp

145 150 155 160

Leu Pro His Pro Lys Lys Leu Glu Ser Leu Ser Ile Ser Gly Ala Arg

165 170 175

His Leu Phe Pro Leu Leu Ile Lys Ser Asp Asn Asn Lys Leu Ala Lys

180 185 190

Val Thr Leu Ser Ser Thr Pro Leu Asn Gln Asp Asp Leu Glu Val Leu

195 200 205

Ala Lys Leu Pro Lys Leu Gln Cys Val Arg Leu Gln His Ile Ser Cys

210 215 220

Ile Val Ser Glu Leu Ile Phe Lys Glu Glu Asn Phe Lys Cys Leu Lys

225 230 235 240

Tyr Leu Leu Ile Glu Gly Phe Asn Leu Thr Asn Ile Thr Phe Glu Asp
245 250 255

Gly Ser Ala Cys Glu Leu Glu Lys Met Val Leu Ser Ser Thr Ser Ile
260 265 270

Glu Ser Val Ser Gly Val Asp Val Leu Pro Lys Phe Lys Glu Leu Glu
275 280 285

Leu Asn Asn Ser His Val Pro Asn Glu Leu Lys Glu Ala Val Glu Asn
290 295 300

Asn Lys Arg Ile Ile Leu Lys Cys Asn Glu Pro
305 310 315

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

caccatgagg tacgagagcg aggagaa

27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gaagagcagc gagccgcctg ccgaata

27

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ctcatagcat ttgaccttca cttcctcta

29

<210> 6

<211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 tctttttgtg tttcttgctc tagtccttg 29

<210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 aaatttcct acatcggcta agagtacaa 29

<210> 8
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 tgctatcaaa ttatccctca agaactgaa 29

<210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 cttcagcaac tctactcct act 23

<210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 tctcgtaact catcatagtg ttt 23

<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
	ttatcctgct gcttgctggt	20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
	ggtcgtacca ctgcttctcc	20
<210>	13	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	
	gattaactat ggaggtatcc aagc	24
<210>	14	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	14	
	acgtacgccc gtgtgtataa ataa	24
<210>	15	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	15	

caaactacct cattctccat cag

23

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

tccagtatat gatcatgcaa agag

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

accatctaca ccatgaagct taac

24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

gtattcctct tcattcttagg cgta

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

ggcaccatcc acatcatgaa gctt

24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	primer	
<400>	20	
cacgccacag taacatgacc acaa		24
<210>	21	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	21	
tcagttggat cccagcaa		19
<210>	22	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	22	
tccaagtaa tccacgcaa c		21
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	23	
gccagctccc ctacgacttc		20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	24	
cgtgtgcggt gtaggttggt		20
<210>	25	
<211>	21	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	25	
	tatggtgcta tccgcttcga t	21
<210>	26	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	26	
	cgagaaccga gctctcttca a	21
<210>	27	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	27	
	ccggcgaact gcgtgtac	18
<210>	28	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	28	
	ttctgatct gcgacttgtc a	21
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	29	
	gtcatgaaca gcatgatgaa	20
<210>	30	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 30
 cattgagcag cttggtgatg 20

<210> 31
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 31
 cagctgtgga gaacggca 18

<210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 32
 gtgtacattg aagaatcctt 20

<210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 33
 tccaagttga gctgctcag 19

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 34

gtccaccttc ttgccatcga	20
<210> 35	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 35	
gtcatgaaca gcatgatga	19
<210> 36	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 36	
ctggagcaga gtgttgatg	19
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 37	
tgaatggcac cgacacgtac	20
<210> 38	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 38	
gttgagcagc ttggcgatg	19
<210> 39	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400>	39	
gtcttcgaca gcaccatga		19
<210>	40	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	40	
tggcctcgaa gagcacgatc		20
<210>	41	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	41	
tgattgttca agccggagca agtccttag		29
<210>	42	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	42	
acagccattg atgcaaggta attgccact		29
<210>	43	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	43	
ggcacatgga taagacatct tccag		25
<210>	44	
<211>	24	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 44
 agctccagca gcaccaacaa taag 24
 <210> 45
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 15
 <400> 45
 agaggatgaa gttgtcgcat gtcc 24

 <210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 46
 ctctccactg atgcaggcaa gttt 24
 <210> 47
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 47
 tttattctca caagttcggc agca 24
 <210> 48
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 48
 cggttatcaa cacagcacct ctga 24

 <210> 49

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 49
 aaggctggga gaatttgaag gatg 24
 <210> 50
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 50
 ctggcatgtg ctttatttgt gtgc 24
 <210> 51
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 51
 aacgccgtga tgatttgaa gata 24

 <210> 52
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 52
 ctcaagtttc ttgggatggg gaag 24
 <210> 53
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 53
 aagtccttac cggcatcact gaca 24

<210> 54
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 54
 ctgaggtcca aagtttgcag gttg 24

<210> 55
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 55
 ggaactggta tggtaaggc 20

<210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 56
 agtctcatgg ataccgcag 20

<210> 57
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 57
 atccagactg aatgccaca gg 22

<210> 58
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400> 58

ggatccatgt tactgtcaa gtat

24

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 59

tctagaatgg ttcattacat ttaa

24