



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0025842

(43) 공개일자 2007년03월08일

(21) 출원번호 10-2005-0082412

(22) 출원일자 2005년09월05일

심사청구일자 2005년09월05일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 백경희
서울 강남구 대치동 66 쌍용아파트 3-1411
박창진
서울 동대문구 제기1동 한신아파트 103-1504
신운철
서울 양천구 신정5동 894-23호
이부자
대구 달서구 월성동 영남아파트 101-1201
김기정
경북 안동시 서부동 77-3번지

(74) 대리인 이원희

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 담배 모자이크 바이러스 및 고추 더듬이병균에 대한 과민성반응에서 그 발현이 증가되는 고추 유래 WRKY 전사인자 유전자

(57) 요약

본 발명은 담배 모자이크 바이러스(*Tobacco mosaic virus*) 및 고추 더듬이병균(*Xanthomonas campestris*)에 대한 과민성 반응에서 그 발현이 증가되는 고추 유래 전사인자 유전자 *CaWRKY-a*에 관한 것이다. *CaWRKY-a* 단백질은 2개의 WRKY 도메인과 2개의 C₂H₂ type zinc finger 모티프를 포함하며, 바이러스 또는 박테리아 병원균의 침입, 화학 물질 및 상처를 가했을 때 발현이 유도되는 전사인자로서 *CaWRKY-a* 과발현 유전자 도입 식물을 통해 식물체의 방어 반응 메커니즘을 연구하는데 유용하게 사용될 수 있으며, *CaWRKY-a* 유전자 및 단백질은 과민성 반응과 관련된 식물의 질환을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1a

특허청구의 범위

청구항 1.

식물체 스트레스 저항성 유도 전사인자를 코딩하는 하기 (a) 내지 (c) 중의 어느 하나의 DNA.

(a) 서열번호 10으로 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 코딩하는 DNA;

(b) 서열번호 9로 기재된 DNA;

(c) 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열에서 하나 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 코딩하는 DNA.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 DNA는 고추 식물체로부터 유래된 것을 특징으로 하는 DNA.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 스트레스는 바이러스성, 세균성 병원균 또는 비생물적 스트레스인 것을 특징으로 하는 DNA.

청구항 4.

제 1항의 DNA에 의해 인코드 되는 식물체 스트레스 저항성 유도 전사 인자.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 상기 전사인자는 표적 유전자의 W-box 프로모터와 결합함을 특징으로 하는 전사인자.

청구항 6.

제 1항의 유전자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 발현 벡터가 도입된 형질전환 식물체 세포.

청구항 8.

제 7항에 있어서, 형질전환된 식물세포를 포함하는 형질전환 식물체.

청구항 9.

i) 제 1항의 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;

ii) 상기 발현 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 단계;

iii) 상기 아그로박테리움과 식물 세포를 공동 배양하여 식물 세포를 형질전환시키는 단계; 및

iv) 상기 형질전환된 식물세포를 조직 배양하여 재분화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 병저항성이 유도된 형질 전환 식물체의 제조 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

식물은 여러 가지 방어 기전을 활성화하여 스스로를 병원균의 공격으로부터 방어한다. 과민성 반응(hypersensitive reaction: HR)은 가장 효율적이고 즉각적인 저항 반응인데, 이 반응은 병원균이 침투된 부위에서 세포들이 부분적으로 신속하게 사멸되는 것으로 특징화된다(Lamb et al., *Cell*, 1989; Dangl et al., *Plant Cell*, 1996). 이러한 신속한 세포 반응은 무독화된(avirulent) 병원균의 인식 및 고도로 조절된 신호 전달 경로의 활성화에 의해 유발된다(Martin, *Curr. Opin. Plant Biol*, 1999; Ellis, *Curr. Opin. Plant Biol*, 2000).

고추에 감염되어 피해를 입히는 바이러스로는 오이 모자이크 바이러스(CMV), 감자 바이러스X(PVX) 및 담배 모자이크 바이러스(*Tobacco mosaic virus*: 이하 "TMV"라 칭함)등이 있는데, 이중 TMV는 막대형으로 크기는 300×18 nm 이다. 상기 바이러스는 종자전염 또는 접촉전염으로 전염되고 자연 감염 숙주가 전염원으로 항상 주위에 있어서 발병이 잘된다. TMV에 감염된 고추는 모자이크 현상이 나타나며 새로 나온 잎이 황색으로 되는 때도 있으나 일반적으로 생육이 왕성한 여름에는 병징이 잘 나타나지 않고 줄기, 잎자루, 잎 등에 갈색 반점이 나타나기도 하며 심하면 잎과 꽃눈이 떨어지고 잔가지가 고사한다.

최근 고추에서 발생이 증가하는 반점 더듬이병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: 이하 "Xcv"라 칭함)은 종자나 토양을 통해서 감염된다. 상기 병원균은 기온이 20-28℃ 일 때 생육이 증가한다. Xcv는 잎, 줄기, 과경, 잎자루에 발생하는데 아랫잎에서부터 발생한다. 처음에는 잎뒷면에 원형 또는 부전원형의 작은 반점이 생기고 중심부에는 회색의 반점이 생기고, 발생한 잎은 기형이 된다. 주로 고온다습한 시기에 발생하여 황화해서 조기낙엽을 가져온다.

병원균에 감염된 동안 식물체에 축적되는 살리실산(Salicylic acid : 이하 "SA" 라 칭함), 에틸렌(ethylene) 및 자스몬산(jasmonic acid) 등과 같은 식물 신호물질(signal)은 방어 반응 경로의 중요 성분으로 알려져 있다(Dong, *Curr. Opin. Plant Biol*, 1998; Dempsey, *Crit. Rev. Plant Sci*, 1999; Reymond and Farmer, *Curr. Opin. Plant Biol*, 1998; Pieterse and van Loon, *Trends Plant Sci*, 1999; Penninckx et al., *Plant Cell*, 1998). 다수의 병원성 관련(pathogenesis-related: 이하 "PR" 이라 칭함) 유전자들도 병원균 감염 결과 식물체 내에서 증가하는 하나 또는 복수의 상기 신호전달 분자들에 의해 조절된다(Malamy et al., *Science*, 1990; Thomma et al., *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1998). 많은 보고에 의하면, 유전적, 생화학적 다양한 현상이 서로 다른 경로들-상호 길항적 반응의 협동적 조절이 가능할 수 있는 경로들-사이의 커뮤니케이션을 위해 존재하는 것으로 알려졌다(Maleck and Dietrich, *Trends Plant Sci*, 1999; Feys and Parker, *Trends Genet*, 2000).

식물 방어 반응의 일반적인 특징은 병원균 감염 또는 병원균 유도제 처리시 다수의 유전자 전사가 활성화되는 것이다(Rushton and Somssich, *Curr. Opin. Plant Biol*, 1998; Yang et al., *Genes Dev*, 1997). 병원균에 의해 발현 유도되는 유전자 중 일부는 직접 항균성 활성을 가지는 단백질 또는 항균성 화합물 생합성에 관여하는 효소를 암호화한다. 병원균에 의해 발현이 유도되는 다른 유전자들은 식물 방어 반응의 신호 전달 경로를 조절하는 단백질을 암호화한다.

특별한 전사인자들의 발현 변화는 스트레스 상황에 있는 식물에 많은 영향을 주게 된다. 최근 연구에서 식물 방어 반응에 관여하는 전사인자들 중에 식물에서 흔히 나타나는 WRKY 도메인을 포함하는 DNA 결합 단백질이 동정되었다(Eulgem et al., *Trends Plant Sci*, 2000). WRKY 도메인은 Cys2His2 또는 Cys2HisCys zinc-binding 모티브의 보존 WRKYGQK 서열을 포함한다. 애기장대(*Arabidopsis*)에는 75개 이상의 WRKY 유전자군이 존재하는 것으로 밝혀졌다

(Eulgem et al., *Trends Plant Sci*, 2000). WRKY 단백질은 DNA-결합능(binding ability)에 더하여 핵내 분포(nuclear localization)하여 전사를 활성화시키는 전사인자의 특징을 가지고 있다(Hara et al., *Mol Gen Genet*, 2000). 여러 연구들은 WRKY 단백질이 병원균 감염에 대한 식물 방어 반응의 조절 기능을 가지고 있음을 보여준다. 첫 번째로 병원균 감염, 병원균 유도제 또는 SA의 처리가 여러 식물에서 몇몇 WRKY 유전자의 발현을 빠르게 유도함을 보여준다(Chen and Chen, *Plant Mol Biol*, 2000; Dellagi et al., *Mol Plant Microbe Interact*, 2000; Eulgem et al., *Embo J*, 1999; Hara et al., *Mol Gen Genet*, 2000; Kim et al., *Mol Plant Microbe Interact*, 2000; Rushton et al., *EMBO J*, 1996). 두 번째로 PR 유전자를 포함하는 다수의 방어 연관 유전자들은 프로모터 구역에 W-box 요소를 포함하고 있는데, W-box 서열은 WRKY 단백질에 의해 특이적으로 인지되며, 이는 유전자의 발현 유도에 필수적이다(Du and Chen, *Plant J*, 2000; Eulgem et al., *EMBO J*, 1999; Rushton et al., *EMBO J*, 1996).

지난 10년 동안 WRKY 단백질에 대한 연구는 크게 증가했으나 기존 연구의 대부분은 애기장대(*Arabidopsis*), 쌀, 파슬리 또는 담배를 포함하는 몇몇 식물에 한정되어 있었다(Chen and Chen, *Plant Mol Biol*, 2000; Eulgem et al., *Trends Plant Sci*, 2000; Rushton et al., *Embo J*, 1996; Zhang et al., *Plant Physiol*, 2004).

이에 본 발명자들은 고추에서 최초로 분리된 WRKY 전사인자 유전자(이하 "*CaWRKY-a*" 라 칭함)가 *C. annuum* cv. Bugang과 TMV-Po 사이의 과민성 반응시 특이적으로 발현이 유도됨을 확인하였고, 상기 전사인자가 생물 또는 비생물적 유도제 및 상처를 포함하는 다양한 스트레스에 반응함을 확인하여, 상기 단백질이 식물의 방어 연관 신호 경로에서 전사인자로 기능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 주된 목적은 고추에서 유래한 것으로 식물체 병저항성을 유도하는 전사인자를 암호화하는 DNA 및 단백질을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고추 유래의 식물체 스트레스 저항성 유도 전사인자를 암호화하는 DNA를 제공한다.

또한 상기 DNA에 의해 암호화되는 식물체 스트레스 저항성 유도 전사인자 단백질을 제공한다.

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

본 발명은 서열번호 9로 기재되는 *CaWRKY-a* 유전자, 그 상동형 유전자(homologs) 및 그 변이형 유전자(variants)를 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 10으로 기재되는 *CaWRKY-a* 단백질 또는 변이형 단백질(variants)을 제공한다. 상기 *CaWRKY-a* 유전자의 "상동형 유전자(homologs)"는 서열번호 10으로 기재되는 *CaWRKY-a* 단백질에 대한 코딩 서열을 포함하는 유전자를 뜻한다. 따라서, 상동 상동형 유전자의 범주에는 발현시 서열번호 10으로 기재되는 *CaWRKY-a* 단백질을 생산할 수 있는 모든 종류의 유전자가 포함된다. 상기 *CaWRKY-a* 단백질의 "변이형 단백질(variants)"은 서열번호 10으로 기재되는 *CaWRKY-a* 단백질 중 하나 이상의 아미노산 잔기를 결실, 부가, 삽입 또는 치환시킨 단백질을 의미하며, 상기 *CaWRKY-a* 유전자의 "변이형 유전자(variants)"는 *CaWRKY-a* 단백질의 변이형 단백질을 코딩하는 모든 유전자를 의미한다. 상기 *CaWRKY-a* 단백질의 유전자는 서열 번호 9의 염기서열을 가지는 것이 바람직하며, 상기 단백질은 서열번호 10의 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하다.

고추 cDNA 라이브러리(Park et al., *Plant Mol Biol*, 2002)에서 WRKY 도메인의 보존서열로부터 디자인한 서열번호 1 및 2로 기재되는 축중 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction)을 통해 cDNA 부분 단편(partial cDNA)을 증폭하고, 상기 cDNA를 pGEN-T 벡터에 삽입한 후 서열을 결정하였다. 전체 길이 *CaWRKY-a* cDNA는 서열 번호 11 및 12로 기재되는 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 증폭하였다. 서열 결정 결과 전체 cDNA 서열은 서열번호 9번으로 기재되는 1,997 bp이었으며, *CaWRKY-a*로 명명되었다. 상기 *CaWRKY-a* 유전자는 서열번호 10으로 기재되는 *CaWRKY-a* 단백질을 코딩하는 것을 확인하였다(도 1A 참조). *CaWRKY-a* 단백질은 2개의 WRKY 도메인과 2개의 C₂H₂ type zinc finger 모티프를 포함한다. *CaWRKY-a* 단백질의 분자량은 60.55 kDa이며, 등전점은 7.81이다. 아미노산 서열은 여러 식물에서 유래한 WRKY와 높은 상동성이 관찰되었다(도 1B 참조). 기존 연구에서 WRKY는 병원균 감염에 대한 식물 방어 기능의 조절 기능을 가지고 있음을 보여준다(Chen and Chen, *Plant Mol Biol*, 2000; Dellagi et

al., *Mol Plant Microbe Interact*, 2000; Eulgem et al., *Trends Plant Sci*, 2000; Kim et al., *Mol Plant Microbe Interact*, 2000; Rushton et al., *EMBO J*, 1996; Du and Chen, *Plant J*, 2000). 이를 통해 CaWRKY-a가 식물체의 스트레스 저항성 유도 전사인자로서 작용할 것임을 추정할 수 있다.

*CaWRKY-a*의 지놈 조직(genomic organization)을 조사하기 위하여 *Capsicum annuum* cv. Bugang에서 제노믹 DNA를 분리하여 제한효소 *EcoRI* (E), *HindIII* (H), 및 *Xba I* (X)으로 절단하여 서던 블롯을 수행하였다. 그 결과 *CaWRKY-a* cDNA탐침과 하이브리드를 이루는 하나 또는 두 개의 밴드가 탐지되었다(도 2 참조). 이를 통해 *CaWRKY-a*가 고추 지놈에서 하나 또는 두 개의 카피로 존재함을 알 수 있다.

*CaWRKY-a*의 병저항성 관련 여부를 조사하기 위해 다양한 종류의 생물 또는 비생물 스트레스에 대한 상기 유전자의 발현 양상을 측정하였다.

우선적으로 바이러스 또는 박테리아 침입에 의한 과민성 반응시 고추에서의 *CaWRKY-a*의 발현 유도를 조사하였다. 본 발명을 위해 TMV의 P₀에 저항성이며, TMV P_{1,2}에 감수성인 고추, *Capsicum annuum* L cv. Bugang을 사용하였다. 고추에 TMV-P₀ 및 TMV-P_{1,2}를 접종한 후 *CaWRKY-a*의 3'-UTR을 탐침으로 사용하여 노던 블롯을 수행했을 때, *CaWRKY-a* 발현은 TMV-P_{1,2} 접종 및 모조 접종의 모든 시간대에서 탐지되지 않았다. 대조적으로 같은 조건에서 TMV-P₀ 접종 후 24시간대부터 *CaWRKY-a* 발현을 측정할 수 있었다(도 3a 참조). 양성 대조군으로, 고추에서 유래한 병원성 연관 단백질(Pathogenesis-related protein :PR) 유전자인 *CaPR-1*의 발현 패턴을 조사하였다(Kim and Hwang, *Physiol Plantarum*, 2000). *CaPR-1* 유전자의 강한 발현 유도는 48시간대에서 관찰되었는데, 이는 TMV 접종에 의한 과민성 반응에서 *CaWRKY-a*의 발현이 양성 대조군인 *CaPR-1*과 같이 유도되며, 양성대조군보다 더 빠른 시간에 발현이 유도됨을 보여준다. 고추 더듬이병균인 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*(이하 "*Xcv*"라 칭함) 접종시 *CaWRKY-a*의 발현을 측정하기 위해, *Capsicum annuum* cv. Early Calwonder(이하 "ECW"라 칭함)와 Early Calwonder-20R(이하 "ECW-20R"이라 칭함)에 각각 접종하고 RNA를 분리하여 노던 블롯을 수행하였다. ECW는 *bs2* 유전자를 포함하며, ECW와 동질유전자계통인 ECW-20R은 *Bs2*의 우성 대립형질을 포함하고 있어 *Xcv*종의 *avrBs2* 병원성 유전자에 대항하는 저항성을 가진다(Tai et al., *T Urol*, 1999). *Xcv*가 저항성 ECW-20R의 잎사귀에 침입하면 24시간 내에 흑자색이 되고 괴사되는 과민성 반응이 유발된다. 그와는 대조적으로, 감수성 재배 식물인 ECW는 *Xcv*를 접종 후 48시간 안에 치명적인 손상을 입으며 백화 현상이 일어난다. 노던 블롯 결과 *CaWRKY-a*가 ECW-20R(저항성) 잎사귀에서 우선적으로 발현되는 것으로 보아, *Xcv* 접종에 대한 과민성 반응이 *CaWRKY-a*의 특이 발현을 유도하는 것으로 보인다(도 3b 참조).

본 발명에서는 다양한 화학물질과 상처에 대한 반응에서 *CaWRKY-a*의 발현 패턴을 측정하였다. 살리실산(Salicylic acid: 이하 "SA"라 칭함), 에틸렌(ethylene: 이하 "ET"라 칭함) 및 자스몬산(jasmonic acid: 이하 "JA"라 칭함)은 병원체 침입 후 병 저항성 신호전달 과정 중 이차 신호전달자로 활동하면서 많은 방어-관련 유전자들의 발현을 유도한다(Chang and Shopkey, *Curr Opin Plant Biol*, 1999; Reymond and Farmer, *Curr Opin Plant Biol*, 1998; Yang et al., *Gene Dev*, 1997). 상기 비생물 유도제를 처리하여 시간대별로 채취하고 RNA를 분리하여 노던 블롯을 수행하였다. 고추에 10 mM SA를 분무했을 때, *CaWRKY-a*와 양성대조군인 *CaPR-1*의 발현이 유도되었으나, *CaWRKY-a*가 *CaPR-1*보다 빠르게 발현이 유도되었다(도 4a-a 참조). ET-유리 화합물 에테폰(ethephon)은 ET를 대신하여 방어 반응의 유도자로서 사용할 수 있다(Menelink et al., *Plant Mol Biol*, 1990). ET의 효과를 조사하기 위해, 고추에 10 mM 에테폰을 처리하고 시간대별로 채취하여 RNA를 분리하고 노던 블롯을 수행하였다. 비교를 위해, 에테폰 처리 후 발현 유도되는 *CaPR-1*을 양성 대조군으로 사용하였다. 그 결과 *CaWRKY-a*는 에테폰 처리 후 빠르게 발현되며 양성 대조군 *CaPR-1*보다 빠르게 발현이 유도됨이 측정되었다(도 4a-b 참조). 메틸 자스몬산(Methyl jasmonic acid: 이하 "MeJA"라 함) 처리 후 *CaWRKY-a* 발현 유도를 측정하기 위해, 100 μ M MeJA를 SA 처리 방법대로 처리하고 RNA를 분리하여 노던 블롯을 수행하였다. MeJA 처리시 발현이 유도되는 *proteinase inhibitor II* (*CaPin II*)를 양성 대조군으로 사용하였다. 그 결과 *CaWRKY-a*가 자스몬산 자극에 의해 발현이 유도됨이 측정되었다(도 4b-c 참조).

자연 상태에서 식물은 염 스트레스에 빈번하게 노출된다. 염 스트레스를 받은 식물체에서 *CaWRKY-a* 발현 유도를 측정하기 위해 400 mM NaCl에서 뿌리째 고추 식물을 처리하였고, 대조군 식물은 상기 고추 식물을 증류수에 처리하였다. 노던 블롯의 양성 대조군으로는 염 스트레스 하에서 발현이 유도되는 *Capsicum annuum* *Cadhn* 유전자를 사용하였다. 그 결과 *CaWRKY-a*가 24시간대 이후에서 강하게 발현 유도가 측정되었다(도 4b-d 참조).

상처를 받은 식물체에서의 *CaWRKY-a* 발현 유도를 측정하기 위해 고추 잎사귀를 가위로 절단하고, 국부 스트레스로 인한 *CaWRKY-a* 발현을 측정하기 위해 절단한 잎사귀에서 RNA를 분리하고, 전신 스트레스로 인한 *CaWRKY-a* 발현을 측정하기 위해 절단한 잎사귀의 상위 잎사귀에서 RNA를 분리하여 노던 블롯을 수행하였다. 양성 대조군으로는 국부 및 전신 상처로 인해 발현이 유도되는 *CaPin II*를 사용하였다. 노던 블롯 결과 국부 상처 스트레스 후 초기 0.5 시간에서 강하게 측

적되는 것으로 보아 상처를 받았을 때에도 *CaWRKY-a*의 발현이 유도됨을 알 수 있다(도 4b-e 참조). 최근 보고에서는 WRKY 전사인자가 상처, 병원균 또는 병원성 저항 유발자에 의한 식물의 빠른 반응과 연관이 있다는 증거를 제공한다(Chen and Chen, *Plant Mol Biol*, 2000; Durrant et al., *Plant Cell*, 2000; Hara et al., *Mol Gen Genet*, 2000; Kim et al., *Mol Plant Microbe Interact*, 2000; Wang et al., *Plant J*, 1998; Yang et al., *Genes Dev*, 1997). WRKY-a 같은 WRKY 전사인자는 W-box 프로모터 요소와 상호결합에 의해 PR1-1 및 PR1-2 같은 아래쪽(downstream) 표적 유전자의 발현을 유도할 수 있을 뿐 아니라, 다른 WRKY 유전자 군내 유전자(family member)의 활성화에 관여하여 유도물질에 대해 빠르게 반응하게 한다(Eulgem et al., *Trends Plant Sci*, 2000).

상기 실시예들의 결과로 보아 *CaWRKY-a*는 다양한 생물 및 비생물 스트레스에 의해 발현이 유도되며, 일부 양성대조군인 방어 관련 유전자보다 빠르게 발현이 유도되며 식물 방어 반응에 중요 요소로 기능함을 알 수 있었다.

*CaWRKY-a*의 세포내 분포(localization)를 확인하기 위하여, *CaWRKY-a* cDNA와 soluble modified green fluorescent protein(smGFP) 유전자를 융합한 플라스미드를 구축(도 5a 참조)하고, 상기 플라스미드를 tobacco bright yellow-2 (BY-2) cell에 주입하여 형광 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 대조군 smGFP는 세포질 안에 분포되어 있는 반면, *CaWRKY-a::smGFP* 융합 단백질은 핵 내에서 분포하는 것이 관찰되었다(도 5b 참조). 상기 결과로 *CaWRKY-a*가 핵 내에서 전사인자로서 기능함을 알 수 있고 핵내 분포 신호(nuclear localization signal) 없이 핵내 표적화가 가능함을 알 수 있다. 파슬리와 담배에서 유래한 WRKY 인자의 핵내 분포(localization)는 증명되었으나(Eulgem et al., *Embo J*, 1999; Hara et al., *Mol Gen Genet*, 2000), 핵내 분포 신호(NLS) 모티브 동정은 파악되지 않았다. NLS 서열은 전형적으로 염기성 아미노산을 포함하나, 실제 서열과 다를 수 있음이 보고되어 있다(Nakielnny and Dreyfuss, *Cell*, 1999). *CaWRKY-a*의 컴퓨터 분석 결과, *CaWRKY-a* 단백질 서열에서 대표적인 NLS를 발견할 수 없었다. tobacco BY-2 cell을 사용한 transient expression 시스템에서 수행된 기존 연구에서 알 수 있듯이(Robatzek and Somssich, *Plant J*, 2001), *CaWRKY-a*의 핵내 분포(localization)는 핵내 표적화를 위해 대표적인 NLS가 항상 필요한 것은 아님을 알 수 있다. *CaWRKY-a*의 NLS에 대한 정보를 알아내기 위해, WoLF PSORT(www.psорт.org)를 포함한 다양한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 *CaWRKY-a*와 일치하는 서열을 조사한 결과, 흥미롭게도 *Solanum chacoense*(GenBank accession number AY366389)에서 유래한 SolWRKY, *Nicotiana tabacum*(GenBank accession number AB063573)에서 유래한 NtWRKY, *Petroselinum crispum*(GenBank accession number AF121353)에서 유래한 NetWRKY 및 AraWRKY33 (GenBank accession number AF509499)과 모두 연관된 NLS 모티브는 탐지되지 않았다. 그러나 WRKY 중 346과 349 (KR-n-K)위치의 염기성 아미노산이 보존됨을 알게 되었다.

PR 유전자를 포함한 다수의 방어 관련 유전자들은 프로모터 구역에 W-box 요소를 포함하고 있는데, 이종의 WRKY 단백질은 W-box 서열을 특이적으로 인지하여 결합하여 방어 유전자의 발현을 유도한다(Du and Chen, *Plant J*, 2000; Eulgem et al., *EMBO J*, 1999; Rushton et al., *EMBO J*, 1996). *CaWRKY-a*가 W-box의 결합능력이 있는지 확인하기 위해 *CaWRKY-a*를 클로닝하여 대장균 BL21(DE3)에서 대량발현하였다. 클로닝한 *CaWRKY-a*를 정제하고 서열번호 7로 기재되는 W1 또는 서열번호 8로 기재되는 W2와 전기영동 이동도 옮김 어세이(Electrophoretic mobility shift assay: 이하 "EMSA"라 칭함)를 수행하였다. W1 서열에는 단일 TGAC 서열을 포함하며, W2 서열은 2개의 TGAC서열이 5개의 핵산을 사이에 두고 포함되어 있다(도 6a 참조). EMSA 결과 *CaWRKY-a*가 W1 및 W2에 효과적으로 결합하며 W1과 W2 사이에 경쟁적 결합 특이성을 보임이 측정되었다(도 6b 참조). 이를 통해 *CaWRKY-a*가 방어 유전자를 발현 유도하는데 필수적인 프로모터에 작용함을 알 수 있다. 이종의 WRKY 경우 zinc-finger 모티브를 포함하고 있으며, 금속 킬레이트제 EDTA를 처리하면 일부 WRKY 단백질 결합이 저해된다(Chen and Chen, *Plant Mol Biol*, 2000; Eulgem et al., *Trends Plant Sci*, 2000). 본 실시예에서 50mM EDTA를 처리했을 때, 재조합 *CaWRKY-a* 단백질 역시 W1 또는 W2 서열과의 결합이 강하게 교란되었다. 이를 통해 *CaWRKY-a*가 다른 종의 WRKY처럼 전사인자로 작용을 알 수 있다.

상기 실시예들의 결과를 종합하여 살펴볼 때 *CaWRKY-a*는 이종의 WRKY이 전사인자로서 가지는 여러 특징들 즉 W-box와의 결합능력을 가지며, 핵내 분포하고 전사를 활성화하는 특징들을 가지고 있으며, 여러 생물 또는 미생물 스트레스에 대항하는 식물의 방어 반응에서 발현이 유도되는 것으로 보아 스트레스 저항성 전사인자로서 작용함을 알 수 있다.

또한 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현벡터, 이를 포함하는 형질전환 식물 세포 및 식물체를 제공한다.

본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다. 본 발명의 발현 벡터에 포함되는 유전자는 *CaWRKY-a*를 코딩하는 염기서열을 포함하며, 바람직하게는 서열번호 9로 기재되는 염기서열을 포함하는 것이다.

상기 유전자를 삽입하기 위하여 사용되는 벡터로는 일반적인 식물 형질전환용 발현 벡터이면 어느 것이든 무방하나, 본 발명에서는 *CaWRKY-a* 유전자를 삽입하기 위한 벡터로 식물 형질전환용 pCAMBIA2300 벡터나 pCAMBIA2300 M2 HA2 벡터 등을 사용할 수 있다.

본 발명은 상기 유전자를 보유하는 형질전환 식물 세포를 제공한다. 본 발명의 벡터가 도입되는 식물 세포는 세포가 식물로 재생될 수 있는 한 특정한 형태로 특별히 제한되는 것은 아니다. 이들 세포는, 예를 들면, 배양된 세포 부유물, 원형질체(protoplast), 잎 절편(leaf section) 및 캘러스(callus)를 포함한다. 발현 벡터는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 방법, 전기천공법(electroporation), 아그로박테리움(Agrobacterium)에 의해 매개되는 전달 및 입자 충격(particle bombardment) 방법과 같은 공지의 방법에 의하여 식물 세포에 도입될 수 있다.

본 발명은 상기 식물세포를 조직배양 방법으로 재분화시켜 제조되는 병저항성이 유도된 형질전환 식물체를 제공한다. 본 발명의 형질전환 식물을 얻기 위하여 수행하는 조직 배양을 통한 재분화는 일반적인 형질전환 식물체 제조 공정을 통해 수행하는 것이 바람직하다.

그러므로 본 발명의 신규한 전사인자 CaWRKY-a는 상기 바이러스 및 박테리아에 대응하는 방어 반응을 가지는 식물 제작에 유용하며, *CaWRKY-a* 과발현 유전자 도입 식물을 통해 식물체의 방어 메커니즘을 연구하는데 유용하게 사용될 수 있고, 본 발명의 *CaWRKY-a* 유전자 또는 단백질은 과민성 반응과 관련된 식물의 질환을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것이 아니다.

<실시예 1> 식물 재배

본 발명에서는 TMV의 병원성생물 Po에 저항성이며, TMV의 병원성생물 P_{1,2}에는 감수성인 고추(*Capsicum annuum* L cv. Bugang)를 식물 재료로 사용하였다. 두 고추 재배종 즉 Early Calwonder(ECW; *bs1/bs1, bs2/bs2, bs3/bs3*)와 Early Calwonder-20R(ECW-20R; *bs1/bs1, Bs2/Bs2, bs3/bs3*)를 바이러스 및 박테리아 접종 또는 화학물질 및 상처 처리에 사용하였다. *Bs* 유전자는 *Xcr*에 의한 박테리아 반점 질병에 저항하는 저항(R) 유전자로 분류된다. 모든 식물은 성장 챔버 또는 온실에서 27℃, 16시간 빛에 노출시키고 8시간 빛으로부터 차단하는 조건에서 재배하였다. 대략 1달된 식물의 건강하고 팽창된 잎사귀를 병원균 접종과 DNA 및 RNA 분리에 사용하였다.

<실시예 2> DNA 분리 및 서열 분석

고추에서 추정 WRKY 전사인자를 분리하기 위해 WRKY 도메인의 보존 서열을 포함하는 서열번호 1 및 2로 기재되는 특정 프라이머를 합성하여 증합효소연쇄반응(이하 "PCR"이라 칭함)에 이용하였다. 추정 WRKY 단백질의 cDNA 부분 단편(partial cDNA)은 박 등의 방법에 의해(Park et al., *Plant Mol Biol*, 2002) 합성된 고추 cDNA 라이브러리를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 증폭하였다. PCR은 94℃에서 15초, 53℃에서 15초, 72℃에서 60초 과정으로 30번 반복하였다. 증폭된 PCR 생산물은 0.8% 아가로스 젤에서 전기영동 한 후 DNA가 들어있는 부분의 젤을 오려내어 65℃에서 녹이고, Gel extraction kit(Genexmed, JKorea)를 이용하여 분리한 후, 분리된 단편을 용출하여 pGEM-T 벡터(Promega, USA)에 삽입한 후 바이오니아사(Bioneer, Korea)에 의뢰하여 서열을 결정하였다. 전체 길이 WRKY cDNA는 서열번호 11 및 12로 기재되는 프라이머를 제작하여 PCR로 증폭하였다. PCR은 94℃에서 15초, 53℃에서 15초, 72℃에서 60초 과정으로 30회 반복하여 수행하였다.

서열 결정 결과 *CaWRKY-a* cDNA의 핵산 서열은 1,997 bp이며, 546 아미노산의 폴리펩티드를 암호화하는 단일 open reading frame(ORF)을 가진다. 서열 분석을 통해서 *CaWRKY-a* 단백질이 다른 종의 WRKY보다 높게 보존된 2개의 WRKY 도메인과 C2H2-type zinc-finger-like 모티프를 포함하고 있음이 밝혀졌다(도 1A 참조). *CaWRKY-a* 단백질의 분자량은 60.55 kDa이며, 등전점은 7.81 이다. *CaWRKY-a*의 아미노산 서열은 여러 식물에서 유래한 WRKY와 높은 상동성을 보인다(도 1B 참조). *CaWRKY-a*의 아미노산 서열은 *Solanum chacoense*(GenBank accession number AY366389)에서 유래한 SolWRKY 및 *Nicotiana tabacum*(GenBank accession number AB063573)에서 유래한 NtWRKY와 각각 89.1% 및 85.1%의 상동성을 보이며, *Petroselinum crispum*(GenBank accession number AF121353)에서 유래한 PetWRKY1과는 49.2%의 상동성이 관찰되었다. 일부 애기장대(*Arabidopsis*) WRKY 중 AraWRKY33(GenBank accession number AF509499)은 *CaWRKY-a*와 같은 2개의 WRKY 도메인을 포함하고 있고, *CaWRKY-a*의 아미노산과 45%의 상동성이 보인다.

본 실시예를 통해 CaWRKY-a가 2개의 WRKY 도메인 및 2개의 C2H2-type zinc-finger 모티프를 포함하며, 이종의 WRKY와 아미노산 서열의 높은 상동성을 갖는 것을 통해, 이종의 WRKY와 유사한 기능을 가진다는 것을 추정할 수 있다.

<실시예 3> CaWRKY-a의 게놈 조직(genomic organization)

고추 게놈 DNA는 *Capsicum annuum* cv. Bygang에서 분리하였고, 제한효소 *EcoRI* (E), *HindIII* (H), 및 *Xba I* (X)으로 절단하였다. 서던 블롯 실험은 전체 길이 CaWRKY-a cDNA 탐침으로 수행하였다. 고추의 게놈 DNA 분리 방법은 다음과 같다. 고추를 갈아낸 다음 게놈 DNA 용출 버퍼(최종 부피는 400ml에 168g Urea, 25ml 5M NaCl, 20ml 1M Tris-HCl pH 8.0, 16ml 0.5M EDTA pH 8.0, 20ml 20% sarcosine, 190ml 증류수)에 담아 녹여낸 후, 원심분리를 수행하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액에 동일 부피의 에탄올을 첨가하여 게놈 DNA 침전물이 생성되면 다시 원심분리하여 증류수에 녹였다. 분리한 게놈 DNA 30μg를 상기 제한효소로 1U으로 37℃에서 16시간 동안 절단한 후 0.8% 아가로스 겔을 제작하여 전기영동을 수행하였다. 이후 막에 이동시키고 323P가 라벨된 dCTP를 이용하여 만들어진 탐침으로 고추 지놈에서 CaWRKY-a 유전자가 몇 카피로 존재하는지 확인하였다. 65℃ 고온조건에서, 모든 제한효소는 CaWRKY-a cDNA 탐침과 하이브리드하는 하나 또는 두 개의 주요 밴드를 형성하였다(도 2 참조). 본 실시예는 3회 반복하였다.

본 실시예의 결과를 통해 CaWRKY-a가 고추 지놈에서 하나 또는 두개의 카피로 존재함을 확인하였다.

<실시예 4> 바이러스 및 병원균 접종에 의한 과민성 반응 시 CaWRKY-a의 발현 조사

1달 된 고추 식물에 Tobacco mosaic virus(TMV) P₀, P_{1,2} 또는 *Xanthomonas campestris*(Xcv) 접종은 박 등의 방법에 따라 수행하였다(Park et al., *Plant J*, 2004). TMV 접종을 위해, 철가루(LeeHyo Bio Science, Korea)를 이용하여 TMV와 함께 붓으로 식물에 발라주면, 철가루에 의해 상처가 난 부분으로 TMV가 침투하는 방식을 택하였다. Xcv의 처리는 Xcv를 28℃에서 16시간 동안 배양한 후 1×10⁷/ml가 되도록 주사기를 이용하여 식물에 주입하였다. 고추 잎사귀에서 상기 바이러스를 접종한 후 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간대에서 RNA를 분리하였고 상기 박테리아를 접종한 경우 0, 3, 6, 15, 18 및 24시간대에서 RNA를 분리하였다. RNA 분리 방법은 다음과 같다. 고추를 갈아낸 다음 RNA 용출 버퍼(최종부피 250ml에 13.5g p-AminoSA, 2.25g 5-Naphthalenedisulfonic acid, 5ml 2-mercaptoethanol)에 담아 녹여낸 후, 원심분리를 수행하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액에 동일 부피의 페놀을 첨가하여 DNA 오염을 막고, 동일 부피의 에탄올을 첨가하여 RNA 침전물이 생성되면 다시 원심분리하여 증류수에 녹였다. 노던 블롯 하이브리디제이션은 ³²P-라벨된 CaWRKY-a cDNA 탐침으로 수행하였다. RNA를 동일하게 0.8% 마가로스겔에 전기영동을 수행하고 막(membrane) (AgenBio, Korea)에 흡착시킨 후 ³²P-라벨된 CaWRKY cDNA를 탐침으로 65℃에서 16시간 동안 노던 블롯을 수행하였다. 수행 후 세척 버퍼(0.1% SDS, Sodium citrate, Sodium chloride)를 이용하여 세척하였다. 본 실시예는 각각 3회 반복하였다.

TMV-Po 접종에 의한 CaWRKY-a 발현 측정에서, CaWRKY-a는 TMV-P_{1,2} 접종 및 모조(mock) 접종 후 모든 시간대에서 측정되지 않았다. 대조적으로, 상기 전사체는 같은 조건하에서 TMV-P₀의 접종 후 24시간대부터 전사체의 축적이 시작되었고 48시간대에서 최고수치에 도달했다. 양성 대조군으로, 고추에서 유래한 병원성 연관 단백질(pathogenesis-related protein:PR) 유전자인 CaPR-1의 발현 패턴을 조사하였다(Kim and Hwang, *Physiol Plantarum*, 2000). CaPR-1의 강한 발현 유도는 접종 후 48시간대에서 관찰되었다(도 3a 참조). 상기 결과에서 TMV 처리 하에서 CaWRKY-a의 발현 패턴이 CaPR-1과 크게 다르지 않으며 더 빠른 시간에 발현이 유도되는 것이 측정되었다.

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*(Xcv) 접종에 의한 CaWRKY-a 발현 조사에서, CaWRKY-a가 ECW-20R(저항성) 잎사귀에서 우선적으로 발현되었다(도 3b 참조). CaWRKY-a는 접종 후 15시간대에서 발현이 시작되며, 24시간대에서 증가되었다. 양성 대조군인 CaPR1은 이와 비슷한 패턴이나 발현 수위는 낮은 것이 측정되었다. 감수성 *Capsicum annuum* cv. ECW의 잎사귀에 Xcv를 접종한 후 15시간대에서 CaWRKY-a 발현이 측정되었지만, 그 수위는 저항성 *Capsicum annuum* cv. ECW-20R의 잎사귀보다 현저하게 낮았다.

본 실시예의 결과는 바이러스 및 박테리아 접종시 과민성 반응이 CaWRKY-a의 특이 발현을 신속하게 유도함을 알 수 있다. 기존 연구에서는 이종의 WRKY 유전자 발현이 침입 병원균에 저항하는 식물 방어 메커니즘의 일부라고 보고하고 있으므로, 이를 통해 CaWRKY-a 역시 다른 종의 WRKY와 동일한 기능을 가짐을 알 수 있다.

<실시예 5> 다양한 화학물질과 상처에 대한 반응에서 CaWRKY-a 유전자 발현 조사

1달된 고추 식물에 10% 에탄올에 용해한 10mM 살리실산(salicylic acid: 이하 "SA"라 칭함) 또는 100 μ M 메틸 자스몬산(methyl jasmonate: 이하 "MeJA"라 칭함)을 분무하였다. 대조군 식물에는 10% 에탄올을 분무하였다. 에테폰(ethephon) 처리는 1달 된 고추 식물에 증류수에 용해한 10mM 에테폰을, 대조군 식물에는 증류수를 분무하였다. 잎사귀는 SA 및 에테폰의 경우 0, 2, 6, 12, 18 및 24시간대에서, MeJA의 경우 0, 2, 8 및 24 시간대에서 채취하여 액체 질소에 신속하게 냉동시켰고, -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. sodium chloride(NaCl) 처리를 위해, 뿌리째 뽑은 고추 식물을 400mM NaCl 또는 증류수가 담긴 페트리 디쉬에서 배양하였고, 0, 0.5, 1, 2, 6, 12 및 24 시간대를 선택하여 액체 질소로 냉동하였다. 상처를 주기 위해 면도칼로 잎사귀를 10등분으로 평행 절개하였고, 3mm 부분으로 절개하였다. RNA는 동일한 식물에 상처를 준 후 0, 0.5, 1, 2, 6, 12 및 24 시간대에서 실시예 4와 동일한 방법으로 상처를 준 잎사귀와 상처를 입지 않은 잎사귀에서 추출하였다. 노던 블롯 하이브리다이제이션은 ³²P-라벨된 *CaWRKY-a* cDNA 탐침으로 수행하였고 실시예 4의 방법과 동일하게 수행하였다. 본 실시예에는 3회 반복하였다.

고추에 10mM SA를 분무하였을 때, *CaWRKY-a*와 양성 대조군 *CaPR-1*의 발현이 유도되었으나 두 유전자의 발현 유도 시간이 상이했다(도 4a-a 참조). SA 처리 후 초기 6시간대에서 발현되었고, 처리 후 24시간대에서 최고 수치에 도달하여 저하된다. 이러한 결과는 식물에 SA를 처리할 때, *CaWRKY-a*가 발현되며 양성 대조군인 *CaPR-1*보다 빠르게 작용함을 시사한다.

고추에 10mM 에테폰 용액을 분무했을 때, *CaWRKY-a* 전사체는 에테폰을 처리한 후 2시간대에서 발현이 시작되었고, 6 시간대까지 증가하다가 24시간대 후에는 저하하였다. 양성 대조군 *CaPR-1*의 강한 발현 유도는 에테폰 처리 후 18시간대에서 24시간대 사이에 측정되었다(도 4a-b 참조). 이러한 결과는 상기 조건에서 *CaWRKY-a*의 발현이 *CaPR-1* 발현보다 빠르게 유도된다는 것을 시사한다. 음성 대조군 잎사귀에서는 *CaWRKY-a* 또는 *CaPR-1*의 발현이 탐지되지 않았다.

고추에 100 μ M MeJA를 분무했을 때, *CaWRKY-a*는 MeJA 처리 후 2시간대에서 발현되고 처리 후 8시간대에서 저하된다. 양성대조군인 *CaPin II*은 MeJA 처리 후 2시간대에서 발현이 시작되며, 처리 후 24시간대까지 최고 수치를 유지함을 보여 준다. (도 4b-c 참조).

고추를 400mM NaCl에서 재배하였을 때, *CaWRKY-a*는 12시간 안에 발현되고 24시간대 이후에 강하게 발현된다(도 4b-d 참조). 양성 대조군인 *Cadhn*은 NaCl 처리 후 2시간대에서 발현이 시작되고 24시간대까지 유지된다.

고추에 상처를 가하였을 때, 노딧 블롯 결과 양성대조군 *CaPin II*는 절개 상처에 대한 반응으로 축적되며, *CaWRKY-a*는 국부 상처 후 초기 0.5 시간대에서 강하게 축적되었다(도 4b-e 참조).

유도성 방어 유전자의 발현을 조절하는 저분자량의 신호 분자 즉 SA, JA 또는 ET를 고추에 처리한 상기 실시예의 결과에서 *CaWRKY-a*의 전사 활성화가 바이러스 또는 박테리아 병원균에 의한 과민성 반응 뿐 아니라 신호 분자를 처리한 경우에도 증가하는데, 각각의 유도 스트레스 조건하에서 *CaPR-1*, *CaPin II* 또는 *Cadhn* 같은 여러 마커 유전자보다 더 빠르게 유도됨을 알 수 있다.

<실시예 6> *CaWRKY-a::smGFP* 구조체의 제조 및 발현

유전자 특이 올리고뉴클레오타이드 서열번호 3 및 4로 기재되는 프라이머를 이용하여 PCR을 고추 cDNA 라이브러리를 주형으로 수행하였다. 그 결과 *CaWRKY-a* cDNA의 종료 코돈이 제거되었다. PCR 증폭 생산물은 soluble modified green fluorescent protein(smGFP) 코딩 구역과 융합하였다(도 5a 참조)(Davis and Vierstra, *Plant Mol Biol*, 1998; Park et al., *Plant Cell*, 2001). 1U T4 라이게이즈(Roche, Germany)를 이용하여 발현 벡터에 DNA를 연결한 후, 대장균과 DNA가 함께 들어 있는 튜브를 1분 30초 동안 42 $^{\circ}$ C에 방치한 후 얼음으로 옮긴다. 그 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하여, 대장균 내의 융합 단백질을 과다 발현하였다. transient-발현 분석을 위하여, 융합 구조체의 플라스미드 DNA(3 μ g)를 particle gun(PDS-1000/He;Bio-Rad)으로 tobacco bright yellow-2(BY-2) cell에 주입하였다(Takeuchi et al., *Plant Mol Biol*, 1992). 녹색 형광 단백질(GFP) 융합 구조체의 transient 발현은 BY-2 tobacco 원형질체에 PEG-mediated transformation 방법으로 DNA를 주입하여 형광 현미경(Zeiss Axioplan fluorescence microscope, Jena, Germany)으로 조사하였다(Park et al., *Plant J*, 2004). PEG-mediated transformation 방법은 다음과 같다. 실험 튜브에 3 μ g DNA를 넣은 후 BY-2 세포와 혼합하였다. 그 후 300 μ l PEG를 넣고 튜브를 가볍게 진동하였다. 본 실시예에는 3회 반복하였다.

Cauliflower mosaic virus 35S 프로모터에 의해 조절되는 융합 유전자는 tobacco 원형질체에서 강하게 발현되는 것이 측정되었다. 대조군 smGFP는 세포 안에 분포되어 있는 반면, 융합 단백질은 BY-2 세포의 핵내에 분포한다(도 5b 참조). 본

실시에 결과 *CaWRKY-a* 서열이 추정 전사 조절자를 포함하고 있음으로 상기 단백질이 핵내에 들어가 작용함을 알 수 있다. 또한 *CaWRKY-a::smGFP*의 핵내 표적화는 핵내 분포 신호(nuclear translocation signal)를 포함하지 않아도 가능함을 알 수 있다.

<실시예 7> *CaWRKY-a*의 박테리아 발현

CaWRKY-a cDNA 단편은 서열번호 5 및 6으로 기재되는 프라이머를 사용하여 PCR 방법으로 고추 cDNA 라이브러리를 주형으로 이용하여 증폭하였고, pGEX-KG 벡터(Amersham Pharmacia Biotech, UK)의 *BamHI* 자리에 삽입하였다. 융합 플라스미드를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하였다. 대장균과 DNA가 함께 들어 있는 튜브를 1분 30초 동안 42℃에 방치한 후 얼음으로 옮긴다. 그 후 37℃에서 1시간 배양하여, 대장균 내의 융합 단백질을 과다 발현하였다. GST-*CaWRKY-a* 융합 단백질의 과다발현은 배지에 1mM isopropyl-β-d-thiogalactoside(IPTG)를 첨가하여 30℃에서 3시간 동안 유도하였다. 재조합 단백질의 정제를 위해, 박테리아는 발현 유도 후 침전물을 1×PBS 버퍼(140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH7.3)로 현탁하였고, vibracell sonifier(Sonics and Materials, USA)를 사용하여 1분간 얼음에서 분쇄하였다. 용해 후 13,000×g에서 10분 동안 원심분리하고, 상층액을 Glutathione Sepharose 4B(Amersham Pharmacia Biotech, UK)으로 크로마토그래피를 수행하였다. 이 후 재조합 단백질을 용출 버퍼(50mM Tris-HCl, 10mM reduced glutathione, pH8.0)로 용출하였다.

<실시예 8> 전기영동 이동도 옮김 어세이(Electrophoretic mobility shift assay:EMSA)

이동도 옮김 어세이(Mobility shift assay)는 박 등의 방법에 따라 수행하였다(park et al., *Plant Cell*, 2001). 결합 반응 혼합물은 4μl 버퍼 A(20mM HEPES pH7.8, 100mM KCl, 2mM DTT, 1mM EDTA, 20% glycerol), 0.5μg poly(dI-dC), 5μg BSA, 200ng GST-*CaWRKY-a* 융합 단백질과 2ng T4 polynucleotide kinase(Sigma, USA)를 이용하여 [³²P] ATP를 라벨링한 이중 나선 합성 올리고뉴클레오티드를 혼합하였다. EMSA에 사용된 탐침으로는 *CaPR 10* 유전자의 프로모터 W-box 요소에서 발견되는, 단일 TGAC 서열을 포함하는 서열번호 7로 기재되는 W1과 2개의 TGAC 반복을 포함하는 서열번호 8로 기재되는 W2를 사용하였다(도 6a 참조)(Park et al., *Plant J*, 2004). DNA-단백질 상호작용 복합체는 실온에서 30분간 방치하고 10% 비변성 폴리아크릴아마이드젤에서 0.5×TBE 버퍼를 이용하여 20V에서 1시간 동안 전기영동을 수행하여 분석하였다. 본 실시예는 3회 반복하였다.

본 실시예 결과 재조합 *CaWRKY-a*는 서열번호 7로 기재되는 W1 또는 서열번호 8로 기재되는 W2 탐침에 효과적으로 결합하고, W1 및 W2 올리고뉴클레오티드 사이에 경쟁적 결합 특이성을 보인다(도 6b 참조). 또한 50mM EDTA가 존재 시, 재조합 *CaWRKY-a* 단백질 역시 W1 또는 W2 올리고뉴클레오티드와의 결합이 강하게 교란된다.

본 실시예의 결과를 통해 *CaWRKY-a*가 W-Box에 결합하는 것을 것을 보아 다른 종의 WRKY처럼 전사인자로 기능하며 방어 유전자의 발현에 관여함을 알 수 있다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 고추에서 유래한 신규 *CaWRKY-a*는 TMV 또는 *Xcv*의 침입, 화학 물질 및 상처 스트레스에 의해 발현이 유도되며, 방어 유전자의 프로모터에 존재하는 W-box에 결합능력을 가지는 것으로 보아 식물체에서 방어 반응 관련 전사인자로 기능함이 확인됨으로, 상기 단백질은 상기 바이러스 또는 박테리아에 대항하는 방어 반응을 가지는 식물체 제작에 유용하며, *CaWRKY-a* 과발현 유전자 도입 식물체를 통해 식물체의 방어 반응 메커니즘을 연구하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 상기 유전자 및 단백질은 과민성 반응과 관련된 식물의 질환을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1a는 *CaWRKY-a*의 전체길이 cDNA를 분석한 유전자 서열 및 아미노산 서열이고,

도 1b는 *CaWRKY-a* 단백질과 다른 종의 WRKY 단백질 간의 아미노산 서열을 비교한 것이고,

도 2는 *CaWRKY-a* 유전자를 지노믹 DNA를 서던 블롯 방법으로 분석한 그림으로, E는 *EcoRI* 을, H는 *HindIII*를, X는 *Xba I* 을 나타내고,

도 3은 고추에 바이러스 및 박테리아를 접종했을 때 *CaWRKY-a* 유전자 발현을 측정한 그림으로, a는 TMV-P₀ 또는 TMV-P_{1,2}를 접종했을 때 *CaWRKY-a* 유전자 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고, b는 *Xanthomonas campestris*(Xcv)를 접종했을 때 *CaWRKY-a* 유전자 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고,

도 4a는 고추에 비생물 스트레스를 가하였을 때 *CaWRKY-a* 유전자 발현을 측정한 그림으로, a는 고추에 살리실산(Salicylic acid)을 처리했을 때 *CaWRKY-a* 유전자 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고, b는 에테폰(ethephon)을 처리했을 때 *CaWRKY-a* 유전자 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고,

도 4b는 고추에 비생물 스트레스를 가하였을 때 *CaWRKY-a* 유전자 발현을 측정한 그림으로, c는 메틸 자스몬산(Methyl jasmonic acid)을 처리했을 때 *CaWRKY-a* 유전자 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고, d는 염(sodium chloride)을 처리했을 때 *CaWRKY-a* 유전자 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고, e는 상처(wounding)를 주었을 때 *CaWRKY-a* 유전자 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고,

도 5는 *CaWRKY-a::smGFP* 융합 유전자의 세포내 분포(localization)를 측정한 그림으로, a는 *CaWRKY-a::smGFP* 융합 유전자의 구조도를 설명한 그림이고, b는 *CaWRKY-a::smGFP* 융합 유전자의 세포 내 분포(localization)를 형광 현미경으로 측정한 그림이고,

도 6은 *CaWRKY-a*의 DNA 결합 활성도를 측정한 그림으로, a는 DNA 탐침(W1과 W2)의 유전자 서열을 나타낸 그림이고, b는 *CaWRKY-a*의 DNA 결합 활성도에서 경쟁자 관계와 킬레이트제의 효과를 보여준 그림이다.

도면

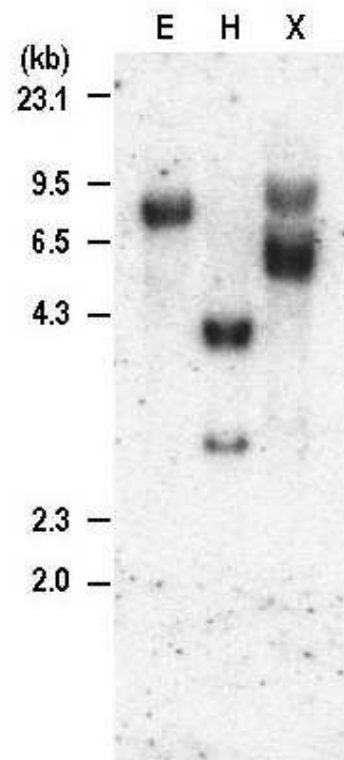
도면1a

```

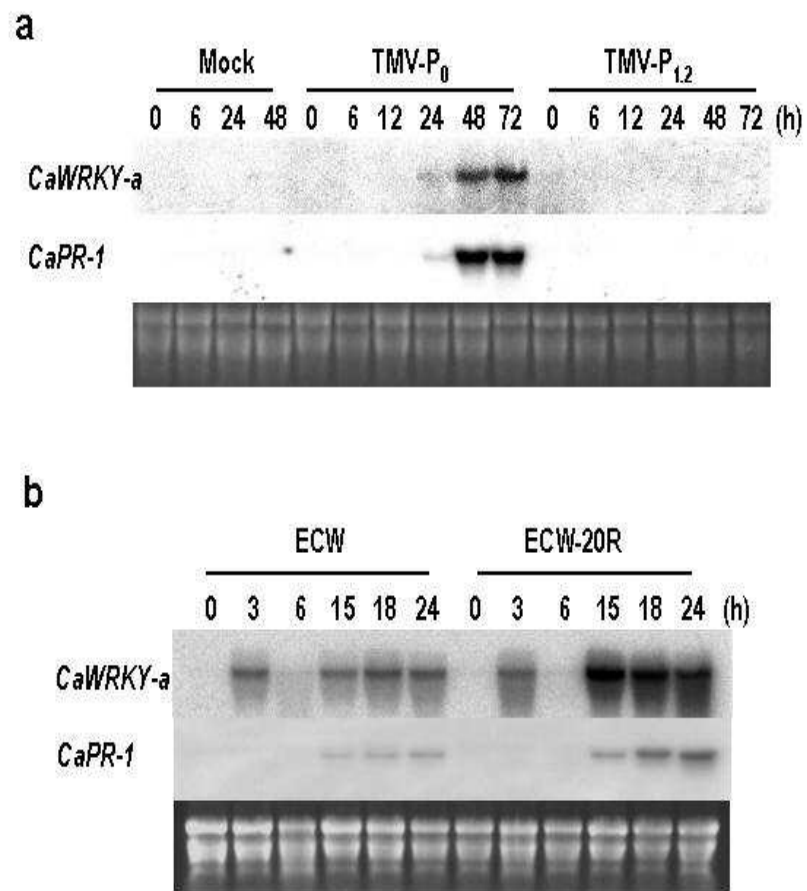
1      gaaatccatataatcttttctaaagggtttgaaactttctttatcccttttatattat
53      atggcttcttccagggtgaaaatcgaacacattttatgaattctttcaacagcaacatttcatcttcccaa
      H A S S G G N T N T F M N S F N S N Y S F S S S Q
125     ttcattgacttcttcttttagtgaccttctttctgaataataatgaatgaataatacaacaacaggaaacgtttt
      F M T S S F S D L L S D N N D D N N N N R N W G F
203     agttatcagagaaatcagaaatcaatcaacaagaatgaggtttccaaagtccaagtcttttccaccttcttctt
      S Y Q R I T N S I N K D E U P K F K S F P P S S L
275     cctatgattcttcttcttcatcaccagcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
      P M I S S S S P A S P S S Y L A F P H S L S P S U
353     cttttggactcaccagttttgttttaacaattccaaatctcttccatcaccacaacaacaggaaatgttttggatgtt
      L L D S P U L F M N S N T L P S P T T G S F G S L
425     aattccaaaggagaaatcgaaggacttcttgaatttcttcttccatagtagggcttcttcttcttcttcttctt
      N S K E D N S R T S D F S F H S R P A T S S S I F
503     cacttcttcttcttccaaaggaaacttcatgttgacgactttaaatacaaggcaacaacagacttcttgaatttctt
      H S S A P R N S L D D L I T R Q Q Q T T E F S T A
575     aaaaatgggttgaaaatcagaagttagcttccaaatcgaagtcttccaaaggagaaacatgcagaatgaatccgtccca
      K I G U K S E U A P I Q S F S Q E N M Q N N P A P
653     atgcattaccttcaaccattctcaatattgttagagaacagaaggcagaagaatggtttataatgggaggaatatggg
      M H Y R Q P S Q Y U R E Q K A E D G Y N W R K Y G
725     caaaagcaaggtagaaaggagtagaaatccgcgaagcttattcaaggtttagcttccatattgttccatcaaaagg
      Q K Q Y K G S E N P R S Y Y K C T F P N C P T K E
803     aaggtttgaaaggaaacttggatggacacttacttgaataatgttcttgaaggagcccaataatcattccaaagcccca
      K Y E R N L D G E Y T E I Y Y K G S E N E P K F Q
875     tccaccagaagaatcatccgcacaatcgattcagaacccttcttcttccaaacttggatataacaatcagcccaat
      S T R R S S A Q S I Q N L A Y S N L D I T N Q P N
953     gctttcttggaaaatgttcaaaagggtttcccttggccttgaacagacaattcttcaagcttcttttggagatggaga
      A F L E N A Q R D S L A U T D N S S A S F G D E D
1025    ttgattcaagggttcttccattcagttcagtagagaataatgattgaataatgaacctgaggcaaggagatggagagg
      U D Q G S P I S K S G E N D E N E P E A K R W K G
1103    gacaattgaaaacgagggttcatatcatctgcaagttagaacagtacgtgaacctagaatcgttagtcaaaaccaaggt
      D N E N E U I S S A S R T U R E P R I U U Q T T S
1175    gacattgattcttcttgaattgattgattgattgattgattgattgattgattgattgattgattgattgattgatt
      D I D I L D D G Y R W R K Y G Q K Y Y K G N P N P
1253    agaagttacttacaattgcacatttatttggcttctcagtttaggaagcatttagagcagcattcagcattcagcatt
      R S Y Y K C T F I G C P Y R K E E Y E R A S E D L R
1325    gcagttgattcacaactttagaaaggaaacataaccaatgatttccgtcagcagcgttggtagcgttggtagcgtt
      A Y I T T Y E G E E N E D U P A A R G S G S Y S M
1403    aatgaaccttccattcttgaaggcaacaataacatgcccagtagttccaaaggcccttccattgttggcttacaattttaa
      N E P P S G S N N N M P U U P R P S L L A N N S N
1475    caaggaaatgaaatgttagtaaacatttatttaacacagcacagggttgaaccaccaatcacccttgcagatgctacaa
      Q G H N U S N T L F N T A Q U E P P I T L Q H L Q
1553    agcttcttgaagggttcaaggttattcagggaatttgaaccttcatcaggatcttattatgaatcaaatgcagccca
      S S G S S S Y S G F G T S S G S Y H N Q M Q P T N
1625    aattccaaagctgataaggcaaggagaaacctgaagaatgatttatttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
      N S K L I S K E E P K D D L F F S S F L N +
1703    ataccaaaatgcagaagaatgaagaatttcttctcgaagtcaaaagtatttcttcttcttcttcttcttcttctt
      ctaaaaatcagtagtttaggttttaggttccaaagtgaaggttagtccattatttatttggctttagagccctggctt
1775    tagattgctttagcagcttgaaccttccattgaagaatttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
1825    gacagagatattcatgtttgaaacagttgaaatcttataaaaaaaaataaaaaaaaataaaaaaaaataaaaaaa

```

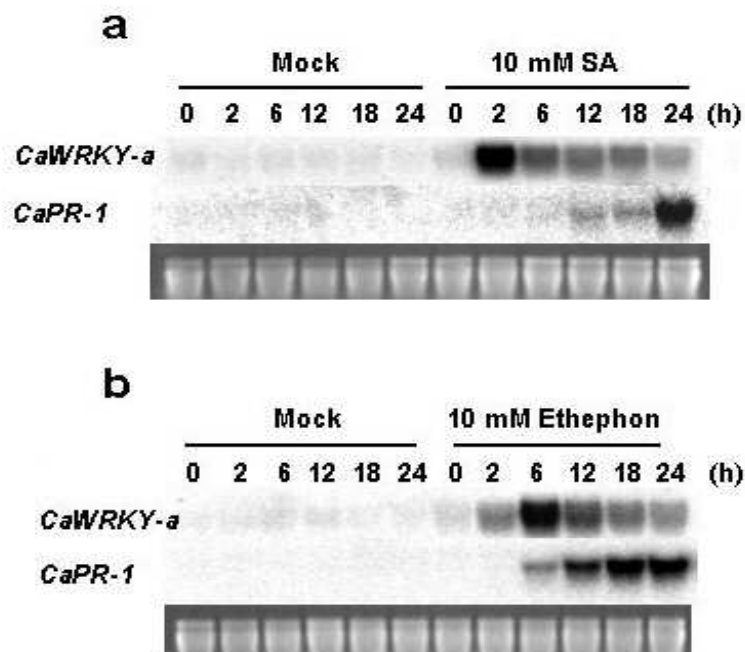

도면2



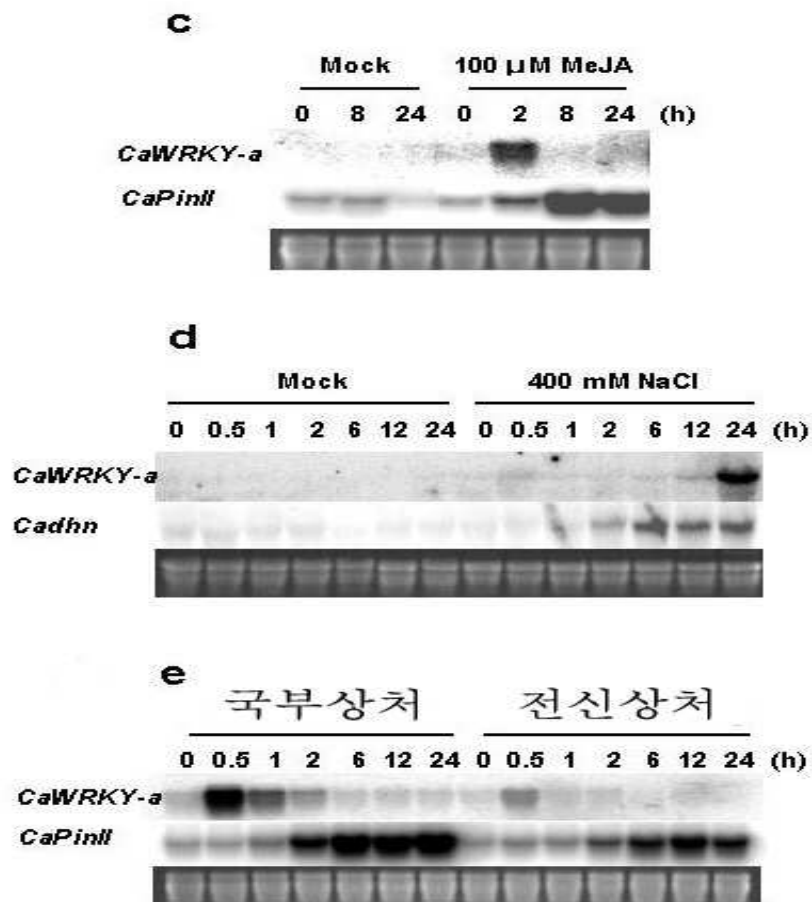
도면3



도면4a

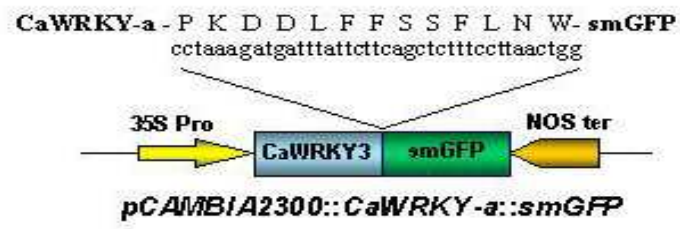


도면4b

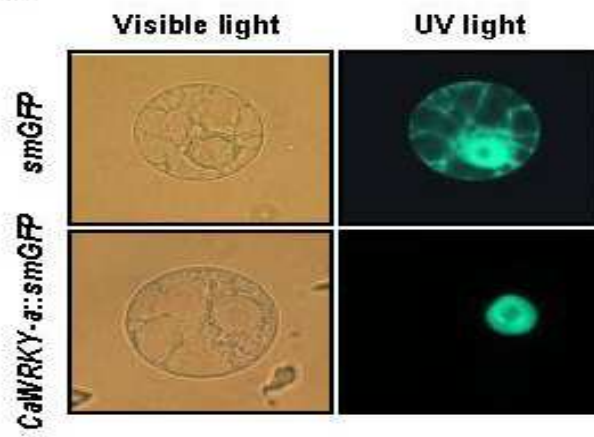


도면5

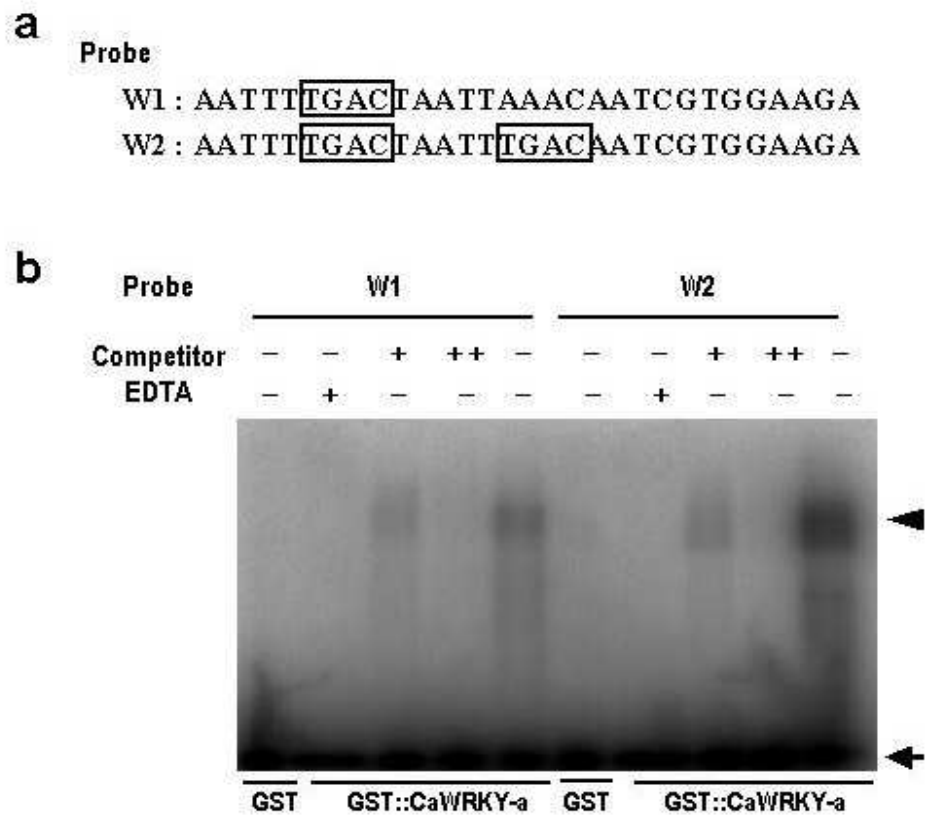
a



b



도면6



서열목록

<110>	PAEK, Kyung-Hee
<120>	Isolation and characterization of a hot papper gene encoding WRKY transcription factor induced during hypersensitive response to tobacco mosaic virus and Xanthomonas campestris
<130>	5p-07-19
<160>	12
<170>	KopatentIn 1.71
<210>	1
<211>	26
<212>	DNA
<213>	WRKY sense primer
<400>	1
ggktayagat	ggmgraaata tggrca

<210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> WRKY antisense primer

<400> 2
 atgystkcct tcatasgtsg tka 23

<210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> CaWRKY-a sense primer

<400> 3
 gggatcctat gatctcttct tcatca 26

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> CAWRKY-a antisense primer

<400> 4
 cggatcccag ttaaggaaag agct 24

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> CaWRKY-a-5

<400> 5
 gggatccatg atctcttctt catca 25

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> CaWRKY-a-3 UTR

<400> 6
 gcaatctaga gccaggctca aagacc 26

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> W1

<400> 7
 gaattttgac taattaaaca atcgtggaaa 30

<210>	8	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	W2	
<400>	8	
aatttttgact aatttgacaa tcgtggaaga		30
<210>	9	
<211>	1997	
<212>	DNA	
<213>	Capsicum annuum CaWRKY-a cDNA	
<400>	9	
gaatcctata atctttctaa aagtttgaaa ctttcttata ccgtttatatt atatggcttc		60
ttcaggtgga aatacgaaca cttttatgaa ttctttcaac agcaactatt cattttcatc		120
ttccaattc atgacttctt ctttttagtga ccttctttct gataataatg atgataataa		180
caacaacagg aactggggat ttagttatca gagaattacg aattcaatta acaaagatga		240
ggttccaaag ttcaagtctt ttccaccttc ttctttgcct atgatctctt cttcatcacc		300
agcttctcct tcttcttata ttgcttttcc tcattcttta agtccatcgg ttcttttgga		360
ctcaccagtt ttgtttaaca attccaatac tcttccatca ccaacaacag ggagttttgg		420
tagtttgaat tccaaggagg ataattcaag gacttctgat ttctctttcc atagtaggcc		480
tgctacttca tcatcaatat ttcactcttc tgctccaaga aactcattgg acgacttaat		540
aacaaggcaa caacagacta ctgaattctc cacagcaaaa attgggggtga aatcagaagt		600
agctccaatt caaagtttct cccaagagaa catgcagaat aatcctgccc caatgcatta		660
ccgtcaacca tctcaatatg ttagagaaca gaaggcagaa gatgggttata attggaggaa		720
atatgggcaa aagcaagtga aaggaagtga gaatccgcga agctattaca agtgtacgtt		780
tcctaattgt cctacaaaga agaagggtga aaggaacttg gatggacacg ttactgagat		840
agtctataag gggagccata atcatccaaa gcctcaatcc accagaagat catccgcaca		900
atcgattcag aaccttgctt actccaactt ggatataaca aatcagccaa atgcttttct		960
tgaaaatgct caaagggatt ccttggccgt aacagacaat tcttcagctt cttttggaga		1020
tgaggatgtt gatcaagggt ctctatcag taagtcagga gaaaatgatg aaaatgaacc		1080

tgaggcaaag agatggaagg gagacaatga aaacgaggtc atatcatctg caagtagaac 1140
 agtacgtgaa cctagaatcg tagtacaac cacaagtgc attgatattc ttgatgatgg 1200
 ttatagatgg agaaaatatg gacaaaaagt tgtcaaaggc aatccaaacc caagaagtta 1260
 ctacaaatgc acattttattg gctgtccagt taggaagcat gtagagcgag catcgcatga 1320
 tctaagagca gtgatcaciaa cttatgaagg aaaacataac catgatgttc ctgcagcacg 1380
 tggtagcggg agttactcca tgaatgaacc tccatctgga agcaacaata acatgccagt 1440
 agttccaagg ccttcactgt tggctaaciaa ttctaataca ggaatgaatg ttagtaacac 1500
 tttatttaac acagcacagg ttgaaccacc aatcaccttg cagatgctac aaagctctgg 1560
 aagttcaagt tattcaggat ttggaacctc atcaggatct tatatgaatc aaatgcagcc 1620
 cacgaacaat tccaagctga taagcaaaga agaacctaaa gatgatttat tcttcagctc 1680
 tttccttaac tgaaatttca ccataccaaa atgcaaaaga taagagattt ctttctcaag 1740
 tcaaagtatt ctttttaact tatgatagtt ttttttcta aaatacgtag ttaggtttta 1800
 ggatccaaag taagagttag tccattatth tattgggtct tgagcctggc tctagattgc 1860
 ttagcagctg taactctcca ttaagatttt ttttttctat atacatgaat ctgtcagtgt 1920
 aaggtgggac agagatatca tgggtgaaca gttgaatctt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980
 aaaaaaaaaa aaaaaaa 1997

<210> 10
 <211> 546
 <212> PRT
 <213> Capsicum annuum CaWRKY-a ammino acid

<400> 10
 Met Ala Ser Ser Gly Gly Asn Thr Asn Thr Phe Met Asn Ser Phe Asn
 1 5 10 15
 Ser Asn Tyr Ser Phe Ser Ser Ser Gln Phe Met Thr Ser Ser Phe Ser
 20 25 30
 Asp Leu Leu Ser Asp Asn Asn Asp Asp Asn Asn Asn Asn Arg Asn Trp
 35 40 45
 Gly Phe Ser Tyr Gln Arg Ile Thr Asn Ser Ile Asn Lys Asp Glu Val
 50 55 60
 Pro Lys Phe Lys Ser Phe Pro Pro Ser Ser Leu Pro Met Ile Ser Ser

65		70		75		80
Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Ser Tyr Leu Ala Phe Pro His Ser Leu						
	85			90		95
Ser Pro Ser Val Leu Leu Asp Ser Pro Val Leu Phe Asn Asn Ser Asn						
	100			105		110
Thr Leu Pro Ser Pro Thr Thr Gly Ser Phe Gly Ser Leu Asn Ser Lys						
	115			120		125
Glu Asp Asn Ser Arg Thr Ser Asp Phe Ser Phe His Ser Arg Pro Ala						
	130			135		140
Thr Ser Ser Ser Ile Phe His Ser Ser Ala Pro Arg Asn Ser Leu Asp						
145		150		155		160
Asp Leu Ile Thr Arg Gln Gln Gln Thr Thr Glu Phe Ser Thr Ala Lys						
	165			170		175
Ile Gly Val Lys Ser Glu Val Ala Pro Ile Gln Ser Phe Ser Gln Glu						
	180			185		190
Asn Met Gln Asn Asn Pro Ala Pro Met His Tyr Arg Gln Pro Ser Gln						
	195			200		205
Tyr Val Arg Glu Gln Lys Ala Glu Asp Gly Tyr Asn Trp Arg Lys Tyr						
210		215		220		
Gly Gln Lys Gln Val Lys Gly Ser Glu Asn Pro Arg Ser Tyr Tyr Lys						
225		230		235		240
Cys Thr Phe Pro Asn Cys Pro Thr Lys Lys Lys Val Glu Arg Asn Leu						
	245			250		255
Asp Gly His Val Thr Glu Ile Val Tyr Lys Gly Ser His Asn His Pro						
	260			265		270
Lys Pro Gln Ser Thr Arg Arg Ser Ser Ala Gln Ser Ile Gln Asn Leu						
	275			280		285
Ala Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Thr Asn Gln Pro Asn Ala Phe Leu Glu						
	290			295		300
Asn Ala Gln Arg Asp Ser Leu Ala Val Thr Asp Asn Ser Ser Ala Ser						
305		310		315		320
Phe Gly Asp Glu Asp Val Asp Gln Gly Ser Pro Ile Ser Lys Ser Gly						
	325			330		335
Glu Asn Asp Glu Asn Glu Pro Glu Ala Lys Arg Trp Lys Gly Asp Asn						
	340			345		350

Glu Asn Glu Val Ile Ser Ser Ala Ser Arg Thr Val Arg Glu Pro Arg
355 360 365

Ile Val Val Gln Thr Thr Ser Asp Ile Asp Ile Leu Asp Asp Gly Tyr
370 375 380

Arg Trp Arg Lys Tyr Gly Gln Lys Val Val Lys Gly Asn Pro Asn Pro
385 390 395 400

Arg Ser Tyr Tyr Lys Cys Thr Phe Ile Gly Cys Pro Val Arg Lys His
405 410 415

Val Glu Arg Ala Ser His Asp Leu Arg Ala Val Ile Thr Thr Tyr Glu
420 425 430

Gly Lys His Asn His Asp Val Pro Ala Ala Arg Gly Ser Gly Ser Tyr
435 440 445

Ser Met Asn Glu Pro Pro Ser Gly Ser Asn Asn Asn Met Pro Val Val
450 455 460

Pro Arg Pro Ser Leu Leu Ala Asn Asn Ser Asn Gln Gly Met Asn Val
465 470 475 480

Ser Asn Thr Leu Phe Asn Thr Ala Gln Val Glu Pro Pro Ile Thr Leu
485 490 495

Gln Met Leu Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser Tyr Ser Gly Phe Gly Thr
500 505 510

Ser Ser Gly Ser Tyr Met Asn Gln Met Gln Pro Thr Asn Asn Ser Lys
515 520 525

Leu Ile Ser Lys Glu Glu Pro Lys Asp Asp Leu Phe Phe Ser Ser Phe
530 535 540

Leu Asn
545

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> full length WRKY cDNA sense primer

<400> 11
atggagaatt acccaccact at

22

<210> 12
<211> 24
<212> DNA

<213> full-length WRKY cDNA antisense primer

<400> 12

aatgaaggaa gcatagactt gcat

24