



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월27일
(11) 등록번호 10-1433603
(24) 등록일자 2014년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0033137
(22) 출원일자 2013년03월27일
심사청구일자 2013년03월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020120027830 A
KR101185847 B1
KR1020100107295 A

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김민철
경남 진주시 하대로 142, 106동 1305호 (하대동, 현대아파트)
진병준
경상남도 창원시 마산 회원구 양덕2동 656번지 1/4
전현진
경남 진주시 하대로 142, 106동 1305호 (하대동, 현대아파트)
(74) 대리인

양기혁, 김남식, 한윤호, 이인행

전체 청구항 수 : 총 5 항

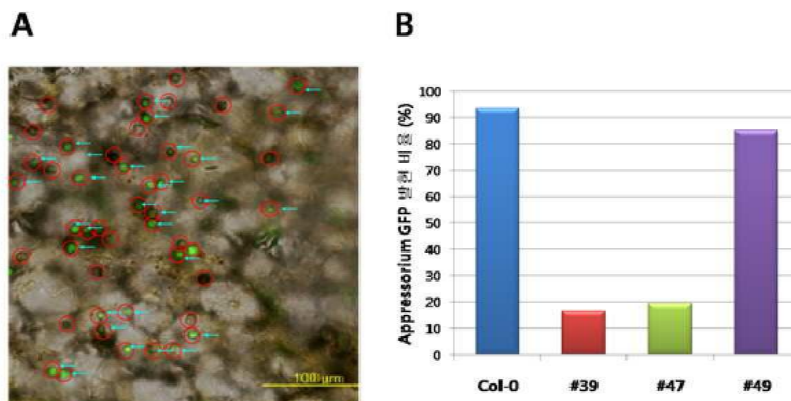
심사관 : 김승오

(54) 발명의 명칭 형질전환식물체를 이용하여 병원성 진균의 식물체로의 감염여부를 스크리닝하는 방법

(57) 요약

본 발명은 식물체의 감염여부를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 형질전환식물체를 이용하여 병원성 진균의 식물체로의 감염을 억제하는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. GFP와 같이 형광단백질을 발현하는 진균과 이를 표적으로 하는 small RNA를 발현하도록 형질전환된 형질전환식물체를 이용하여 병원성 진균의 식물체로의 감염이나, 호스테리움 형성을 억제하는 유전자 또는 물질의 탐색, 진균과 숙주 세포 사이의 small RNA를 포함한 물질의 이동을 촉진하거나 차단하는 유전자 또는 물질의 탐색 등에 활용하는 방법 관한 것이다.

대표도 - 도20



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0009092

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업, 기본연구(모험연구)

연구과제명 Small RNA의 세포간 이동성을 이용한 곰팡이저항성 작물 개발(3년차)

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

형광단백질을 발현하도록 형질전환된 형광단백질 발현 병원성 진균 및 상기 형광단백질의 발현을 저해할 수 있는 small RNA를 발현하도록 형질전환된 형질전환 식물체를 준비하는 단계;

상기 형광단백질 발현 병원성 진균을 상기 형질전환 식물체에 감염시키는 단계;

상기 감염된 형질전환 식물체에 피검 화합물을 처리한 후, 상기 형광단백질 발현 병원성 진균에 의한 호스테리움의 형성을 대조군에 비해 억제시키거나 또는 병원성 진균에서의 형광 발현을 대조군에 비해 억제시키지 않은 피검 화합물을 선별하는 단계를 포함하는 병원성 진균의 식물 감염 억제 물질의 스크리닝 방법.

청구항 2

형광단백질 발현 병원성 진균을 무작위 돌연변이시키거나 특정 유전자에 대한 위치지정 돌연변이(site directed mutagenesis)시킴으로써 형광단백질 발현 돌연변이 병원성 진균을 제조하는 단계;

상기 형광단백질 발현 돌연변이 병원성 진균을 상기 형광단백질의 발현을 저해할 수 있는 small RNA를 발현하도록 형질전환된 형질전환 식물체에 감염시키는 단계; 및

상기 형광단백질 발현 돌연변이 병원성 진균에 의한 호스테리움의 형성을 비돌연변이체인 대조군에 비해 억제시키거나 또는 상기 형광단백질 발현 돌연변이 병원성 진균에서의 형광 발현이 대조군에 비해 억제되지 않은 돌연변이체를 선별하는 단계를 포함하는 병원성 진균의 식물체 감염 관련 유전자의 스크리닝 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 small RNA는 microRNA, dsRNA, siRNA, shRNA인, 스크리닝 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 형광단백질은, 녹색형광단백질(GFP), 청색형광단백질(BFP), 시안형광단백질(CFP), 황색형광단백질(YFP), 적색형광단백질(RFP)인, 스크리닝 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 병원성 진균은 부패병 원인균(*Mucor spp.*), 벼도열병 원인균인 *Pyricularia oryzae*, 입고병 원인균(*Pythium ultimum*), 벼문고병 원인균(*Rhizoctonia solani*), 사과부패병 원인균(*Botryoshaeria dothidea*), 깨씨무늬병 원인균(*Bipolaris sorokiniana*), 잣빛곰팡이병 원인균(*Botrytis cinerea*), 고추탄저병 원인균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 벼도열병 원인균인 *Pyricularia grisea*, 수박덩굴마름병 원인균(*Mycosphaerella melonis*), 고추역병 원인균(*Phytophthora capsici*), 토마토 겹둥근무늬병 원인균(*Alternaria solani*), 입고병 원인균(*Fusarium oxysporum*), 또는 균핵병 원인균(*Sclerotinia sclerotiorum*)인, 스크리닝 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 식물체의 감염여부를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 형질전환식물체를 이용하여 병원성 진균의 식물체로의 감염여부를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Small RNA는 21-25개의 뉴클레오타이드로 이루어져 있으며 진핵생물에서의 전사 후 유전자발현조절(Post-transcriptional Gene Silencing, PTGS)에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 진핵생물에서 발견되는 대표적인 small RNA로는 상보적인 염기서열로 이루어진 긴 이중가닥의 RNA로부터 만들어지는 small interfering RNA(siRNA)와 부분적인 상보성을 가지는 긴 단일가닥의 RNA로부터 만들어지는 microRNA(miRNA)가 잘 알려져 있으며 주로 mRNA 분해, 번역과정(translation)의 저해, 메틸화(methylation)를 통한 염색질의 변화(chromatin modification) 메커니즘을 통해서 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이러한 small RNA들은 진핵생물의 발달과정이나 외부 스트레스환경에 적응하는 과정에서 그 생물학적 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 선충이나 동물 및 식물에서 연구된 결과에 의하면 small RNA는 그 small RNA가 생성된 세포 자체에서 유전자 발현 조절작용을 할 뿐만 아니라(cell-autonomous), 세포 간 이동을 통하여 인접한 세포에서의 유전자 발현 조절에도 그 기능을 수행하는 것으로 보고되고 있다(non-cell-autonomous). 식물에서 small RNA는 주로 원형질연락사(plasmodesmata)를 통한 짧은 거리의 이동을 통한 좁은 범위의 유전자 발현 억제(short-range silencing) 뿐만 아니라, 체관부를 통한 장거리의 이동을 통한 전신성 유전자 발현 억제(systemic silencing)도 유도하는 것으로 알려져 있다. 또한 small RNA의 세포간 이동성은 microRNA 보다는 siRNA 메커니즘에 의해서 생성된 small RNA가 보다 효과적이라는 보고가 있다. 위에서 언급한 바와 같이 동종세포(식물세포에서 식물세포로) 내에서 small RNA의 세포간 혹은 조직 간의 이동성은 밝혀지고 있지만 현재까지 이종세포 간(식물 세포에서 곰팡이나 박테리아 세포쪽으로)의 small RNA의 이동에 관해서는 밝혀진 바가 없다. 최근 들어 전사후 유전자 발현 조절 메커니즘을 이용하여 특정 유전자의 발현을 억제하는 방법이 개발되어 광범위하게 이용되고 있다. 그 대표적인 예로 siRNA 메커니즘을 이용한 double-stranded RNA interference (dsRNA) 방법이 개발되어 이용되고 있으며, 최근들어 miRNA 메커니즘을 이용하여 특정유전자의 발현을 억제하는 artificial miRNA(amiRNA) 방법도 이용되고 있다. 특히 amiRNA 방법은 dsRNAi 방법에 비해서 대상유전자에 대한 특이성을 인위적으로 조절함으로써 Off-target effect(발현억제의 표적으로 하지 않았던 유전자들의 발현이 비특이적으로 저해되는 현상)를 최소화한 매우 효율적인 유전자 발현억제 방법으로 알려지고 있다. Small RNA를 응용하여 유전자 발현을 억제하는 방법은 대부분이 식물체 내의 특정 유전자의 발현을 억제함으로써 그 유전자의 기능을 이해하기 위한 기능유전체학(functional genomics)분야에서 주로 응용되고 있다. 최근의 보고들에 의하면 dsRNAi 벡터 시스템을 이용하여 뿌리혹선충이나 바이러스 유전자의 발현을 억제함으로써 저항성작물을 개발하는 연구가 시도되고 있으며 그 효율성이 입증되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 병원성 진균의 식물체로의 감염여부를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명의 일 관점에 따르면, 형광단백질을 발현하도록 형질전환된 형광단백질 발현 병원성 진균 및 상기 형광단백질의 발현을 저해할 수 있는 small RNA를 발현하도록 형질전환된 형질전환 식물체를 준비하는 단계; 상기 형광단백질 발현 병원성 진균을 상기 형질전환 식물체에 감염시키는 단계; 상기 감염된 형질전환 식물체에 피검 화합물을 처리한 후, 상기 형광단백질 발현 병원성 진균에 의한 호스테리움의 형성을 대조군에 비해 억제시키거나 또는 병원성 진균에서의 형광 발현을 대조군에 비해 억제시키지 않은 피검 화합물을 선별하는 단계를 포함하는 병원성 진균의 식물 감염 억제 물질의 스크리닝 방법이 제공된다.

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, 형광단백질 발현 병원성 진균을 무작위 돌연변이시키거나 특정 유전자에 대한 위치지정 돌연변이(site directed mutagenesis)시킴으로써 형광단백질 발현 돌연변이 병원성 진균을 제조하는 단계; 상기 형광단백질 발현 돌연변이 병원성 진균을 상기 형광단백질의 발현을 저해할 수 있는 small RNA를 발현하도록 형질전환된 형질전환 식물체에 감염시키는 단계; 및 상기 형광단백질 발현 돌연변이 병원성 진균에 의한 호스테리움의 형성을 비돌연변이체인 대조군에 비해 억제시키거나 또는 상기 형광단백질 발현 돌연변이 병원성 진균에서의 형광 발현이 대조군에 비해 억제되지 않은 돌연변이체를 선별하는 단계를 포함하는 병원성 진균의 식물체 감염 관련 유전자의 스크리닝 방법이 제공된다.

[0006] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 small RNA는 microRNA, dsRNA, siRNA, shRNA 일 수 있다.

[0007] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 형광단백질은 녹색형광단백질(GFP), 청색형광단백질(BFP), 시안형광단백질(CFP), 황색형광단백질(YFP), 적색형광단백질(RFP) 일 수 있다.

[0008] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 병원성 진균은 부패병 원인균(*Mucor spp.*), 벼도열병 원인균(*Pyricularia oryzae*), 입고병 원인균(*Pythium ultimum*), 벼문고병 원인균(*Rhizoctonia solani*), 사과부패병 원인균(*Botryoshaeria dothidea*), 깨씨무늬병 원인균(*Bipolaris sorokniana*), 잣빛곰팡이병 원인균(*Botrytis cinerea*), 고추탄저병 원인균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 벼도열병 원인균(*Pyricularia grisea*), 수박 덩굴마름병 원인균(*Mycosphaerella melonis*), 고추역병 원인균(*Phytophthora capsici*), 토마토 겹둥근무늬병 원인균(*Alternaria solani*), 입고병 원인균(*Fusarium oxysporum*), 균핵병 원인균(*Sclerotinia sclerotiorum*)일 수 있다.

[0009] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 병원성 진균에 의한 호스테리움의 형성의 억제여부는 병원성 진균이 발광하는 형광의 형태를 분석함으로써 수행될 수 있다. 즉, 일반 광학현미경을 사용하여 호스테리움 형성 여부를 확인하는 것 보다, 형광단백질에 의해 발생하는 형광에 의해 병원성 진균의 형태를 보다 명확하게 관찰할 수 있다.

발명의 효과

[0010] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, GFP 형광단백질을 발현하는 진균과 이를 표적으로 하는 small RNA를 발현하도록 형질전환된 형질전환식물체를 이용하여 병원성 진균의 식물체로의 감염여부를 스크리닝하는 방법을 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 오토밀 배지를 이용한 KJ201_GFP 곰팡이 배양상태를 나타내는 사진이다.
 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 KJ201_GFP 곰팡이에서 GFP가 강하게 발현되고 있음을 나타내는 사진이다.
 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 KJ201_GFP 곰팡이 포자 분리를 보여주는 사진이다.
 도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른 GFP 유전자를 타겟으로 하는 amiRNA 및 dsRNAi 벡터를 개략적으로 나타낸 개열지도이다.
 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 애기장대 식물체에 KJ201_GFP 곰팡이 접종 및 병원성 검증결과를 보여주는 사진이다.
 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 dsRNAi_GFP 형질전환 애기장대 식물체로부터 채종한 T₂ 종자를 하이그로마 이신 저항성 배지에서 선발하여 T₃ 종자를 확보하기 위해 식물체를 키우는 단계를 나타내는 사진이다.
 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 small RNA를 이용한 amiRNA_GFP 형질전환 애기장대 선발에 관하여 나타낸 도이다. GFP에 대한 small RNA 발현량이 높은 두 계통(#39, #47)과 발현량이 낮은 한 계통(#49)의 선발을 나타내는 사진이며(도 7A), 선발된 계통을 대상으로 곰팡이(KJ201 및 KJ201_GFP)를 접종한 후 형질전환 애기장대를 보여주는 사진이다(도 7B).
 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 dsRNAi_GFP 애기장대 형질전환체 선발 과정을 보여주는 사진이다. 하이그로 마이신 저항성을 이용한 dsRNAi_GFP 애기장대 형질전환체 선발 사진이며(도 8A), genomic PCR을 이용한 dsRNAi_GFP 애기장대 형질전환체 검증에 관하여 보여주는 사진이다(도 8B).
 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 small RNA blotting을 이용한 dsRNAi_GFP 애기장대 형질전환체를 검증하여 나타내는 사진이다.
 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 벼에 KJ201_GFP 곰팡이 접종 및 병원성 검증 조사를 보여주는 사진이다.
 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 amiRNA 및 dsRNAi_GFP 벼 형질전환체 제조를 나타내는 사진이다.
 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 RT-PCR 및 small RNA blotting을 이용하여 amiRNA 및 dsRNAi_GFP 벼 형질전환체를 검증하는 사진이다.
 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 일과성 검정을 통해서 dsRNAi 방법과 amiRNA 방법을 이용한 유전자발현 억제 시스템의 효율성 비교 결과를 보여주는 사진이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 amiRNA_GFP 발현에 의한 곰팡이 GFP 유전자 발현 억제를 나타내는 사진이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 곰팡이 접종 후 1일 후의 dsRNAi_GFP 발현에 의한 곰팡이 GFP 유전자 발현 억제 양상을 보여주는 사진이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 곰팡이 접종 후 2일 후의 dsRNAi_GFP 발현에 의한 곰팡이 GFP 유전자 발현 억제 양상을 보여주는 사진이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 곰팡이 접종 후 3일 후의 dsRNAi_GFP 발현에 의한 곰팡이 GFP 유전자 발현 억제 양상을 보여주는 사진이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 곰팡이 접종 후 4일 후의 dsRNAi_GFP 발현에 의한 곰팡이 GFP 유전자 발현 억제 양상을 보여주는 사진이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 곰팡이 접종 후 4일 후의 dsRNAi_GFP 발현에 의한 곰팡이 GFP 유전자 발현 억제 양상을 보여주는 사진이며(도 19A), GFP 발현 비율을 나타내는 그래프이다(도 19B).

도 20는 본 발명의 일 실시예에 따른 amiRNA_GFP 형질전환 애기장대를 이용한 곰팡이 GFP 유전자 발현 억제 효율 검증을 보여주는 사진이며(도 20A), GFP 발현 비율을 나타내는 그래프이다(도 20B).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0013] 실시예 1: GFP발현 *M. grisea* 곰팡이(KJ201_GFP)의 배양 및 접종

[0014] 벼 도열병을 일으키는 *M. grisea* 곰팡이에 GFP 유전자를 형질전환한 곰팡이 계통을 제공받아(KJ201_GFP, 경상대, 강규영), 오토밀배지에서 25℃에 배양하였다(도 1). 형광현미경을 통해 GFP가 발현됨을 확인한 KJ201_GFP 곰팡이를(도 2) 4-5일 동안 배양 후에 증류수를 부어 포자를 긁어낸 후, 미라클로스(miracloth)로 걸러내어 포자를 분리하여 5×10^5 spore/ml로 현탁액의 농도를 조절하였다(도 3). 상기 현탁액에 Tween-20을 넣어 200 ppm(0.2 ul/ml) 농도를 맞춘 후 식물체에 접종하고 밀봉(sealing)한 후 22-24℃, 상대습도 80%의 빛이 없는 조건에서 24시간 경과 후 장일조건(LD 16:8h)에서 22-24℃, 상대습도 80% 상태에 두었다.

[0015] 실시예 2: GFP 유전자발현 억제 벡터구축

[0016] GFP 유전자의 염기서열을 확보하고(Sesma A *et al.*, *Nature*, 431: 582-586, 2004) 이를 바탕으로 KJ201 곰팡이의 GFP 유전자를 타겟으로 하는 amiRNA 및 dsRNAi 벡터를 구축하였다(도 4). 하이그로마이신(hygromycin)을 선별마커로 사용하였다.

[0017] 실시예3: amiRNA_GFP 및 dsRNA_GFP벡터도입 애기장대 형질전환체

[0018] 애기장대 식물체에 벼 도열병을 일으키는 KJ201_GFP 곰팡이의 병원성을 조사하였고, 대조군에 비해 KJ201과 KJ201_GFP 곰팡이를 접종한 애기장대 식물체에서 도열병 발생을 확인하였다(도 5). amiRNA_GFP 및 dsRNAi_GFP 벡터를 아그로박테리움에 도입하고 플로랄 딥 방법(floral dip method)을 이용하여 애기장대 야생형 식물체(Col-0) 내로 형질전환시켰다. amiRNA_GFP 형질전환 식물체로부터 채종한 T₂ 종자를 하이그로마이신 저항성 배지에서 선발하여 T₃ 종자를 확보하였다. dsRNAi_GFP 형질전환 애기장대 식물체는 채종한 T₂ 종자를 하이그로마이신 저항성배지에서 선발하였고, T₃ 종자를 확보하기 위해 도 6과 같이 식물체를 재배하였다.

[0019] amiRNA_GFP를 형질전환한 애기장대 T₃ 계통에서 GFP 유전자에 대한 small RNA 발현량을 조사하기 위하여 애기장대 형질전환체로부터 전체 RNA를 분리하여 small RNA 노던 블로팅(Northern blotting)을 수행하였다. 그 결과 GFP에 대한 small RNA 발현량이 높은 두 계통(#39, #47)과 낮은 한 계통(#49)을 선발하였다(도 7A). 선발된 계통을 대상으로 KJ201 및 KJ201_GFP 곰팡이를 접종한 결과 형질전환체(#39, #47, #49)와 야생형 식물체(Col-0)에서 동일한 정도의 병원성을 가짐을 확인하였고 본 발명에 이 계통을 사용하였다(도 7B).

[0020] 35S::dsRNAi_GFP 벡터를 아그로박테리움을 이용하여 애기장대 식물체(Col-0)에 형질전환하여 하이그로마이신 함유 배지에서 하이그로마이신 저항성 T₁ 형질전환체 30 계통을 선발하였다(도 8A). 선발된 계통에서 genomic DNA를 추출하여 35S::dsRNAi_GFP 벡터에 삽입된 GFP 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 genomic PCR을 수행하였다. 이를 통해 dsRNAi_GFP 유전자가 애기장대의 genome에 안정적으로 삽입됨을 확인하였다(도 8B). 선발된 계통으로부터 T₂ 종자를 확보하고 T₂ 식물체들 중에서 하이그로마이신에 저항성 및 감수성을 가지는 식물체의 비율을 조사하여 저항성과 감수성의 비율이 3:1로 나타나는 계통(dsRNAi_GFP 유전자가 single copy로 삽입된 계통)들을 선발하였다. 선발된 T₂ 식물체들의 잎으로부터 전체 RNA를 추출한 후, small RNA 노던 블로팅을 이용하여 GFP 유전자를 타겟으로 하는 siRNA의 발현 수준을 조사하였다(도 9). small RNA blotting 결과를 바탕으로 siRNA의 발현 수준이 서로 다른 T₂ 계통들을 최종 선발하였다.

[0021] **실시예 4: amiRNA_GFP 및 dsRNA_GFP 벡터도입 벼 형질전환체 제조**

[0022] KJ201_GFP 곰팡이를 감염시킨 후 동진 및 낙동벼 식물체에 대한 병원성을 조사한 결과, 동진벼의 경우 감염 부위에서 제한적 세포사멸이 관찰되고 저항성 표현형임을 확인한 반면, 낙동벼의 경우 감염 부위 세포사멸이 증가하고 주변 조직도 노랗게 변하는 감수성 표현형임을 확인하였다(도 10). 따라서 본 발명에서 낙동벼를 선택하여 벼 형질전환체를 제조하는데 이용하였다. GFP 유전자 발현 억제에 대한 효율성을 검증한 amiRNA_GFP 및 dsRNAi_GFP 벡터를 아그로박테리움에 도입하여 낙동벼에서 유기한 배발생 캘러스(embryogenic callus)에 형질전환시켰다. 하이그로마이신 함유 배지에서 선발된 하이그로마이신 저항성 캘러스에서 어린싹(shoot)을 재분화하여 발근배지(rooting medium)에서 배양하였다(도 11). 대조군(vector control, VC), amiRNA_GFP 및 dsRNAi_GFP 벼 형질전환체에 대해서 각각 30개씩의 T₀ 계통들을 확보하였다. 재분화된 T₀ 식물체들에서 GFP 유전자들을 타겟으로 하는 small RNA의 발현을 RT-PCR을 통해서 확인하였다. 대조군(VC), amiRNA_GFP 및 dsRNAi_GFP 벼 형질전환체들의 잎으로부터 전체 RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후에 amiRNA_GFP 식물체에서 발현되는 amiRNA의 전구체 및 dsRNAi_GFP 식물체에서 발현되는 GFP 유전자 특이적인 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 하이그로마이신에 의해서 선발된 대부분의 T₀ 형질전환체들은 amiRNA_GFP 및 dsRNAi_GFP 및 dsRNAi_GFP 유전자들을 안정적으로 발현함을 확인하였다(도 12A,B). 또한 형질전환 벼에서 생산된 small RNA의 발현을 small RNA 노던 블로팅을 통해서 확인하였다(도 12C). 항생제와 RT-PCR 및 small RNA 노던 블로팅을 통해서 선발된 T₀ 형질전환체는 온실에서 순화시킨 후에 포장에 정식하여 T₁ 세대의 종자를 확보하였다. 종자를 확보한 형질전환체의 계통은 표 1와 같다.

표 1

[0023] AmiRNA_GFP 및 dsRNAi_GFP 벼 형질전환체(T₁ line)

Rice Transgenic Plant	T ₀ line	T ₁ lines
-----------------------	---------------------	----------------------

35S::amiRNA_GFP	1	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6	1-7	1-8	1-9			
	2	2-1	2-2	2-3	2-4								
	3	3-1	3-2	3-3	3-4								
	4	4-1	4-2	4-3	4-4								
	5	5-1	5-2	5-3	5-4								
	6	6-1	6-2	6-3	6-4								
	7	7-1	7-2	7-3	7-4								
	8	8-1	8-2	8-3	8-4	8-5	8-6	8-7	8-8				
	9	9-1	9-2	9-3	9-4								
	10	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7					
	11	11-1	11-2	11-3	11-4								
	12	12-1	12-2	12-3	12-4								
	13	13-1	13-2	13-3	13-4	13-5	13-6	13-7	13-8	13-9	13-10	13-11	13-12
	15	15-1	15-2	15-3	15-4								
	20	20-1	20-2	20-3	20-4	20-5	20-6	20-7					
	21	21-1	21-2	21-3	21-4	21-5	21-6						
	24	24-1	24-2	24-3	24-4	24-5	24-6	24-7					
	25	25-1	25-2	25-3	25-4								
	26	26-1	26-2	26-3	26-4	26-5	26-6	26-7	26-8				
	27	27-1	27-2	27-3	27-4								
35S::dsRNA_GFP	3	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5							
	4	4-1	4-2	4-3	4-4								
	5	5-1	5-2	5-3	5-4								
	6	6-1	6-2	6-3	6-4								
	7	7-1	7-2	7-3	7-4								
	10	10-1	10-2	10-3	10-4								
	12	12-1	12-2	12-3	12-4								
	14	14-1	14-2	14-3	14-4								
pSambia1300_VC	6	6-1	6-2	6-3	6-4								

[0024] 수확한 대조군(VC), amiRNA_GFP 및 dsRNAi_GFP 벼 형질전환체들의 T₁ 종자들을 하이그로마이신 함유 배지에서 선발하고, amiRNAi_GFP(214 T₁ plants) 및 dsRNAi_GFP (30 T₁ plants) 및 dsRNAi_GFP(30 T₁ plants) 벼 형질전환체들의 잎으로부터 전체 RNA를 추출하였다.

[0025] **실시예 5: 벼 도열병 병원성 관련 타겟 유전자 선발 및 유전자 클로닝**

[0026] 벼 도열병 곰팡이의 *MgAPT2*와 *LHS1* 유전자는 그 기능이 소실되었을 때 벼에 대한 감염성이 크게 저하되는 것으로 알려져 있다. 반면 *RGS1* 유전자의 발현이 없어진 돌연변이 곰팡이는 벼에 감염되었을 때 야생형 곰팡이에 비해 더 많은 분생자(conidia)와 호스테리움을 형성하는 것으로 보고되었다. 기존에 알려진 결과를 통하여 small RNA의 타겟으로 벼 도열병 병원성 관련 유전자들을 선발하였다(표 2).

표 2

[0027] 벼 도열병 곰팡이의 병원성관련 주요 유전자

Gene	GeneBank ID	Fuction	Reference
<i>LHS1</i>	MGG_06648	ER chaperone function in protein secretion	Plant Cell, 2009, 21:681-695
<i>MgAPT2</i>	MGG_02767	Golgi-localized P-type ATPase (secretion via exocytic pathway)	Nature, 2006, 440:535-539
<i>RGS1</i>	MGG_14517	Hyperinduction of conidia and appressorium	EMBO J, 2007, 26:630-700

[0028] *MgAPT2*, *LHS1* 및 *RGS1* 유전자의 cDNA 염기서열을 검색(NCBI search)을 통해 확보하고, 이를 바탕으로 각 유전자 특이적 프라이머를 제조하였고, 벼 도열병 곰팡이에서 추출한 전체 RNA를 가지고 RT-PCR 수행한 후 곰팡이 유전자를 클로닝하였다. 이 유전자를 이용하여, dsRNAi 및 amiRNA 벡터를 제조하고 이들을 애기장대 식물체에

형질전환하여 곰팡이 감염 시킨 후 대조군 식물체와 비교해서 형질전환체에서의 곰팡이 생육을 비교함으로써 small RNA를 이용한 새로운 개념의 곰팡이 저항성 작물 개발에 활용할 수 있다.

[0029] **실험예 1: 일과성 검정을 통한 유전자발현 억제 시스템의 효율 비교**

[0030] 본 발명의 실시예에 따른 amiRNA 및 dsRNAi 벡터의 GFP 유전자 발현 억제에 있어 amiRNA와 dsRNAi_GFP 간의 효율성을 비교하기 위하여, *Benthamiana* 담배를 이용하여 일과성 검정(Transient assay)를 수행하였다. amiRNA와 dsRNAi_GFP 그리고 empty(GV3101) vector를 각각 아그로박테리움에 형질전환 후 GFP를 발현하는 pK7FW2GW2GW7 벡터를 포함한 아그로박테리움과 섞어서 담배 잎에 주사기를 이용하여 침투(infiltration)시켰다. 균일하게 침투됨을 확인하기 위하여 35S:NLS::RFP vector를 형질전환한 아그로박테리움을 섞어 사용하였다(도 13A). 대조군(VC)에 비해 amiRNA_GFP를 발현시킨 군에서 GFP의 발현이 감소하였고 dsRNAi를 발현시킨 군에서 GFP의 발현이 거의 보이지 않을 정도로 감소됨을 확인하였다(도 13B). 이 결과로 amiRNA 시스템이 타겟 유전자에 대한 특이성이 높은 점과 타겟 유전자의 발현 억제 효율은 dsRNAi 시스템이 높음을 확인하였다.

[0031] **실험예 2: 애기장대 형질전환체 KJ201_GFP 유전자 발현억제 조사**

[0032] small RNA 노던 블로팅을 통하여 선발된 amiRNA_GFP 애기장대 형질전환체를 이용하여 곰팡이 GFP 유전자의 발현 억제 여부를 조사하였다. 야생형 (Col-0) 식물체와 amiRNA_GFP 애기장대 형질전환체를 토양에서 키운 다음 GFP를 발현하는 곰팡이(KJ201_GFP)로부터 분리한 포자를 각각의 식물체에 균일하게 적하(dropping, 5×10^5 spores/ml) 하여 접종하고, 그 후 하루 간격으로 형광현미경을 통해 곰팡이의 GFP 발현 양상을 조사하였다. 도 14는 곰팡이 접종 2일 째에 관찰한 모습이며, 이때 곰팡이 포자로부터 호스테리움(haustorium, appressorium)이 형성되고 침입관(penetration peg)을 통한 식물세포에 감염이 일어나는 과정이다. GFP 유전자에 대한 small RNA를 강하게 발현하는 계통들(#39, #47)에서 야생형에 비하여 GFP가 발현되는 호스테리움의 수가 현저히 줄어들음을 확인할 수 있었다. 또한 GFP 유전자에 대한 small RNA 발현이 낮은 계통(#49)에서는 GFP를 발현하는 호스테리움의 수에는 야생형과 거의 차이가 없지만 GFP 발현 정도는 상대적으로 약해진 것을 알 수 있었다(도 14). 또한 small RNA 노던 블로팅을 통하여 최종 선발된 dsRNAi_GFP 애기장대 형질전환체를 토양에서 키운 후 GFP를 발현하는 곰팡이(KJ201_GFP)로부터 분리한 포자를 각각의 식물체에 균일하게 적하하여 접종하였다. 곰팡이 접종 후 하루 간격으로 4일 동안 곰팡이의 발현 양상을 조사하였다(도 15-18). 대조군(VC)에 비하여 dsRNAi_GFP 형질전환체에서 GFP 발현 곰팡이의 호스테리움의 수가 감소하였고, 감염 후 3일째부터, 현저히 줄어들음을 확인할 수 있었다. 벼 도열병 곰팡이(*M. grisea*)가 식물체에 감염되는 과정은, 먼저 곰팡이의 포자가 식물체 표면에 부착되고 나면 발아하여 부착기관 호스테리움을 형성한다. 감염 후 20-28시간이 지나면, 이 호스테리움으로부터 침입관이 형성되어 식물세포에 침투하게 되면 일차균사(primary hyphae, PH)가 형성되고 이를 통하여 성공적인 감염을 위해 필요한 여러 가지 곰팡이 단백질이 식물세포로 분비되게 된다. 감염 후 2-6일 동안 곰팡이의 여러 단백질들이 식물세포로 분비되게 되며 이 감염과정이 성공적으로 이루어지게 되면 식물세포 내에 균사가 형성되어 곰팡이가 식물 세포 내에서 성공적으로 증식하게 되며 결국 식물세포는 죽게 된다. 곰팡이 감염 후 2일째부터 형질전환체에서 GFP 발현이 줄어드는 결과로 보아, 곰팡이의 호스테리움으로부터 침입관이 형성되어 식물세포에 침투하여 일차균사가 형성되어 곰팡이 단백질들이 식물세포로 분비되는 단계에서 식물세포에서 만들어진 small RNA 분자들이 곰팡이 세포로 이동되는 것으로 추정된다. 이 결과는 곰팡이가 식물세포에 감염되는 과정에서 곰팡이 세포에서 합성된 단백질들이 식물세포로 이동되어 병을 일으키게 하는 한 방향으로의 물질 이동뿐 만 아니라, 식물세포에서 합성된 물질들도 곰팡이 세포로 이동할 수 있는 쌍방향 물질이동이 일어남을 보여준다.

[0033] **실험예 3: 애기장대 형질전환체 KJ201_GFP 유전자 발현억제 효율검증**

[0034] 정량적인 분석을 위하여 야생형과 amiRNA_GFP 애기장대 형질전환체 표면에 형성된 전체 호스테리움과 GFP 발현 호스테리움을 계수하였다. 빨간색 원은 식물체 표면에 형성된 호스테리움을 나타내고 파란색 화살표는 GFP발현 호스테리움의 비율(%)을 표시하였다(도 20A). GFP 유전자에 대한 small RNA를 강하게 발현하는 계통에서(Col-0; 93.5%, #39; 16.66%, #47; 19.35%) 야생형에 비하여 GFP가 발현되는 호스테리움의 수가 현저히 감소하였다. 반면 GFP 유전자에 대한 small RNA 발현이 낮은 계통에서(Col-0; 93.5%, #49; 85%) GFP 발현 호스테리움의 수가 야생형과 유사하였다(도 20B). dsRNAi_GFP 애기장대 형질전환체에 감염된 곰팡이 유전자의 발현 감소를 정량적으로 나타내기 위하여 곰팡이 감염 후 4일 된(감염 후 90시간 경과) 대조군 식물체(VC)와 형질전환 식물체 잎 표면에 형성된 곰팡이의 호스테리움을 light field에서 촬영하고 같은 부위를 GFP 필터를 이용해 GFP를 발현하는 곰팡이의 호스테리움을 촬영하였다. 이 두 가지 사진을 병합(merge)시킨 후, 전체 호스테리움 숫자와 GFP 발현하는 호스테리움을 계수하였다. 빨간색 원은 식물체 표면에 형성된 전체 호스테리움을 나타내고 노란색 화살표는 GFP가 발현되지 않은 호스테리움을 표시하였다(도 19A). 또한 전체 호스테리움의 수에서 GFP가 발현되는

호스테리움이 차지하는 비율(%)을 계산하였다. 도 19B와 표 3에서 나타난 바와 같이 dsRNAi_GFP 형질전환체들에서 VC에 비하여 GFP가 발현되는 호스테리움의 수에서 GFP가 발현되는 호스테리움이 차지하는 비율(%)을 계산하였다. 도 19B와 표 1에서 나타난 바와 같이 dsRNAi_GFP 형질전환체에서 대조군(VC)에 비하여 GFP가 발현되는 호스테리움의 수가 현저히 감소함을 확인하였다.

표 3

[0035] dsRNAi_GFP 형질전환 애기장대를 이용한 곰팡이 GFP 유전자 발현억제 효율

	No. of Total AP	GFP(+)	GFP(-)	% of GFP(+)	STD
VC	544	487	57	89.522	1.354
dsRNAi_GFP #2	218	13	205	5.963	2.944
dsRNAi_GFP #19	367	37	331	10.082	6.190
dsRNAi_GFP #31	295	26	259	8.814	5.192

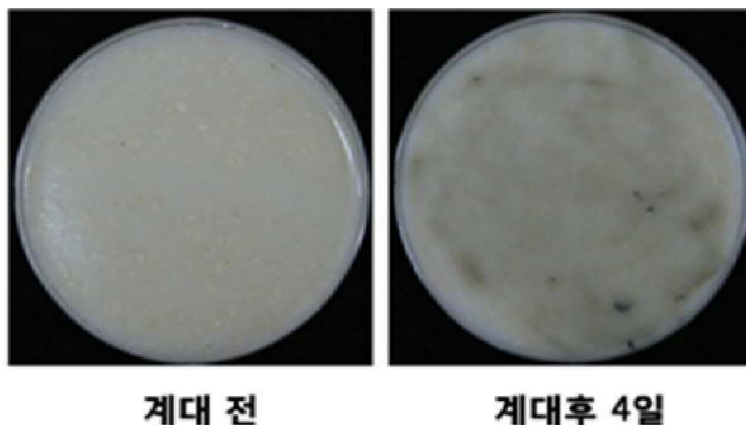
[0036] AP, 부착기(appressorium); GFP(+), GFP를 발현하는 부착기의 수; GFP(-), GFP를 발현하지 않는 부착기의 수; % of GFP(+)=GFP(+)/(No. of Total AP)x100; STD, 표준편차

[0037] GFP유전자를 표적으로 하는 small RNA를 발현하는 형질전환 애기장대 식물체(35S::amiRNA_GFP 및 35S::dsRNAi_GFP)들에 GFP 발현 형광곰팡이를 접종하였을 때 곰팡이의 GFP 발현이 대조군 식물체에 비해 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과로 식물 세포에 생성된 miRNA 및 siRNA들이 효율적으로 곰팡이 세포로의 세포간 이동이 가능함을 확인하였고 siRNA(small interfering RNA)를 생성하는 35S::dsRNAi_GFP 식물체에서의 곰팡이 GFP 발현 억제 정도는 대조군에 비해 높음을 알 수 있었다(도 19).

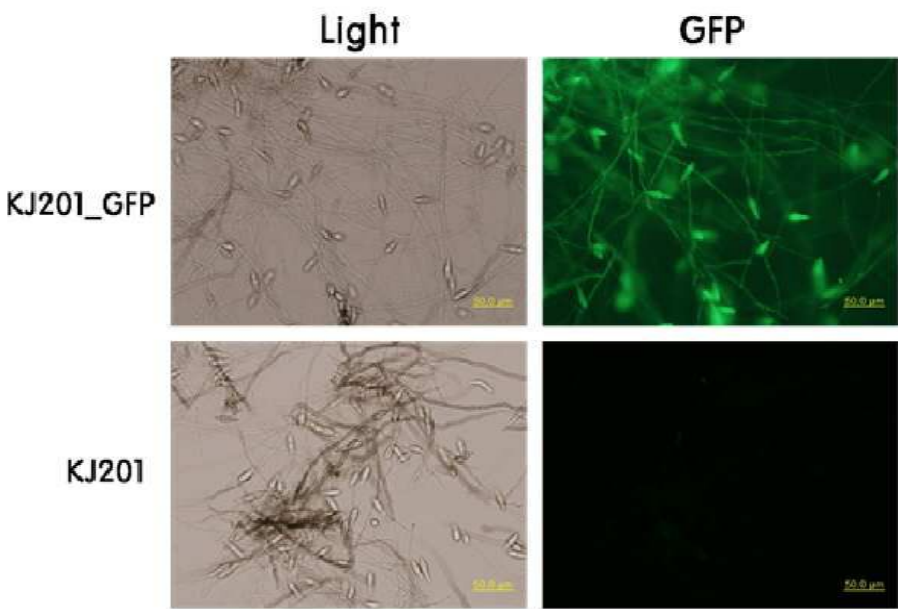
[0038] miRNA를 생성하는 35S::amiRNA_GFP 애기장대 식물체 보다 siRNA를 생성하는 35S::dsRNAi_GFP 식물체들에서 곰팡이 GFP 발현이 더 효율적으로 억제되는 결과는 기존에 보고와 일치하였다. 즉, amiRNA는 타겟 유전자에 대해 mRNA의 특정한 한 부위에 결합하여 GFP mRNA를 분해하는 반면에 dsRNAi 벡터에 의해서 만들어지는 siRNA는 불특정 다수 부위에 결합하여 GFP mRNA를 분해하기 때문이다. 또한 siRNA의 경우에는 2차 증폭(secondary amplification)과정을 통해서 식물세포 내에서 dsRNAi가 재생산되기 때문에 더 효과적으로 표적 유전의 mRNA를 분해하는 것으로 사료된다.

도면

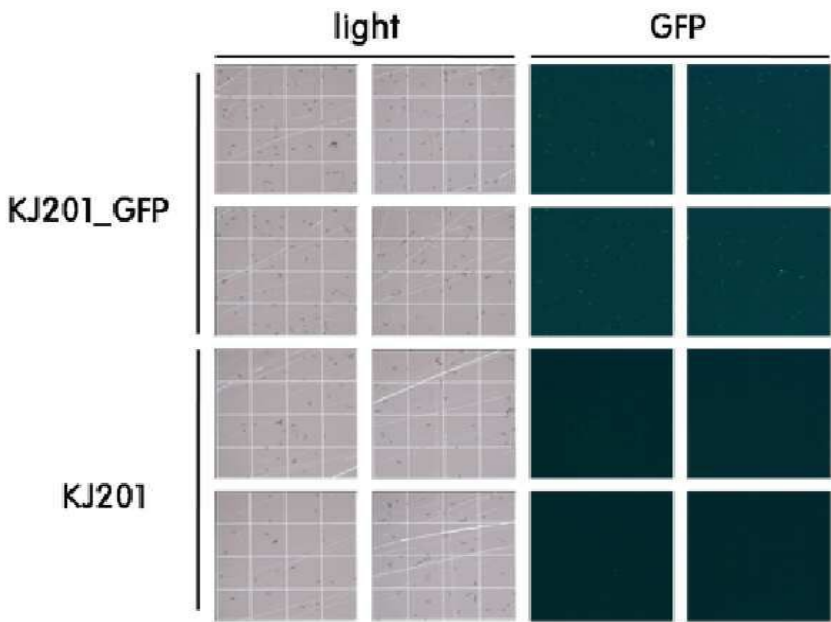
도면1



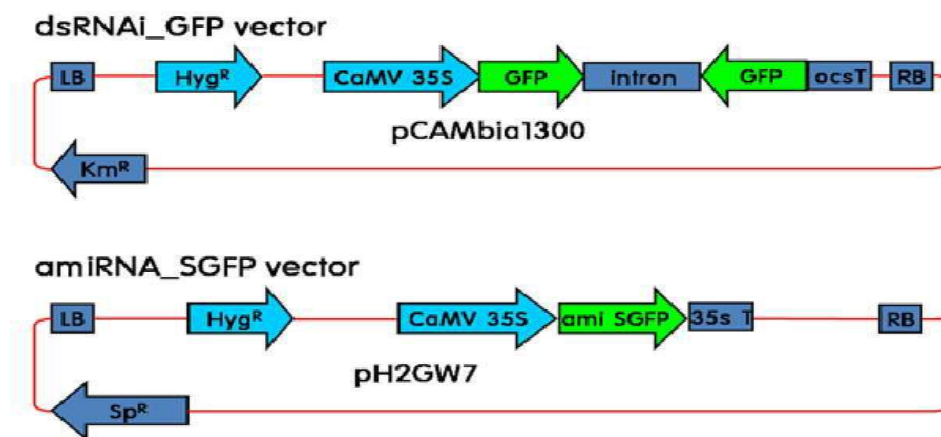
도면2



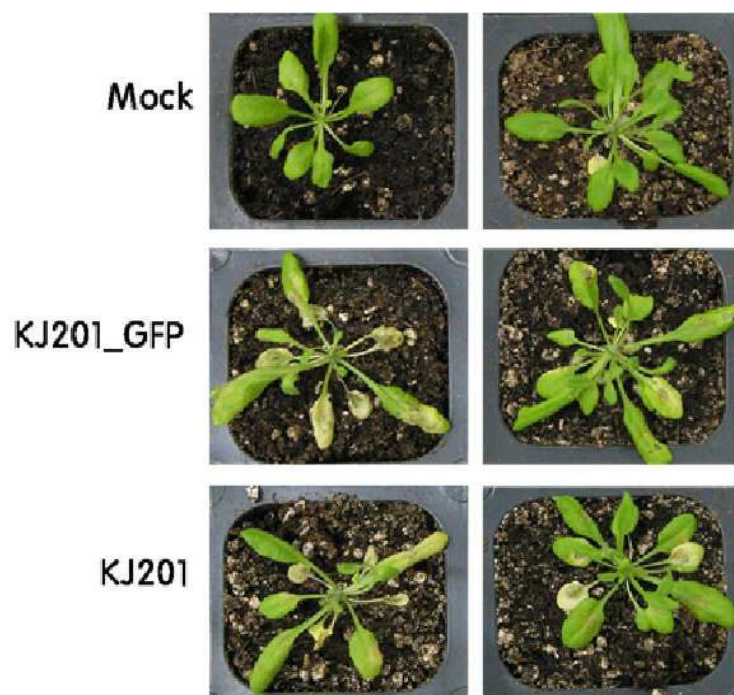
도면3



도면4



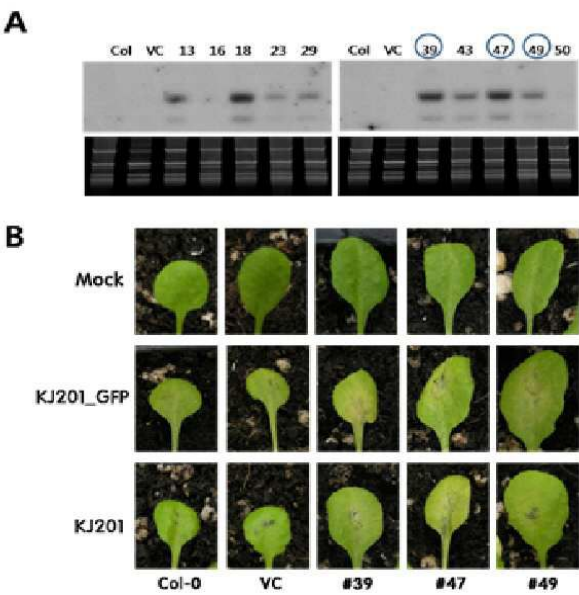
도면5



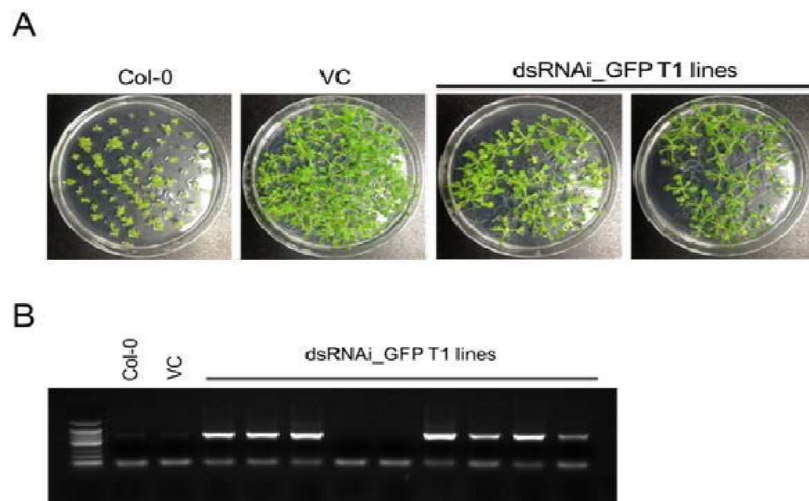
도면6



도면7



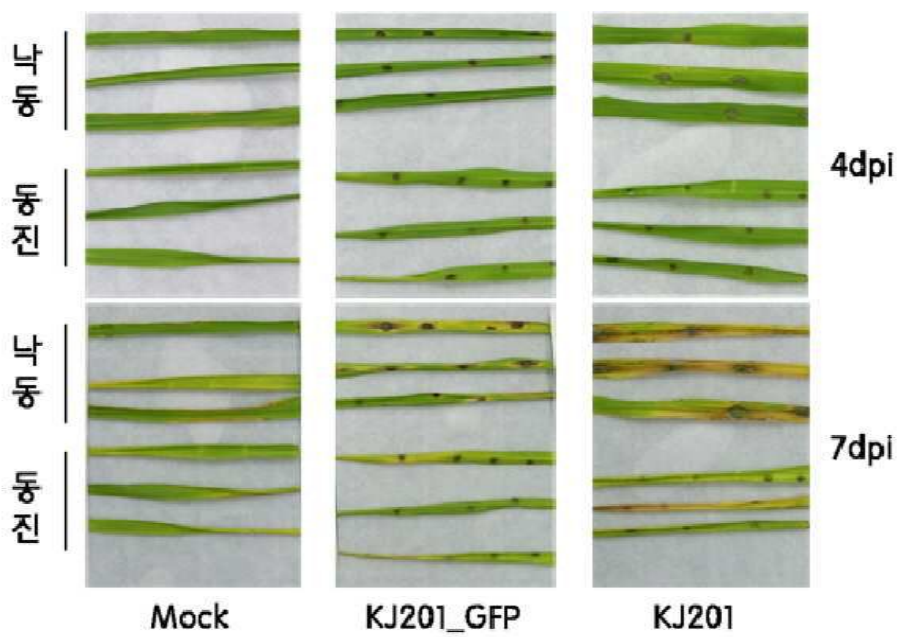
도면8



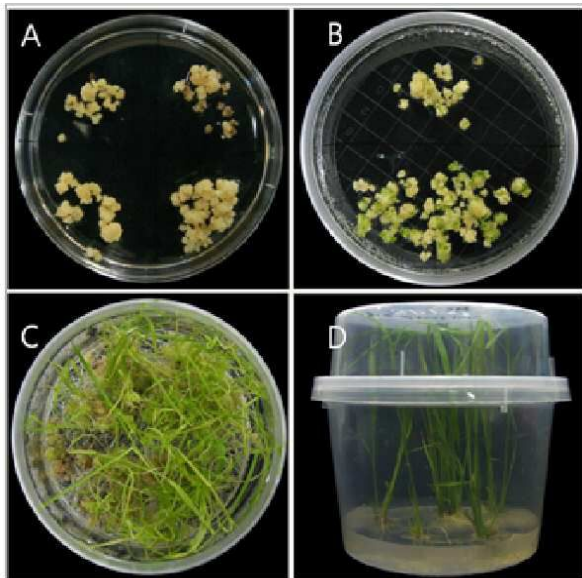
도면9



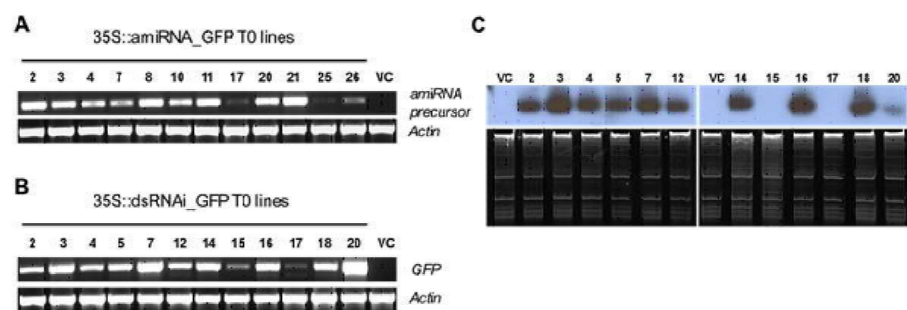
도면10



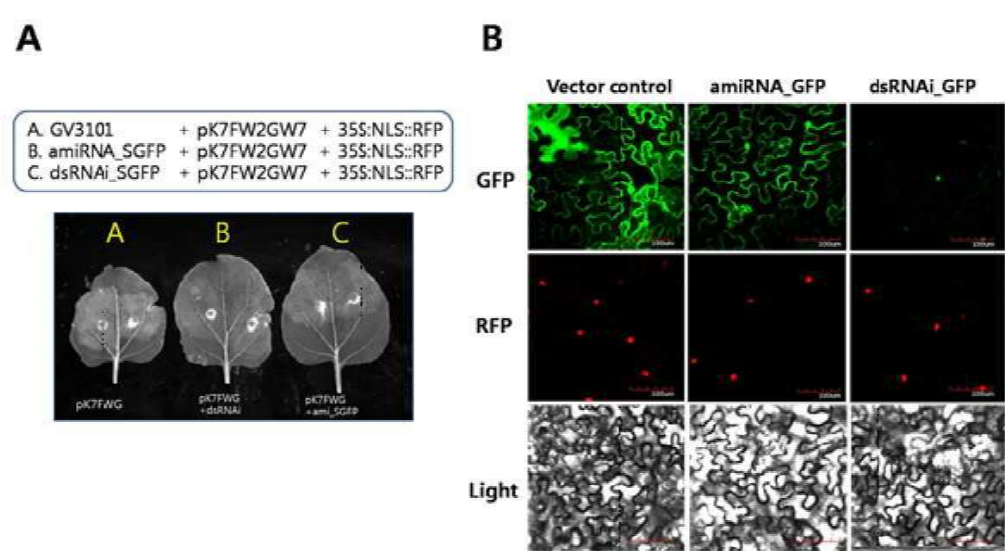
도면11



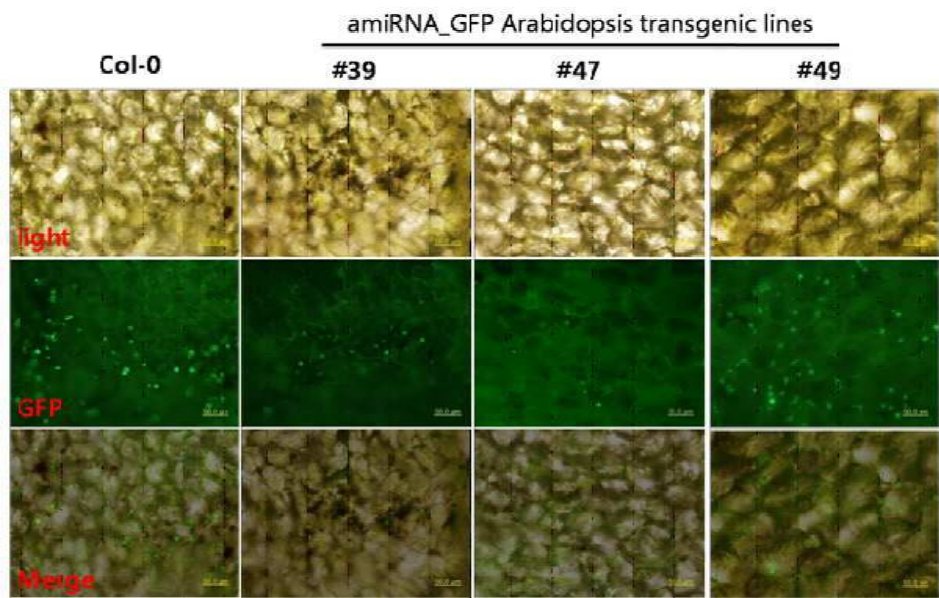
도면12



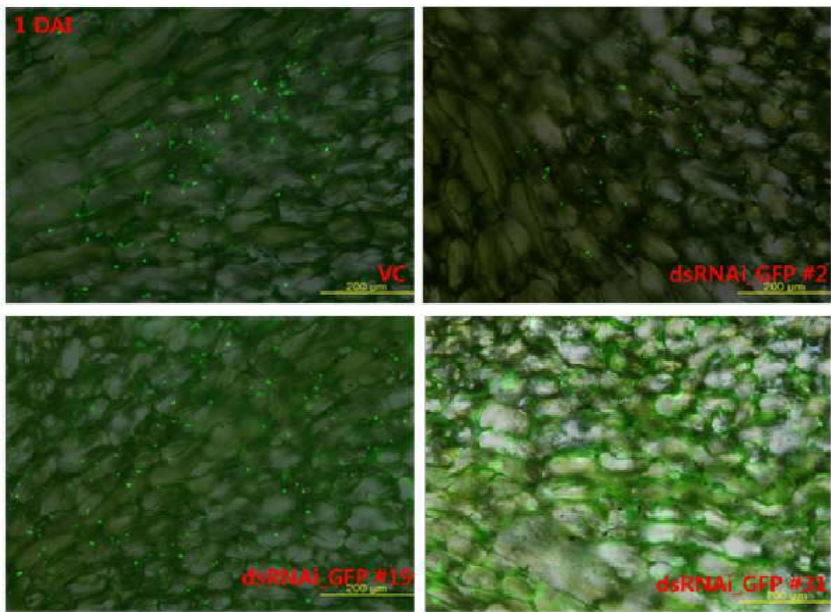
도면13



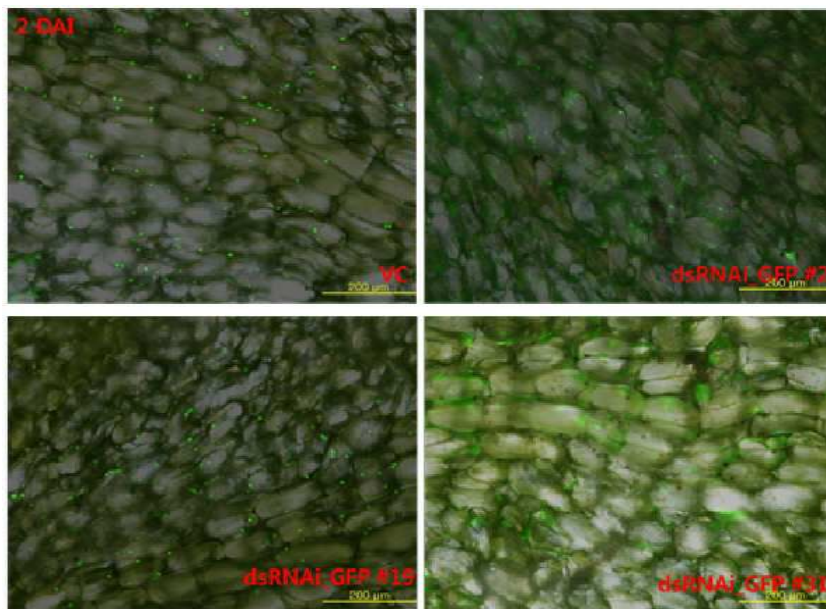
도면14



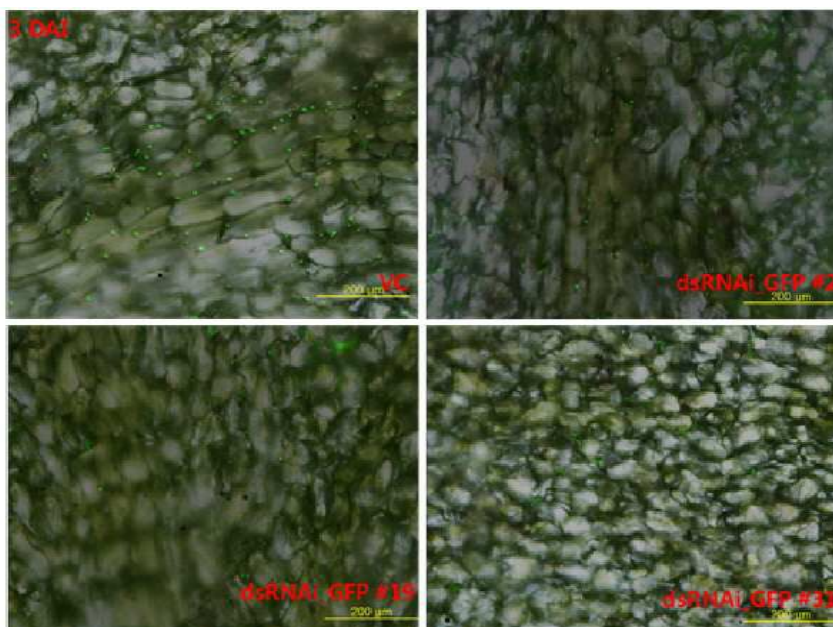
도면15



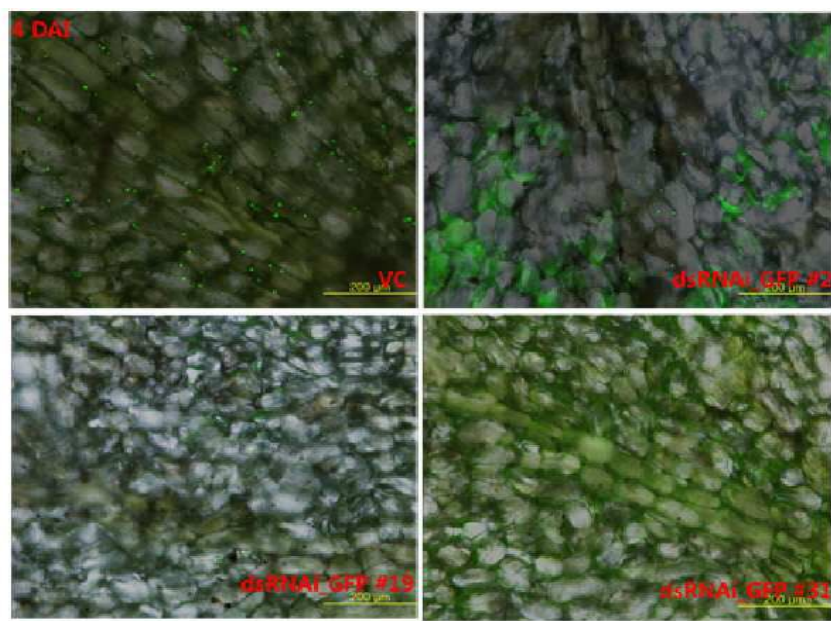
도면16



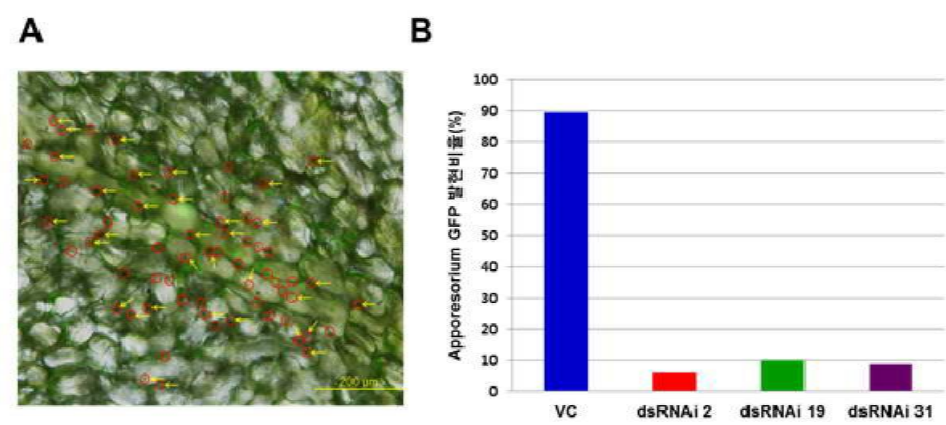
도면17



도면18



도면19



도면20

