



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0042299
(43) 공개일자 2014년04월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-0108871
(22) 출원일자 2012년09월28일
심사청구일자 2012년09월28일
- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울시 성북구 안암로 145 (안암동)
- (72) 발명자
황병국
서울특별시 강남구 역삼로 315-1 개나리 SK VIEW
아파트 503동 703호
김대성
광주 동구 중앙로290번길 20, (계림동)
- (74) 대리인
특허법인이지

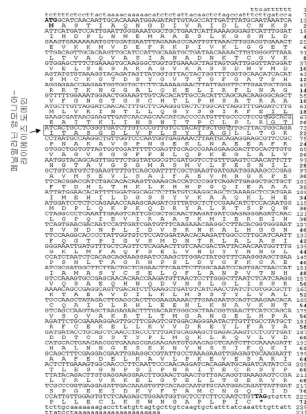
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 병저항성 관련 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 유전자 씨에이피에이엘1 및 이를 이용한 형질 전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 식물병 저항성 관련 유전자로서 고추 유래 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈를 코딩하는 분리된 유전자 (CaPAL1) 및 이를 이용한 형질전환체에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면 CaPAL1은 병 저항성 식물체의 육종을 위한 재료로서 제공되어 질 수 있어 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008027

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 고추에서 병저항성관련유전자의 분리와 기능분석

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

식물병 저항성 관련 유전자로서 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈를 코딩하는 하기 (a) 또는 (b)의 분리된 유전자(*CaPAL1*):

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

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(*CaPAL1*).

청구항 3

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항 기재의 유전자 또는 제3항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 5

병원균 접종 후 식물체로부터 mRNA를 분리하여 제1항 기재의 *CaPAL1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병 저항성 탐색방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 병저항성 관련 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 유전자 씨에이피에이엘1 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 고추 (*Capsicum annuum* L.) 식물로부터 분리된 신규 식물병 저항성 관련 유전자인 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 유전자 (*CaPAL1*: *Capsicum annuum* Phenylalanine Ammonia-Lyase 1) 및 이를 이용한 병저항성 탐색방법과 병 저항성 형질전환 식물체 제작에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 식물의 병 저항성반응에 대한 연구는 생체 내 신호전달 기작을 규명하는 과학적 가치를 지닌다. 또한 식물병 방어관련 유전자의 정보는 작물의 병저항성 증대를 위한 분자적 유전육종의 직접적 재료로서 제공될 수 있다.
- [0003] 환경친화적 식량생산을 증진하기 위하여 병방어 관련 다양한 유전자를 이용한 작물 육종은 경제적으로 중요한 병원체, 잡초, 그리고 환경적 스트레스에 의한 손실을 최소화함으로써 식량생산비용을 줄일 수 있으며, 고품질의 식량을 제공하여 농산물의 경쟁력회복에 기여함과 동시에 신품종의 개발과 연관된 다양한 산업의 활성화에 기여한다.
- [0004] 우리나라에서 집약적으로 재배되고 주요 경제 작물로서 고추 (*Capsicum annuum* L.)의 식물병 방제는 그 중요성이 지대하고, 또한 식물병에 대한 방어의 신호전달경로를 연구하기 위한 훌륭한 실험시스템을 제공해 주고 있다. 고추 세균성점무늬병원균과 고추와의 상호작용에서 방어반응에 관여하는 유전자의 분리와 기능 분석은 고추의 병방어 반응 경로뿐 아니라 모델 식물인 애기장대에서의 과발현을 통해 식물 병방어 반응에 대한 과학적 이해를 증진시키고, 저항성관련 유전자를 고추식물에서 발현시킨 병저항성 형질전환식물의 개발을 위한 유전자원의 토대가 된다.
- [0005] 식물이 병원균에 감염되면, 기주식물은 이에 대항하기 위한 다양한 세포내 대사 시스템을 작동시켜 방어기작을 활성화한다. 이러한 방어기작은 병원체에 대한 기주세포의 인식을 시작으로, 세포내 Ca^{2+} , 활성산소의 증가, 칼로스 집적 (Callose deposition), 페놀 관련 항균성 물질인 2차 대사산물의 생성, 국부적 세포 사멸과 같은 과

민성 반응, 그리고 다양한 병방어 관련 단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 이러한 일련의 저항성 반응을 나타내기 위한 신호전달의 과정 중 특히 2차 대사산물의 생성은 페닐프로파노이드 경로 (Phenylpropanoid pathway)에 의해 이루어진다. 페닐프로파노이드 경로는 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 (Phenylalanine ammonia-lyase) 효소에 의해 페닐알라닌 (Phenylalanine)이 시나메이트 (Cinnamate)로 변환되는 촉매작용을 통해 시작되며, 일련의 하위 과정을 거쳐 안토시아닌 (Anthocyanin) 등의 2차 대사산물이 생성된다.

[0007] 본 발명의 배경 기술로, 대한민국 등록특허공보 10-0982824 (2010.09.16)에는 송이버섯의 페닐알라닌 암모니아 리아제 유전자 및 신나모일-코에이 리덕타제 유전자에 관한 것으로, 상기의 유전자는 송이버섯 (*Tricholoma matsutake*)의 향기의 주성분으로 알려진 신남산메틸 (methylcinnamate) 생성에 관여하는 것이라고 기재되어 있다. 또한, NCBI Accession no. M83314.1(2010.05.27)에는 토마토 페닐알라닌 암모니아 라이에이즈 유전자, 및 프로모터 부분 등에 대해 개시되어 있다.

[0008] 그러나 현재 고추 식물에서 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈에 대한 기능 연구와 병 저항성에서의 역할에 대해서는 규명된 바가 없다. 세포내에서 2차 대사산물 생성 과정에서 중요한 역할을 통해 식물 생장뿐 아니라 외부 스트레스에 대한 식물 면역반응에 관여하는 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈에 관한 연구는 그 중요성이 크기 때문에, 이에 대한 연구와 이 기능을 밝혀내는 것은 고추식물의 병저항성 기작을 이해하는데 필요하고, 나아가 병저항성 형질전환 식물체 제작을 위한 주요한 유전자원으로 이용될 수 있을 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 10-0982824(2010.09.16)

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) NCBI Accession no. M83314.1(2010.05.27)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로 식물병 저항성 관련 유전자의 하나인 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 (*CaPAL1: Capsicum annuum Phenylalanine Ammonia-Lyase 1*) 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 *CaPAL1* 유전자를 이용하여 식물병에 대한 저항성 존재 여부를 탐색하는 식물체의 저항성 탐색방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0013] 더 나아가, 본 발명은 이 유전자를 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제작하는데 그 목적이 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 식물병 저항성 관련 유전자로서 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈를 코딩하는 (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자 *CaPAL1* 또는 (b) 서열번호 1의 염기 서열을 갖는 유전자 *CaPAL1*를 제공한다.

- [0016] 나아가, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질 CaPAL1을 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질 전환 식물체를 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 병원균 접종 후 식물체로부터 mRNA를 분리하여 상기 *CaPAL1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병 저항성 탐색방법을 제공한다.
- [0020] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0021] 본 발명의 목적은, 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 과민성 세포사멸을 수반하는 비병원성 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strain Bv5-4a)을 접종한 후, 과민성 세포사멸을 일으킨 고추 잎으로부터 분리한 신규 저항성 관련 유전자 *CaPAL1*을 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 고추식물의 조직별 *CaPAL1*의 발현을 탐색하고, 병원균 처리를 통한 *CaPAL1*의 발현 여부를 조사하고, VIGS를 통한 *CaPAL1*의 유전자가 억제된 고추식물과 이 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaPAL1* 유전자의 식물병 저항성 유도 기능을 확인하여 달성하였다.
- [0022] 먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균의 비병원성균주 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광 고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 이로부터 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 mRNA를 디옥시제닌 (Digoxigenin)으로 표지하여 프로브를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용 디퍼런셜 하이브리다이제이션 (Differential hybridization)을 수행하여 병저항성에 관련된 것으로 추정되는 클론을 선별하여, 유전자의 염기서열을 해독한 이후, *CaPAL1*로 명명된 고추 녹광 품종의 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 코딩 유전자 염기서열 (서열번호 1) 및 그에 따른 아미노산 서열 (서열번호 2)을 제공한다 (도 1 참조).
- [0023] *CaPAL1* cDNA의 코딩 리전 (Coding region, ORF)은 717개의 아미노산을 암호화하는 2318개의 염기서열로 이루어져 있고, *CaPAL1* 단백질 서열의 중앙 (아미노산 서열 199-215번)에 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 도메인을 갖는 것이 확인되었다. 확인된 *CaPAL1*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내고, 다른 작물 (토마토, 포테이토, 타바코, 이포모에아) 과 *CaPAL1* 과의 아미노산 서열 상동성을 도 2에 나타냈다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터가 도입된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0025] 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 상기 재조합 벡터는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 pBIN35S:*CaPAL1*, 또는 pTRV2:*CaPAL1*이다. 상기 재조합벡터 pTRV2:*CaPAL1*은 상기 유전자(*CaPAL1*)를 바이러스-유도 유전자 사일런싱(virus-induced gene silencing, VIGS)을 위한 벡터인 TRV2(Tobacco Rattle Virus 2) 벡터(참고문헌: Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2:109-113)에 삽입시켜 제조하여 그 효과를 확인하였다(도 4 ~ 도 6 참조). 상기 재조합 벡터 pBIN35S:*CaPAL1*를 이용하여 형질전환 식물을 제작하고 유전자가 발현되는 것을 확인하였다(도 7 참조).
- [0026] 또한, 본 발명은 상기의 *CaPAL1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 고추식물에서 특이적으로 *CaPAL1* 유전자가 억제된 식물체의 제작, *CaPAL1* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성 생성여부를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체의 제작방법 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다. 보다 구체적으로 본 발명은 *CaPAL1* 유전자의 발현을 억제하는 VIGS 식물체 제작 (도 4 - 도 6 참조), *CaPAL1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 (pBIN35S:*CaPAL1*)와 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물에서의 형질전환 발현을 통한 *CaPAL1* 유전자의 식물체 병저항성 활성화 기능을 확인하고(도 7 - 도 10 참조) 이를 통한 병 저항성 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 식물세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/

폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법 (Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.

[0028] 다음에, 본 발명은 식물체의 각 기관 (잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 파랑 열매, 빨강 열매)으로부터 RNA를 분리하고, 식물의 엽면에 병원균 처리이후 RNA를 분리하여, *CaPAL1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병균의 병원성 또는 비병원성 세균 등 병원균을 예로 들 수 있다. 상기 *CaPAL1* 유전자의 발현 여부 확인은 노던 블롯, 실시간 RT-PCR 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 사용될 수 있다. 바람직하게 본 발명은 식물체의 병저항성 탐색 방법에 있어서, 병원균을 접종한 식물 잎에서 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시키고, ³²P-dCTP로 처리한 본 발명의 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공한다. 본 발명에 의한 *CaPAL1* 유전자가 식물병원균에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다 (도 3 참조). 따라서 본 발명에 의한 *CaPAL1* 유전자는 식물체의 저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명이 완성됨으로써, 고추 식물 세균병인 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자인 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 *CaPAL1* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공함과 동시에, 이 유전자를 이용하여 식물병 저항성 탐색방법을 제공할 뿐 아니라 저항성 식물 육종 및 형질전환 식물체 제작에 기여하는 효과를 도모할 수 있게 되었다.

[0030] 아울러 본 발명에 의한 *CaPAL1* 유전자 억제를 통한 저항성 감소를 확인하고, 상기 유전자를 애기장대에 과발현시켜 식물병 저항성을 확인함으로써 본 발명에 의한 *CaPAL1*은 병 저항성 식물체의 육종을 위한 재료로서 제공되어 질 수 있다.

[0031] 이러한 본 발명은 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있는 효과가 있으므로 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* L. cm. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 유전자 (*CaPAL1*: *Capsicum annuum* Phenylalanine Ammonia-Lyase 1)의 염기서열 및 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,

도 2는 본 발명에 의한 고추 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈의 아미노산 서열 및 다른 식물의 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈의 아미노산 염기서열을 비교한 도면이고,

도 3은 고추 식물의 조직별 *CaPAL1* 유전자의 발현을 확인한 결과(상부 도면)와, 고추녹광품종에 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 및 비병원성 균주를 접종하였을 때, 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 *CaPAL1* 유전자의 발현 결과(하부 도면)를 나타낸 도면이고,

도 4는 재조합벡터 pTRV:*CaPAL1*을 제작하고 이를 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 균주에 도입한 후 이것을 고추 식물이 떡잎 시기일 때 접종하여 제작한 *CaPAL1* 유전자 사일런싱 식물에, 세균성 점무늬 병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 접종 잎의 병징을 관찰하고(도 4 상단 좌측 도면), 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하고 (도 4 상단 우측 도면), 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 활성 (PAL

activity)을 측정한 (도 4의 하단 도면) 결과를 나타낸 도면이고,

도 5는 도 4에서 제조한 *CaPAL1* 유전자 사일런싱 식물에 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 방어 표지 유전자인 *CaPR1*의 상대적인 발현 양상을 검정한 결과를 나타낸 도면이고,

도 6은 도 4에서 제조한 *CaPAL1* 유전자 사일런싱 식물에 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 H_2O_2 의 축적과 이온전도도를 측정한 결과를 나타낸 도면이고,

도 7은 재조합벡터(pBIN35S:CaPAL1)를 통해 *CaPAL1* 유전자를 과발현시킨 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물 체에서 *CaPAL1*의 발현, 및 세균성 흑반병 병원균 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)의 병원성 및 비병원성 균주 접종으로 확인한 병저항성 변화를 나타낸 도면이고,

도 8은 도 7에서 제조한 *CaPAL1*이 과다 발현된 식물에 세균성 흑반병 병원균 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)의 병원성 및 비병원성 균주를 5×10^4 cfu ml⁻¹ 농도로 접종하고 식물체의 변화를 H_2O_2 의 축적과 이온전도도로 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 9는 도 7에서 제조한 *CaPAL1*이 과다 발현된 식물에 세균성 흑반병 병원균 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)의 병원성 및 비병원성 균주를 접종하고 병저항성 관련 유전자의 발현 차이를 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 10은 도 7에서 제조한 형질전환식물에 노균병균 하이알로페로노스포라 파라시티카 Noco2 (*Hyaloperonospora parasitica* Noco 2)를 접종한 후 병저항성의 변화를 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1] *CaPAL1* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정

[0035] 고추세균성점무늬병에 대한 병저항성 관련 단백질 중 하나인 고추식물의 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 (*CaPAL1: Capsicum annuum Phenylalanine Ammonia-Lyase 1*) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0036] [단계 1]

[0037] 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 15시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성세포사멸반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.

[0038] 다음에, 이 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 이용하여 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로부터 개개의 cDNA 클론을 제조하여 나이론막 (Hybond N+)에 일정하게 흡착시킨 후, 각각 고추세균성점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌 (Digoxigenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션 (Differential hybridization)을 수행하였다.

[0039] 하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주 접종된 식물체의 mRNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 유전자를 병저항성에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 수득하였다.

[0040] 수득된 클론들을 해독 (Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 *CaPAL1* 단백질 코딩 유전자를 확인하고 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 (*CaPAL1*) 유전자로 명명하였다. 확인된 *CaPAL1*의 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 도 1에 나타내었다.

[실시예 2] 병원균 접종 후 고추식물에서의 *CaPAL1* 유전자의 발현 탐색

- [0042] 상기 실시예 1에서 수득한 *CaPAL1* 유전자의 병저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.
- [0043] [단계 1]
- [0044] 먼저 저항성 탐색 방법을 구체적으로 제시하기 위하여 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬병 원균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10^8 cfu/의 농도로 6엽기의 고추 녹광 품종 5, 6엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 접종하고, 접종 후에는 28℃, 100% 상대습도 조건에서 15시간 동안 습실 처리 하였다. 접종 후 시간대별로 잎을 샘플링하여 RNA를 분리하고, 포름알데하이드 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N)으로 전이시켰다.
- [0045] 다음으로 실시예 1에서 수득된 *CaPAL1* 유전자에 클레나우 효소(Klenow enzyme)를 이용하여 동위원소가 붙은 α - 32 P[dCTP] 을 표지한 후 이를 반응액 [0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 텍스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65℃로 24 시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (Hybridization)을 실시하였다. 이렇게 동위원소가 표지된 상기의 DNA 프로브는 나이론막 (Hybond N+)에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 (Hybond N+) 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 동위원소가 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 발현 유무와 정도를 알아볼 수 있게 하였다.
- [0046] 이상의 실험결과를 도 3에 나타내었으며 실험의 결과 *CaPAL1* 유전자는 비병원성 고추세균성점무늬병 접종 후 5 시간 이후에 강하게 발현하였다.
- [0047] [실시예 3] *CaPAL1* 유전자 발현의 억제에 의한 병 저항성의 변화
- [0048] 고추식물에서 *CaPAL1* 유전자의 발현이 특이적으로 억제되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 붕괴 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaPAL1* 유전자를 바이러스 유도 유전자 사일런싱 (VIGS, virus-induced gene silencing)에서 이용되어지는 TRV (Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaPAL1* 유전자를 TRV2 벡터에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2:*CaPAL1*을 제조하였다.
- [0049] TRV2 vector는 제한효소 *EcoRI*로 자른 후 에탄올 침전 (ethanol precipitation)을 수행하고 살균수에 녹여 다시 DNA를 회수한 후에 alkaline phosphatase로 탈인산화시켰다. *CaPAL1*의 5'-비해석부위 (untranslated region)중 22개 뉴클레오타이드 (caaattcttcaatttcacgag; 서열번호 3) 부위 양쪽에 제한효소 *EcoRI* (GAATTC) 서열을 붙여 중합효소연쇄반응 (PCR)를 통해 증폭시켰다. PCR 반응조건은 94℃로 5분 후에 94℃ 1분, 52℃ 1분, 72℃ 30초를 25 반복하고 마지막으로 72℃에서 10분으로 하였다. Invitrogen에서 제공하는 pCR2.1-TOPO vector에 삽입시켰다. 이 TOPO vector를 제한효소 *EcoRI*로 자른 후 나온 절편을 ligase를 이용하여 TRV2 vector에 삽입하여 pTRV2:*CaPAL1* 재조합 벡터를 생성하였다. 유전자가 삽입되지 않은 공벡터인 TRV2는 대조구로 이용하였다(참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113).
- [0050] 이렇게 제조한 재조합벡터 TRV2:*CaPAL1*을 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법 (Electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 고추 유묘 (seedling)의 떡잎에 주사기를 이용, 엽육주사 (infiltration) 방법으로 접종하여 고추식물에 도입함으로써 *CaPAL1* 유전자의 발현의 억제를 유도시켰고, 유전자 발현 억제의 효과는 실시간 역전사효소 피씨알 (real-time RT-PCR)을 통하여 확인하였다 (도 5 참조)
- [0051] [단계 1]
- [0052] *CaPAL1*의 발현이 억제된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성의 변화를 알아보기 위하여, 상기의 *CaPAL1*의 유전자의 발현이 억제된 고추 식물과 대조구로서 TRV2:00 벡터를 접종한 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 10^7 과 10^8 cfu ml⁻¹의 농도로 접종한 후 접종 잎의 병징을 관찰하였고(도 4 상단 좌측 도면), 5×10^4 cfu ml⁻¹로 접종하여 접종 후 0,

3일에 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하였다 (도 4 상단 우측 도면). 그리고 병원균 10^7 cfu ml⁻¹ 로 접종하여 접종 이후 시간대 별로 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 활성 (PAL activity)을 측정하였다 (도 4의 하단 도면). 또한 병원균 10^7 cfu ml⁻¹ 농도로 접종후 12, 24시간 후에 실험구와 대조구의 감염 앞에서 RNA를 추출하여 실시간 알티-피시알 (real-time RT-PCR)을 통해 *CaPAL1* 의 특이적인 유전자 억제 효과와 함께 병 접종시 대조구 식물과 비교하여 병저항성 관련 유전자의 발현 차이를 관찰하였다 (도 5). 그리고 병원균 10^7 cfu ml⁻¹로 접종하여 접종 이후 시간대 별로 식물저항성 신호전달 관련 물질인 H₂O₂를 정량하고, 저항성 반응의 표현인 식물 조직의 세포사멸을 이온전도도 측정을 통해 정량화하였다 (도 6).

[0053] 도 4에서와 같이 실험결과 VIGS로 *CaPAL1* 의 발현이 억제된 식물에서 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 접종 후 병징을 관찰한 결과, 병원성 균주 접종시 대조구에 비하여 접종 후 7일 이후에 빠른 황화와 괴저 현상이 진전되는 것이 관찰되었고, 비병원성 균주 접종시 대조구 식물에서 2일째 국부적 저항성 반응으로 세포사멸이 나타나지만 *CaPAL1*의 발현이 억제된 식물에서는 국부적 세포사멸반응이 늦추어 짐을 확인하였다.

[0054] 그리고 도 4에서와 같이 감염조직에서 병원성 균과 비병원성 균의 세균 생장을 측정한 결과 대조구에 비교하여 *CaPAL1*의 발현이 억제된 식물에서 더 많은 세균생장을 나타냈다. 또한 대조구와 비교하여 *CaPAL1*의 발현이 억제된 식물에서 PAL activity 가 접종 후 12 시간 이후부터 감소하는 것으로 측정되었다.

[0055] 실시간 알티-피시알 시험 결과 도 5와 같이, *CaPAL1*이 억제된 식물에서 효과적으로 *CaPAL1* 유전자의 억제가 나타나는 것이 관찰되었고, 병원성 및 비병원성 균주 접종시 살리실산에 의존적인 대표적 저항성 관련 유전자인 *CaPR1* 유전자의 발현이 줄어든 것을 확인하였다.

[0056] 또한 도 6과 같이 대조구 식물에 비해 *CaPAL1*이 억제된 식물에서 H₂O₂의 축적과 이온전도도가 병원성, 비병원성 균주 모두에 대해 감소함을 알 수 있었다.

[0057] [실시예 4] *CaPAL1* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 *CaPAL1* 유전자의 과다발현에 의한 애기장대 식물의 병 저항성 변화

[0058] 모델식물로 사용되는 애기장대 식물체에서 *CaPAL1* 유전자의 과다발현시 다른 병 발생과 관련된 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaPAL1* 유전자를 pBIN35S 벡터에 도입시켜 pBIN35S:*CaPAL1*을 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S:*CaPAL1*을 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101)에 전기천공법 (Electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 꽃침지 (Floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물에 도입함으로써 *CaPAL1* 유전자의 과다발현을 유도시킨 형질전환 애기장대를 제작하고 아래와 같은 시험을 수행하였다. *CaPAL1* 유전자의 과다발현은 역전사효소 피씨알 (RT-PCR) 및 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR)에 의해 확인되었다 (도 7, 도 9 참조)

[0059] [단계 1]

[0060] 상기와 같이 *CaPAL1*이 과다 발현된 식물에 세균성 흑반병 병원균 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)의 병원성 및 비병원성 균주를 5×10^4 cfu ml⁻¹ 농도로 접종하고 식물체의 변화를 관찰하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, *CaPAL1*이 과다 발현된 식물체에서 야생형에 비하여 병원성, 비병원성 균주 모두에 대하여 저항성이 증가함이 관찰되었다. 도 8에 나타난 바와 같이, H₂O₂의 축적은 병원성 및 비병원성 세균 접종 이후에 대조구에 비해 높고, 이온전도도 또한 병원성 및 비병원성 세균 접종후 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0061] [단계 2]

[0062] 병원성 및 비병원성 세균 10^7 cfu ml⁻¹ 농도로 접종 후 24, 48시간 후에 실험구와 대조구의 감염 앞에서 RNA를 추출하여 실시간 알티-피시알 (real-time RT-PCR)을 통해 병 접종 시 대조구 식물과 비교하여 병저항성 관련 유전자의 발현 차이를 관찰하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0063] [단계 3]

[0064] *CaPAL1*이 과다 발현된 식물에, 애기장대에서 노균병을 일으키는 순환물 기생체인 하이알로페로노스포라 파라시티카 Noco2 (*Hyaloperonospora parasitica* Noco 2)를 접종한 후 병저항성의 변화를 관찰하였다. *CaPAL1*이 과발

현된 식물과 과발현하지 않는 야생형 대조구 식물의 떡잎시기에 하이알로페로노스포라 파라시티카 Noco2를 5×10^4 spores ml⁻¹의 농도로 스프레이접종 하였다. 접종 후 17℃의 온도에서 습실 처리하였다.

그 결과 *CaPAL1*을 과발현하는 형질전환 애기장대 식물에서 저항성이 증가되어 노균병원균의 균사생장이 억제되고, 포자경과 포자수가 야생종에 비해 적게 생성되었고, 페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 활성 (PAL activity)이 높은 것을 관찰할 수 있었고 그 결과를 도 10에 나타내었다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

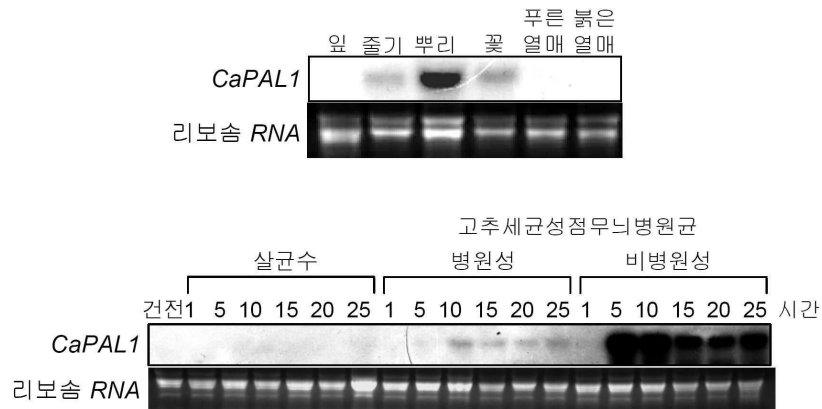
도면1

	tctttttctcttactacaaacaaaaaacattctctattacaactctagccattcttgatcca	70
	ATGCGCATCAACAATTGCACAAATGGAGATATTGTAGCCATTGATTATGACCAATAATCA	130
	M A S T A A Q I N G D I V A I D L C N K S	130
	ATTCATGTCCTCATTGAATTGGAAATGGCTGGAATCAATAAAAGSGAGTCATTTGGAT	190
	D I H N T E M A A E S D G A A G G G S H A D T	190
	GGAGTCAAAAATATGGGATGATTTAGCTGCAATCTGATGAGGAGGAGGATGAT	250
	E V K K M V D E F R K P I V A K L G G E T	310
	TTGACAGTTCGACAAGTTCGATCCATTGCAAAATGCTGATTAACAAAACCTTGTGGGGTTAA	370
	L T V A Q V A S I A N A D N K T C G V K	370
	GTTGGAGCTTTCAGAAATGCAAGGCGTGGTGTGAAAGCTAGTAGTGATTGGGTTATTGGAT	430
	V E L K E S A K A G S S D W M D L	430
	AGTATTGTGAATATCAATATGTTATGGTGTATATGCTTGTGACATATTTGATCTC	490
	S M C K C T D S Y G V T T G F G A T S H	490
	AGGAGAACCAAGATGGTGGTCTCTTCAAAAGAACTTATTAGGTTCTTGAATGCTGGA	550
	R R T K N G G A L O K E L I R F L N A G	550
	GTTTITGGAAATGGAACTTGAAGTTGTGCACACATTGCCACATTCAGCAACAAGGGGAGCT	610
	G N G T G T G S C H T L P H S A R A A	610
	ATGCTGTGTTTATGATGCTGCTACAGTCTTGTGACATATTTGATCTC	670
	M L V R I N T L L Q G Y S G I R F E L	670
	GAAGCGATTAAAGATTGATNACAGCAGCACTCCCATTTTTCGCCCTTCGTCGAGC	730
	E A I T K K L I N S N I T P C L R I G T	730
	ATACAGTCCCTGGGTGATCTTGTCCGTTGTCTACATTGCTGGTITGTGCTATCGCAGA	790
	I T A G G L D S Y I A G L G A G G G A G G	790
	CCATATGCAAGTGTGCTTTCATGTGAGGACTTLAGNAAEEAER	850
	P N A K A V G F N G E K L N A E E A F R	850
	GTGGCTGGTGTAGTGTGGATTCTTCAGTTGCAGCCGAAGGAAGACTTGCACATTGTG	910
	V A G V S G G F F E L Q P K E G L A L V	910
	AATGTGTCAGCAGATTGGTTTCTGGTATGCGCTGATGGTCTCTGTAGTCCACATCTTT	970
	T G S T A G S G M A S M V L F F E S R	970
	GGTGCATGTTCTGAATTTGATGCTTTCGATGAGTGAAGAGAAAGCCCGAG	1030
	A V M S E V L S A I F A E V M N K E P E	1030
	TTCCAGGACCATGTGACACAGATTTGAAGCAACATCCGGTTCAGATTGAGGCTGTGCT	1090
	F T D H L T H K L K H H G Q I E A A A	1090
	ATTATGGAAACACATTTTGTGATGGCAGCTTTATGTGCAAGGCAGCTCAAAGGCTCCATGA	1150
	I M E H L T D G S S Y V K A A O K L H E	1150
	ATGGATCTTCTGAGATTTGATGCTTTATGATCCCAAATCTCCACAGG	1210
	D M L Q K E K Q D R Y L C R R A T S P Q W	1210
	CTAGGCTCCATTAATGAAGTCATTGCGCTGCAACTAAGATCATCGAGAGGGAGATCAAC	1270
	L G P Q I E V I R A A T K M I E R E I N	1270
	TCAGTGAACGACAAATCATGTATGATGCTTTCAAGAAACCAAGGCTTACACGTTGGGAAT	1330
	S V N D N E L I D V T S R N K A L H G G N	1330
	TTCCAGGACCACTTATGCTTCCGCGAGTCAACAGGATTTGGCTTGTGATCAAT	1390
	F Q G T L R S M D N T A R A	1390
	GGGAATTTGATGTTTGTCTAGTTCTCAGAAGTTGTCAAGCATTTTACAACATGGTTT	1450
	G K L M F A Q F S E L V N D Y N N G L	1450
	CCATCTAATCTCACAGCAGGAAGGATCCAAGCTTGGACTTGGTTTCCAGGAGGCTGAA	1510
	P S N L T T A G R N P S L D Y G E K G A E	1510
	ATCGAGTGTGGCTTTACTGTCCGGAAGCTTCATCTGGCAATTCGAGTGCAGTACAT	1570
	I A M S E S Q F L A A N T F H H	1570
	GTCCAAAGTGGCGGACAACACCAAGATGTTAACTCTTGGGCTTAATCTCATCAAGG	1630
	V Q S A E Q H N Q D V N S L G L I S S R	1630
	AAAAAGCCGAGGCGAGTGCACATTTGAAGCTGATGTCATCAACCTATCTCGTGGCGCTT	1690
	K T A E A V D I L K L M S S T Y L V A L	1690
	TGCGCAACTATAGACTTTAGGCACTTGGCAGAGAACTGAAGATTCGCAATCAAGACA	1750
	Q A K L A K L A T F H H	1750
	CTCAGCCAAGTGGCTAAGAGAACTTTGACATTTGGGGGCTTACCGTGAACCTTACATCCAGA	1810
	V S Q V A A K R T L T M G A N G E L H C A	1810
	AGATTTCGCGAAAGGATGTGCTTGAGTCTGTGGACAGGGAATCTTGTGCTATGCT	1870
	R F C E K E L L R V V D R E Y L F A Y A	1870
	GATGATCTCTGAGCTCAACTTACCTTTTATGCGAAGAGCTGAGACAGTCTCTGTGAT	1930
	D D T L E Y F E F T T C C	1930
	CATGCACTGAACACGGTGAAGCGAGNAGATTTGAACAGCTCAATCTTCCAAAGATT	1990
	H A L N N G E S E A K V N N S I F Q K I T	1990
	CGAGCTTTCGAGAGCAATTTGAAGCGCATATTGTGCTTAAAGAGTTGAGAGTGCAGGAAT	2050
	A A F E D E L K A L P K E V E S A R I	2050
	ACTCTTGAAGTGTGCACCTTCAATTCACCAAGAGTACAGAGATTCAGATCATATCG	2110
	T E L C P E T T C	2110
	TATACAGAGTTGTGAGGAAAGCACTTGAACCTTAACCTTTGACAGGTGAAGAAGCTCGA	2170
	L Y R L V R K E L G T E L L T G E R V	2170
	TGCGCCGCTGAGGAGATTGACAAAGTGTTCACAGCAATGTGCAATGGACAGATTATTGAT	2230
	S P G E E I D K V F T M A N C G S I T A G	2230
	CCATTGTGGAGTCTCCAGAGCTGGAAATGGTCTCCTCTCCAAATCTGATG	2290
	E L L S W N A A A A A A A A A A A A A A	2290
	tctttgcaaaaagaccttattgttatgtctgttgcctaagtgctattttcaaaatttgttat	2350
	tatctctaaaaaataaaaaaataaaaaa	2350

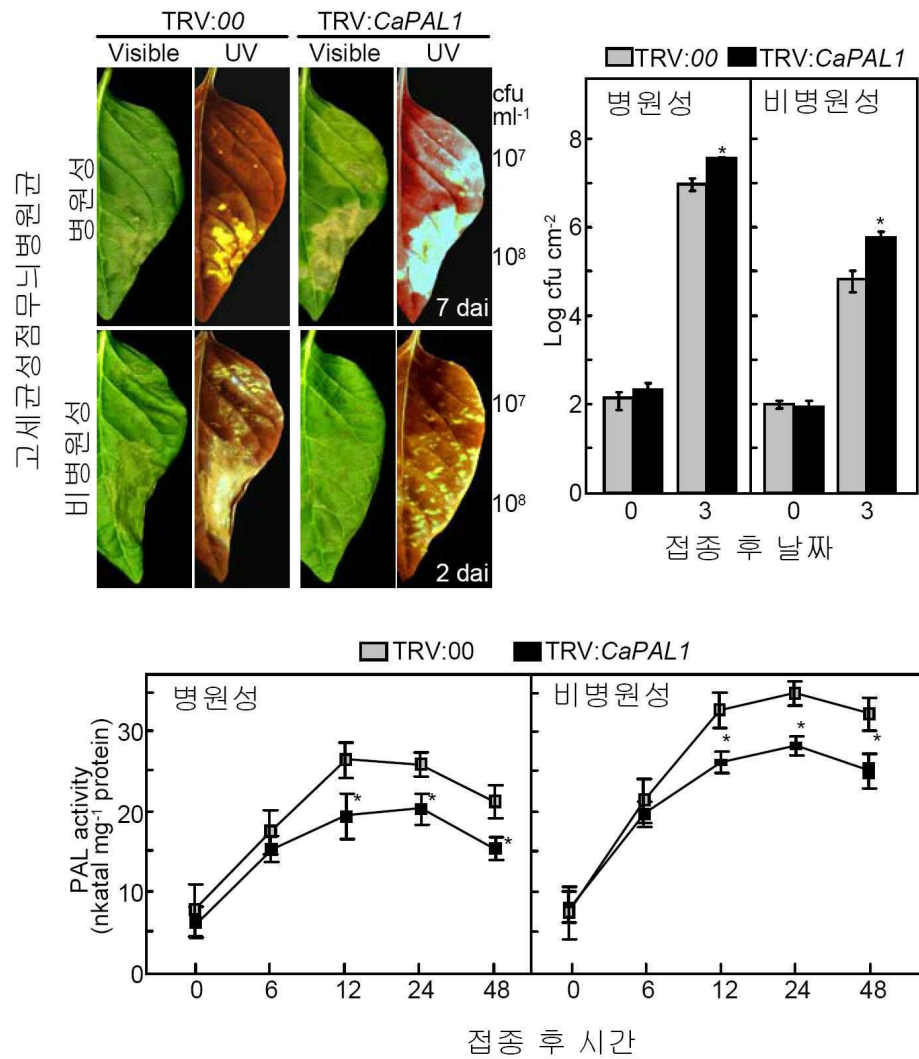
도면2

CaPAL1	MASTIAQ--NGDI---VA---IDLCKKSIH--DPLNWEVAASIRGSHLDEVKMMVDEFRK	51
Tomato	MASSIVQ--NCHVNGE-A---MDLCKKSNVNDPLNWEVAASIRGSHLDEVKMMVDEFRK	55
Potato	MAPSIAQ--NCHVNGE-E---EVLWKKSIH--DPLNWEVAASIRGSHLDEVKMMVDEFRK	54
Tabacco	MAS-----NCHV---NGGENFELCKKSA---DPLNWEVAASIRGSHLDEVKMMVSEFRK	49
Ipomoea	MSVVKLQNGHQ---NGF-----GVVV---DPLNWEVAASIRGSHLDEVKMMVSEFRK	48
CaPAL1	PIVKLGGELTVAQVASIANADNKTICGVNVELSEARAGVKASSDWMDSMCKGTDSYGV	111
Tomato	PIVKLGGELTVAQVASIANVDNKSNGVHVELSEARAGVKASSDWMDSMCKGTDSYGV	115
Potato	PIVKLGGELTVAQVASIANADNKTICGVNVELSEARAGVKASSDWMDSMCKGTDSYGV	114
Tabacco	PIVKLGGELTVAQVAATAVRLKKSANGVHVELSEARAGVKASSDWMDSMCKGTDSYGV	109
Ipomoea	PIVKLGGELTVAQVAATAVRDNI---AMTVELSEARAGVKASSDWMDSMCKGTDSYGV	105
CaPAL1	TTGFCATSHRRTRNGGALOKELIRFLNAGVFGNGTGSCHTLPHSATRAAMLVRINTLLQG	171
Tomato	TTGFCATSHRRTRNGGALOKELIRFLNAGVFGNGTESSETLPHSATRAAMLVRINTLLQG	175
Potato	TTGFCATSHRRTRNGGALOKELIRFLNAGVFGNGTESSETLPHSATRAAMLVRINTLLQG	174
Tabacco	TTGFCATSHRRTRNGGALOKELIRFLNAGVFGNGTETSETLPHSATRAAMLVRINTLLQG	169
Ipomoea	TTGFCATSHRRTRNGGALOKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPHSATRAAMLVRINTLLQG	165
페닐알라닌 암모니아-라이에이즈 도메인		
CaPAL1	YSGIRFEILEATKLLNSNITPCLPLRSTITASGDLVPLSYIAGLITGRPNKAVGPNGE	231
Tomato	YSGIRFEILEATKLLNSNITPCLPLRSTITASGDLVPLSYIAGLITGRPNKAVGPNGE	235
Potato	YSGIRFEILEATKLLNSNITPCLPLRSTITASGDLVPLSYIAGLITGRPNKAVGPNGE	234
Tabacco	YSGIRFEILEATKLLNSNITPCLPLRSTITASGDLVPLSYIAGLITGRPNKAVGPNGE	229
Ipomoea	YSGIRFEILEATKLLNSNITPCLPLRSTITASGDLVPLSYIAGLITGRPNKAVGPNGE	225
CaPAL1	KLNAEDAFRVAGVSGFFELQPKGLALVNGTAVGSGMASVLFESNILLAVMSEVLSAIF	291
Tomato	KLNAEDAFRVAGVSTFFELQPKGLALVNGTAVGSGMASVLFESNILLAVMSEVLSAIF	295
Potato	KLNAEDAFRVAGVSGFFELQPKGLALVNGTAVGSGMASVLFESNILLAVMSEVLSAIF	294
Tabacco	KLNAEDAFRVAGVSGFFELQPKGLALVNGTAVGSGMASVLFESNILLAVMSEVLSAIF	289
Ipomoea	KLNAEDAFRVAGVSGFFELQPKGLALVNGTAVGSGMASVLFESNILLAVMSEVLSAIF	285
CaPAL1	AEVMNGKPEFTDHLTHKLKHHHPGQIEAAAIIMEHILDGSSYVKAQKHEMDPLQKPKQDR	351
Tomato	AEVMNGKPEFTDHLTHKLKHHHPGQIEAAAIIMEHILDGSSYVKAQKHEMDPLQKPKQDR	355
Potato	AEVMNGKPEFTDHLTHKLKHHHPGQIEAAAIIMEHILDGSSYVKAQKHEMDPLQKPKQDR	354
Tabacco	AEVMNGKPEFTDHLTHKLKHHHPGQIEAAAIIMEHILDGSSYVKAQKHEMDPLQKPKQDR	349
Ipomoea	AEVMNGKPEFTDHLTHKLKHHHPGQIEAAAIIMEHILDGSSYVKAQKHEMDPLQKPKQDR	345
CaPAL1	YALRTSPQWLGPQIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSM	411
Tomato	YALRTSPQWLGPQIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSM	415
Potato	YALRTSPQWLGPQIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSM	414
Tabacco	YALRTSPQWLGPQIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSM	409
Ipomoea	YALRTSPQWLGPQIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSM	405
CaPAL1	NRLALASIGKLMFAQFSELVNDYNNGLFNLTAGRNPSLDYGEKGAETAMASYCSELQ	471
Tomato	NRLALASIGKLMFAQFSELVNDYNNGLFNLTAGRNPSLDYGEKGAETAMASYCSELQ	475
Potato	NRLALASIGKLMFAQFSELVNDYNNGLFNLTAGRNPSLDYGEKGAETAMASYCSELQ	474
Tabacco	NRLALASIGKLMFAQFSELVNDYNNGLFNLTAGRNPSLDYGEKGAETAMASYCSELQ	469
Ipomoea	NRLALASIGKLMFAQFSELVNDYNNGLFNLTAGRNPSLDYGEKGAETAMASYCSELQ	465
CaPAL1	FLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISARKTAEAVDLKLMSSSTYLVALCOAIDLRLLEE	531
Tomato	FLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISARKTAEAVDLKLMSSSTYLVALCOAIDLRLLEE	535
Potato	FLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISARKTAEAVDLKLMSSSTYLVALCOAIDLRLLEE	534
Tabacco	FLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISARKTAEAVDLKLMSSSTYLVALCOAIDLRLLEE	529
Ipomoea	FLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISARKTAEAVDLKLMSSSTYLVALCOAIDLRLLEE	525
CaPAL1	NLKNVKNIVSQAQKRTLMGANGELHPARFCEKELLVVDREYLFAYADDPSCSTYPLM	591
Tomato	NLKNVKNIVSQAQKRTLMGANGELHPARFCEKELLVVDREYLFAYADDPSCSTYPLM	595
Potato	NLKNVKNIVSQAQKRTLMGANGELHPARFCEKELLVVDREYLFAYADDPSCSTYPLM	594
Tabacco	NLKNVKNIVSQAQKRTLMGANGELHPARFCEKELLVVDREYLFAYADDPSCSTYPLM	589
Ipomoea	NLKNVKNIVSQAQKRTLMGANGELHPARFCEKELLVVDREYLFAYADDPSCSTYPLM	585
CaPAL1	QKLRQVLVDHAMNGESEKNVNSSIFQKIGAFEDELAVLPKEVESARALVESGNPAIPN	651
Tomato	QKLRQVLVDHAMNGESEKNVNSSIFQKIGAFEDELAVLPKEVESARAVVESGNPAIPN	655
Potato	QKLRQVLVDHAMNGESEKNVNSSIFQKIGAFEDELAVLPKEVESARALVESGNPAIPN	654
Tabacco	QKLRQVLVDHAMNGESEKNVNSSIFQKIGAFEDELAVLPKEVESARALVESGNPAIPN	649
Ipomoea	QKLRQVLVDHAMNGESEKNVNSSIFQKIGAFEDELAVLPKEVESARALVESGNPAIPN	645
CaPAL1	RITECRSYPLYRLVRKEIGTELLTGERVRSPEGEDRVFTTAQNGCINDPBLECLKSWNG	711
Tomato	RITECRSYPLYRLVRKEIGTELLTGERVRSPEGEDRVFTTAQNGCINDPBLECLKSWNG	715
Potato	RITECRSYPLYRLVRKEIGTELLTGERVRSPEGEDRVFTTAQNGCINDPBLECLKSWNG	714
Tabacco	RITECRSYPLYRLVRKEIGTELLTGERVRSPEGEDRVFTTAQNGCINDPBLECLKSWNG	709
Ipomoea	RITECRSYPLYRLVRKEIGTELLTGERVRSPEGEDRVFTTAQNGCINDPBLECLKSWNG	705
CaPAL1	APLPIC 717	
Tomato	APLPIC 721(93%)	
Potato	APLPIC 720(92%)	
Tabacco	APLPIC 715(93%)	
Ipomoea	APLPIC 711(90%)	

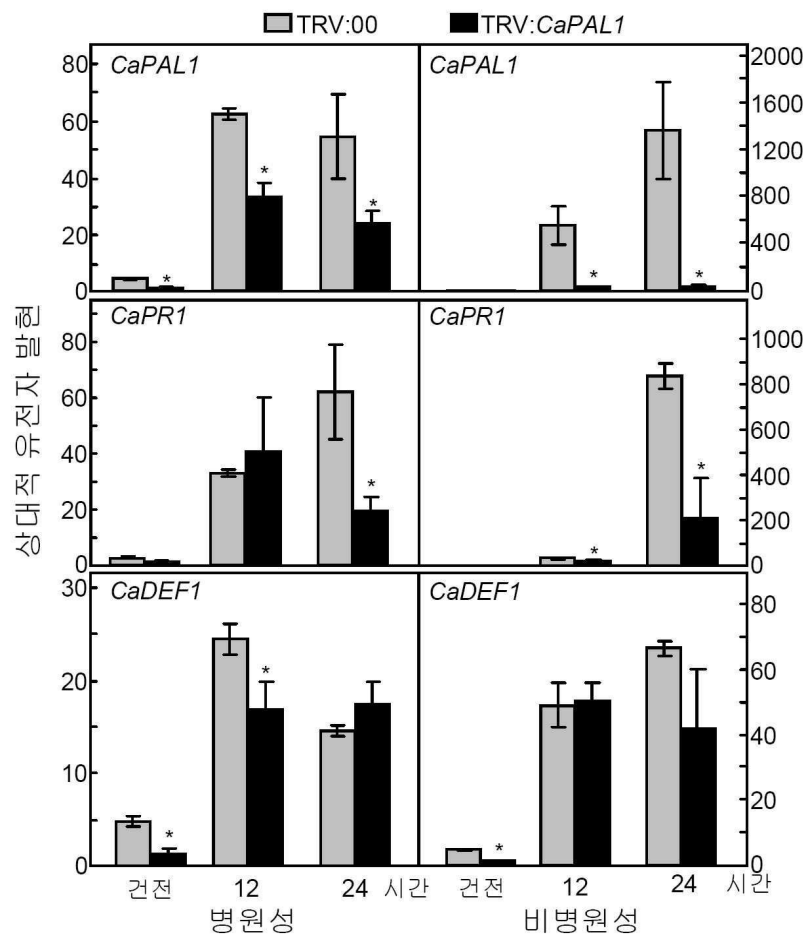
도면3



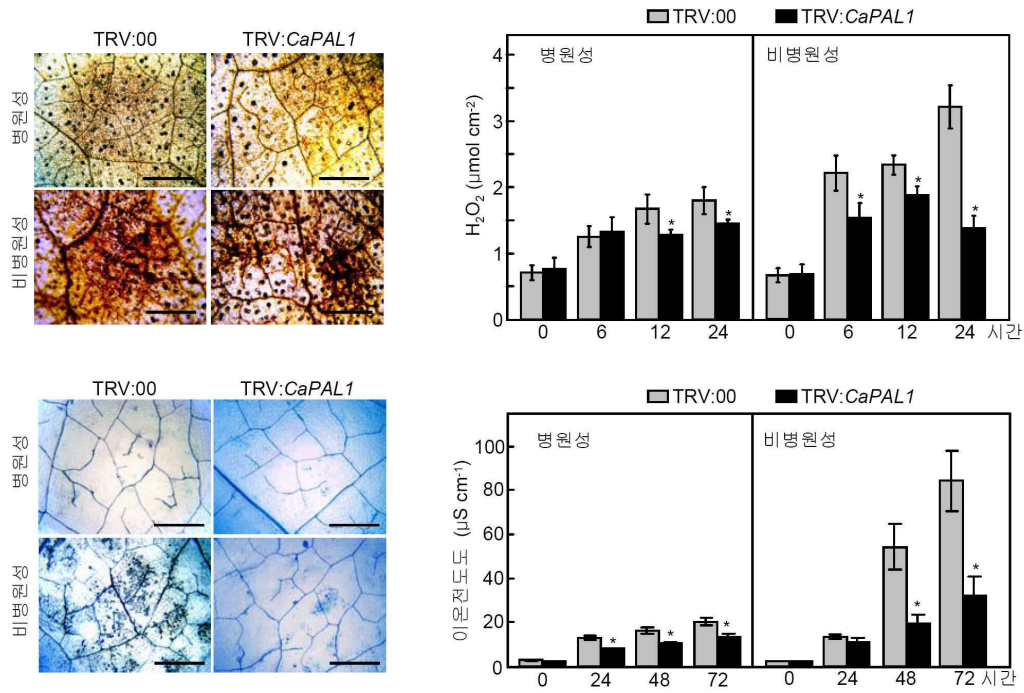
도면4



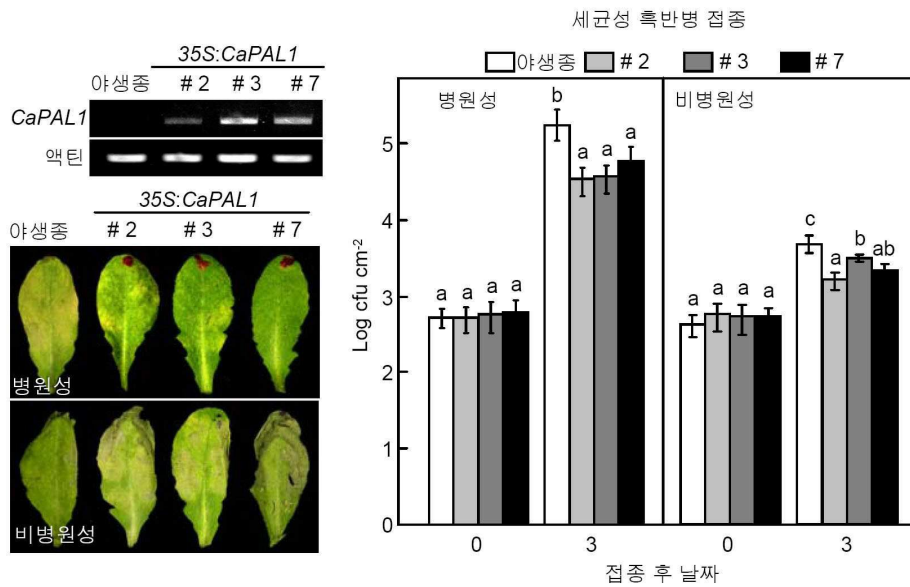
도면5



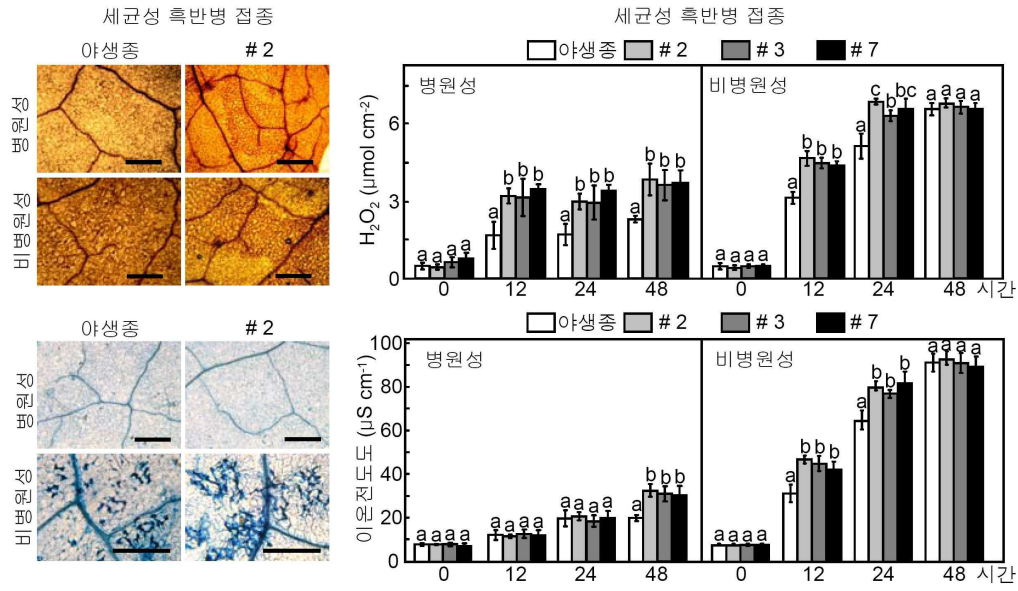
도면6



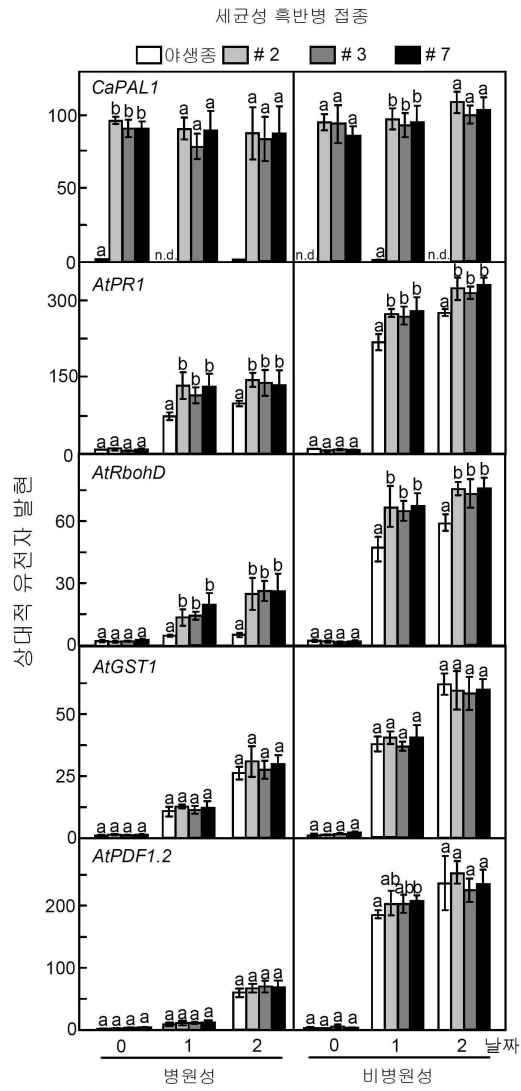
도면7



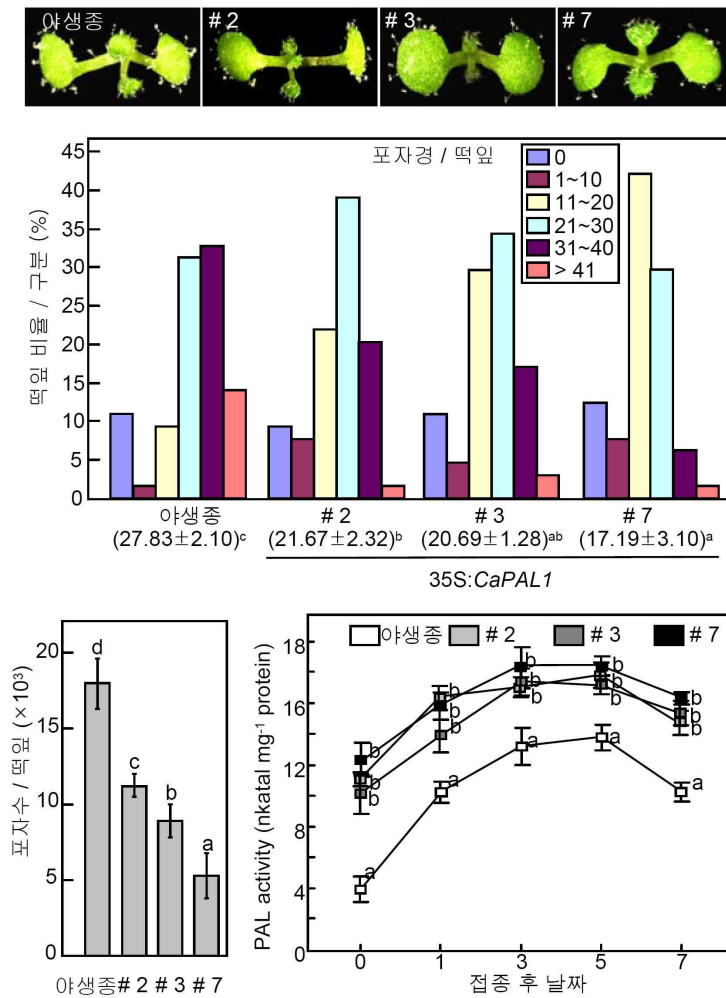
도면8



도면9



도면10



서열목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Disease resistance-related phenylalanine ammonia-lyase gene
CaPAL1, and transgenic plants using the same
- <130> P11-120903-02
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 2318
- <212> DNA
- <213> Capsicum annuum cv. Nockwang
- <400> 1

ttcatttttt tcttttttcc ttactaaaac aaaaacatct ctattacaac tctagccatt

60

tcttgatcca atggcatcaa caattgcaca aaatggagat attgtagcca ttgatttatg

120

caataaatca attcatgata cattgaattg ggaaatggct gctgaatcat taaaaggag	180
tcatttggat gaagtgaataa aaatgggtga tgaatttaga aagccaattg ttaaacttgg	240
aggtgaaact ttgacagtgt cacaagtgtc atccattgca aatgctgata acaaaacttg	300
tgggttataa gtggagcttt ctgaaagtgc aagggtgtgt gtgaaagcta gtagtgattg	360
ggttatggat agtatgtgta aaggtagaga tagttatggt gttactactg gttttggtgc	420
aacatcacat aggagaacca agaattggtg tgctcttcaa aaagaactta ttaggttctt	480
gaatgctgga gtttttgga atggaactgg aagttgtcac acattgccac attcagcaac	540
aagggcagct atgcttgta ggatcaacac tttgcttcaa gggfactctg gcattaggtt	600
tgagatcttg gaagcgataa cgaagttagt caacagcaac atcaccccat gtttgccct	660
ccgtggcacg atcactgctt cgggtgatct tgtccgttg tctacattg ctggtttgct	720
tactggcaga cctaagcca aggcgttgg tccaatggt gagaaactta atgcagagga	780
agcgttccgc gtggctggtg ttagtggtgg atttttcgag ttgcagccga aggaaggact	840
tgcacttgat aatggtacag cagttggttc tggtagggcg tcatggtcc tgtttgagtc	900
caacattctt gcgtcatgt ctgaagtttt gtcagcgatt ttcgtgaag tgatgaatgg	960
aaagcccag ttcacggacc atctgacaca caagttgaag caccatcccg gtcagattga	1020
ggctgctgct attatggaac acattttgga tggcagctct tatgtcaagg cagctcaaaa	1080
gctccatgaa atggatcctc tccagaaacc aaagcaagat cgttatgtc tccgaacatc	1140
tccacaatgg ctaggcctc aaattgaagt cattcgctg gcaactaaga tgatcgagag	1200
ggagatcaac tcagtgaacg acaatccatt gatcgatgt tcaagaaaca aggccttaca	1260
cgggtgggaat ttccaaggca cccctattgg tgtctcatg gataacaca gattggccct	1320
tgcataatt gggaaattga tgtttgctca gttctcagaa cttgtcaacg actattacaa	1380
caatggtttg ccatctaate tcacagcagg aaggaatcca agcttgact atggtttcaa	1440
gggagctgaa atcgcatgg cttcttactg ctcggaactt caattcttgg caaatccagt	1500
gactaacat gtccaaagt cagagcaaca caaccaagat gttactcct tgggttaat	1560
ctcatcaagg aaaacagccg aggcagttga catcttgaag ctgatgtcat caacctatct	1620
cgtggcgctt tgccaagcta tagacttgag gcacttgga gaaaacttga agaattgcagt	1680
caagaacaca gtcagccaag tagctaagag aactttgaca atgggcgcta acggtgaact	1740
tcatccagca agattctgag aaaaggagtt gcttcagtc gtggacagg aatactgtt	1800
tgctatgct gatgatact gcagctcaac ctaccctttg atgcagaagc tgagacaagt	1860
cctcgttgat catgactga acaacggtga aagcgagaag aatgtgaaca gctcaatctt	1920

ccaaaagatt gcagctttcg aggacgaatt gaaggccgta ttgcctaaag aagttgagag 1980
 tgcaagaatt actcttgaaa gtggcaaccc ttcaattccc aacaggatca cagaatgcag 2040
 atcatatccg ttatacagac ttgtgaggaa ggaacttga actgaactgt tgacaggtga 2100
 aagagtcgga tcgcccgggtg aggagattga caaagtgttc acagcaatgt gcaatggaca 2160
 gattattgat ccattgttgg agtgtctcaa gagctggaat ggtgctctc ttccaatctg 2220
 ttaggtgttt tcttgcaaaa aaagacctta tgttagtgct tgtcaagtgc tatttatcaa 2280

atttgttatt ttatcctaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2318

<210> 2

<211> 717

<212> PRT

<213> Capsicum annuum cv. Nockwang

<400> 2

Met Ala Ser Thr Ile Ala Gln Asn Gly Asp Ile Val Ala Ile Asp Leu

1 5 10 15

Cys Asn Lys Ser Ile His Asp Pro Leu Asn Trp Glu Met Ala Ala Glu

20 25 30

Ser Leu Lys Gly Ser His Leu Asp Glu Val Lys Lys Met Val Asp Glu

35 40 45

Phe Arg Lys Pro Ile Val Lys Leu Gly Gly Glu Thr Leu Thr Val Ala

50 55 60

Gln Val Ala Ser Ile Ala Asn Ala Asp Asn Lys Thr Cys Gly Val Lys

65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Glu Ser Ala Arg Ala Gly Val Lys Ala Ser Ser Asp

85 90 95

Trp Val Met Asp Ser Met Cys Lys Gly Thr Asp Ser Tyr Gly Val Thr

100 105 110

Thr Gly Phe Gly Ala Thr Ser His Arg Arg Thr Lys Asn Gly Gly Ala

115 120 125

Leu Gln Lys Glu Leu Ile Arg Phe Leu Asn Ala Gly Val Phe Gly Asn

130 135 140

Gly Thr Gly Ser Cys His Thr Leu Pro His Ser Ala Thr Arg Ala Ala

145 150 155 160

Met Leu Val Arg Ile Asn Thr Leu Leu Gln Gly Tyr Ser Gly Ile Arg
165 170 175

Phe Glu Ile Leu Glu Ala Ile Thr Lys Leu Ile Asn Ser Asn Ile Thr
180 185 190

Pro Cys Leu Pro Leu Arg Gly Thr Ile Thr Ala Ser Gly Asp Leu Val
195 200 205

Pro Leu Ser Tyr Ile Ala Gly Leu Leu Thr Gly Arg Pro Asn Ala Lys
210 215 220

Ala Val Gly Pro Asn Gly Glu Lys Leu Asn Ala Glu Glu Ala Phe Arg
225 230 235 240

Val Ala Gly Val Ser Gly Gly Phe Phe Glu Leu Gln Pro Lys Glu Gly
245 250 255

Leu Ala Leu Val Asn Gly Thr Ala Val Gly Ser Gly Met Ala Ser Met
260 265 270

Val Leu Phe Glu Ser Asn Ile Leu Ala Val Met Ser Glu Val Leu Ser
275 280 285

Ala Ile Phe Ala Glu Val Met Asn Gly Lys Pro Glu Phe Thr Asp His
290 295 300

Leu Thr His Lys Leu Lys His His Pro Gly Gln Ile Glu Ala Ala Ala
305 310 315 320

Ile Met Glu His Ile Leu Asp Gly Ser Ser Tyr Val Lys Ala Ala Gln
325 330 335

Lys Leu His Glu Met Asp Pro Leu Gln Lys Pro Lys Gln Asp Arg Tyr
340 345 350

Ala Leu Arg Thr Ser Pro Gln Trp Leu Gly Pro Gln Ile Glu Val Ile
355 360 365

Arg Ala Ala Thr Lys Met Ile Glu Arg Glu Ile Asn Ser Val Asn Asp
370 375 380

Asn Pro Leu Ile Asp Val Ser Arg Asn Lys Ala Leu His Gly Gly Asn
385 390 395 400

Phe Gln Gly Thr Pro Ile Gly Val Ser Met Asp Asn Thr Arg Leu Ala

405 410 415
 Leu Ala Ser Ile Gly Lys Leu Met Phe Ala Gln Phe Ser Glu Leu Val
 420 425 430
 Asn Asp Tyr Tyr Asn Asn Gly Leu Pro Ser Asn Leu Thr Ala Gly Arg
 435 440 445
 Asn Pro Ser Leu Asp Tyr Gly Phe Lys Gly Ala Glu Ile Ala Met Ala
 450 455 460
 Ser Tyr Cys Ser Glu Leu Gln Phe Leu Ala Asn Pro Val Thr Asn His
 465 470 475 480

 Val Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Gln Asp Val Asn Ser Leu Gly Leu
 485 490 495
 Ile Ser Ser Arg Lys Thr Ala Glu Ala Val Asp Ile Leu Lys Leu Met
 500 505 510
 Ser Ser Thr Tyr Leu Val Ala Leu Cys Gln Ala Ile Asp Leu Arg His
 515 520 525
 Leu Glu Glu Asn Leu Lys Asn Ala Val Lys Asn Thr Val Ser Gln Val
 530 535 540
 Ala Lys Arg Thr Leu Thr Met Gly Ala Asn Gly Glu Leu His Pro Ala

 545 550 555 560
 Arg Phe Cys Glu Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Asp Arg Glu Tyr Leu
 565 570 575
 Phe Ala Tyr Ala Asp Asp Thr Cys Ser Ser Thr Tyr Pro Leu Met Gln
 580 585 590
 Lys Leu Arg Gln Val Leu Val Asp His Ala Leu Asn Asn Gly Glu Ser
 595 600 605
 Glu Lys Asn Val Asn Ser Ser Ile Phe Gln Lys Ile Ala Ala Phe Glu
 610 615 620

 Asp Glu Leu Lys Ala Val Leu Pro Lys Glu Val Glu Ser Ala Arg Ile
 625 630 635 640
 Thr Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ile Pro Asn Arg Ile Thr Glu Cys
 645 650 655
 Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Arg Leu Val Arg Lys Glu Leu Gly Thr Glu

660 665 670
 Leu Leu Thr Gly Glu Arg Val Arg Ser Pro Gly Glu Glu Ile Asp Lys
 675 680 685
 Val Phe Thr Ala Met Cys Asn Gly Gln Ile Ile Asp Pro Leu Leu Glu

690 695 700
 Cys Leu Lys Ser Trp Asn Gly Ala Pro Leu Pro Ile Cys
 705 710 715

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Capsicum annuum cv. Nockwang

<400> 3

caaattcttc aatttcacgc

22