

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

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하며, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 고추 유래의 씨에이에스지티1 유전자(*Capsicum annuum* Suppressor of G Two allele of SKP1 1, CaSGT1).

청구항 2

삭제

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 고추 유래의 씨에이에스지티1 단백질(*Capsicum annuum* Suppressor of G Two allele of SKP1 1, CaSGT1).

청구항 4

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

식물의 병원균을 처리한 식물체로부터 mRNA를 분리하여 제1항 기재의 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 병 저항성 관련 씨에이에스지티1 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 식물이 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되어 세균의 비병원성 단백질 에이브이알비에스티 (AvrBsT)와 상호작용하는 신규 저항성 관련 유전자인 씨에이에스지티1 (CaSGT1: *Capsicum annuum* Suppressor of G Two allele of SKP1 1) 유전자 및 이를 이용한 형질전환 식물체 제조와 병저항성 탐색방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

경제발전과 생활수준의 향상이 이루어지면서 친환경 유기농법에 의한 작물생산에 대한 관심이 고조되고 있다. 반면에 환경은 지진, 홍수, 폭설등의 자연재해가 더욱 빈번하게 발생하고 있고 온난화 현상으로 병해충의 발생이 증가되어 인간 및 자연환경에 유해한 화학농약에 대한 의존도가 더욱 증가하고 있는 상황이다. 이러한 농약의 과도한 사용으로 환경오염과 인축에 대한 유해성 때문에 친환경 녹색성장이 일반에게 화두가 되고 있다. 이

런 여론의 흐름을 따라서 녹색성장을 위한 국제적인 협력방안이 모색되어 가고 있고 모든 산업과 사회의 전반적인 생활 양식이 친환경적으로 전환하는 것이 의무화 되어가는 추세이다. 농업에 있어서 친환경 녹색성장을 이룩하기 위해서는 농약과 같은 화학적 방제가 필요하지 않은 병저항성 품종의 개량 및 육종 방법을 찾는 것이 절실하다. 식물의 병 저항성반응 또는 환경적 스트레스에 대한 내성을 가지는 식물의 방어관련 기작 연구는 지금까지 알려져 있지 않은 생체 내 기작을 규명하는 과학기술적 가치를 지닌다. 또한 식물저항성관련 유전자의 정보는 작물의 분자적 유전육종의 직접적 재료로서 제공될 수 있을 뿐 아니라 전통적 유전육종에도 사용될 수 있는 장점을 지니고 있다.

[0003] 우리나라에서 집약적으로 재배되는 고추 (*Capsicum annuum* L.)는 주요 경제 작물로서 여러 식물병에 피해를 받고 있으며, 더 효과적인 방제법의 개발을 위해선 병에 대한 식물의 방어 반응을 분자세포학적으로 연구하는 것이 필요하다. 고추 세균성점무늬병원균과 고추와의 상호작용에서 방어반응에 관여하는 유전자를 분자적으로 클로닝하고 기능 분석하는 것은, 고추의 병방어 반응 경로의 이해를 증진시키고, 저항성관련유전자를 고추식물에서 발현시킨 병저항성 형질전환 식물의 개발을 위한 유전자원의 토대가 된다. 식물체가 병원균에 감염되면 여러 가지 세포내 대사 시스템을 작동시켜 방어기작을 활성화하는데, 이러한 방어기작은 병원체에 대한 기주세포의 인식을 시발점으로 국부적 세포 죽음과 같은 과민성 반응, 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 여러 종류의 2차 대사산물과 항균성 물질을 생성하고, 병방어관련단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다. 그러나 현재 과민성 반응을 조절하는 인자와 그것의 메커니즘에 대한 연구가 매우 미흡한 실정이다.

[0004] 본 발명의 배경이 되는 기술로는 대한민국 등록특허 10-1099350 (2011.12.26)에 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주인 Bv5-4a 균주로부터 유래한 에이브이알비에스티 (avrBsT) 유전자, 상기 유전자로 형질전환된 비병원성 Ds1 균주 및 상기 균주를 이용하여 고추 식물의 저항성 및 토마토 식물의 감수성을 유도하는 방법에 대해 기재되어 있다. 또한, *Physiol. Plantarum* 126 (4), 605-617 (2006)에는 고추 SGT1 및 SKP1가 식물 성장 및 기본 저항성에 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다. 나아가 담배 등의 SGT1이 보고되어 있다(GenBank: AA085509.1 (PLN 30-OCT-2003)).

[0005] 그러나, 에이브이알비에스티(AvrBsT)와 직접 상호작용하여 과민성 반응을 조절하는 저항성 관련 고추 SGT1 유전자에 대해 알려진 바는 없다. 따라서, 에이브이알비에스티(AvrBsT)와 직접 상호작용하여 과민성 반응을 조절하는 신규 저항성 관련 유전자를 동정하고 클로닝 하여 분석하는 것이 병저항성 작물 품종을 육종하는데 실질적으로 기여할 것으로 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-1099350 (2011.12.26)

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Eunsook Chung et al., *Physiol. Plantarum* 126 (4), 605-617 (2006)

(비특허문헌 0002) GenBank: AA085509.1 (PLN 30-OCT-2003)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로, 에이브이알비에스티(AvrBsT)와 직접 상호작용하여 식물병 저항성관련 유전자의 하나인 씨에이에스티1 (*CaSGT1: Capsicum annuum Suppressor of G Two allele of SKP1 1*) 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열정보 및 그에 따른 아미노산 서열정보를 제공하는 것이다.

- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 에이브이알비에스티(AvrBsT)와 직접 상호작용하는 식물병 저항성 관련 유전자를 스크리닝하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적과 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자 (*CaSGT1*)를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 (*CaSGT1*)를 제공한다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질 (*CaSGT1*)을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 본 발명의 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 이 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 본 발명의 유전자 또는 본 발명의 *CaSGT1* 단백질 중 코드 에스지티원 도메인 (CHORD-Sgt1 domain; CS 도메인)을 코딩하는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를, 이스트 투-하이브리드(yeast two-hybrid)를 위한 벡터인 pGADT7에 삽입시켜 제조한 재조합 벡터를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 본 발명의 유전자를 BiFC(Bimolecular Fluorescence Complementation Assay)를 위한 벡터 pSCYCE 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합 벡터 pSCYCE:*CaSGT1*를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 1) 세균성 점무늬병원균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성 단백질 에이브이알비에스티 (AvrBsT) 유전자와 저항성 관련 후보 유전자를 동일 세포주에 도입하는 단계; 2) 상기 세포주에서 AvrBsT 단백질과 저항성 관련 후보 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 결합수준을 확인하는 단계; 및 3) AvrBsT 단백질과 저항성 관련 후보 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 결합수준을 대조군과 비교하여 증가시키는 유전자를 선별하는 단계를 포함하는 식물병 저항성 관련 유전자의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0019] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0020] 본 발명은 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang) 식물이 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되어 세균의 비병원성 단백질 에이브이알비에스티 (AvrBsT)와 상호작용하는 신규 저항성 관련 유전자인 씨에이에스지티1 (*CaSGT1*: *Capsicum annuum* Suppressor of *G* Two allele of *SKP1* 1)을 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 고추식물과 모델식물이 *Nicotiana benthamiana* 와 형질전환 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaSGT1* 유전자의 식물병 저항성 유도 기능을 확인하여 완성되었다.
- [0021] 먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균의 비병원성 균주 집중에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리를 이용하여 yeast two-hybrid screening을 수행하여 점무늬병균의 비병원성 단백질인 AvrBsT와 상호작용하는 cDNA 클론을 동정하였다. 이 클론을 yeast 세포에서 분리 정제하여 유전자의 염기서열을 해독함으로써, *CaSGT1*으로 명명된 고추 녹광품종의 씨에이에스지티1 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그에 따른 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).
- [0022] 본 발명의 *CaSGT1* 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 식물의 에스지티1에서 전형적으로 나타나는 테트라트라이코펩타이드 리피트 도메인 (tetratricopeptide repeat domain; TPR 도메인), 코드 에스지티원 도메인 (CHORD-Sgt1 domain; CS 도메인) 그리고 에스지티원 스페시픽 도메인 (Sgt1 specific domain; SGS 도메인)을

가지고 있었다(도 1 참조).

- [0023] 또한, 본 발명은 상기 유전자(*CaSGT1*)를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 상기 재조합 벡터는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 pBIN35S:*CaSGT1*, pBIN35S:*CaSGT1*:GFP 또는 pTRV2:*CaSGT1*이다. 바람직하게는 상기 재조합벡터는 상기 유전자(*CaSGT1*)를 바이러스-유도 유전자 사일런싱(virus-induced gene silencing, VIGS)을 위한 벡터인 TRV2(Tobacco Rattle Virus 2) 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 TRV2:*CaSGT1*이다(도 5 참조).
- [0024] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 본 발명의 유전자 또는 본 발명의 *CaSGT1* 단백질 중 코드 에스지터원 도메인 (CHORD-Sgt1 domain; CS 도메인)을 코딩하는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를, 이스트 두-하이브리드(yeast two-hybrid)를 위한 벡터인 pGADT7에 삽입시켜 제조한 재조합 벡터를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 본 발명의 유전자를 BiFC(Bimolecular Fluorescence Complementation Assay)를 위한 벡터 pSCYCE 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합 벡터 pSCYCE:*CaSGT1*를 제공한다.
- [0026] 나아가, 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터를 이용하여 제조한 형질전환된 식물체를 제공한다. 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 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-코딩된)입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 생물적, 화학적 또는 환경스트레스 처리를 한 식물체로부터 mRNA를 분리하여 *CaSGT1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병 또는 화학물질 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병의 병원성, 비병원성 세균 그리고 고추 역병의 난균 등의 병원균을 예로 들 수 있다. 상기 화학적 처리는 식물 호르몬인 에틸렌 또는 살리실산(salicylic acid)을 예로 들 수 있다. 상기 환경스트레스 처리는 건조 또는 염을 예로 들 수 있다. 상기 *CaSGT1* 유전자 발현 여부는 노던 블롯, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 바람직하게 본 발명은 식물체의 병저항성 탐색 방법에 있어서, 생물적, 화학적, 또는 환경스트레스를 처리한 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. 따라서 본 발명에 의한 *CaSGT1* 유전자는 식물체의 병 또는 화학물질 저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기의 *CaSGT1* 유전자 발현을 억제하는 재조합 벡터를 이용하여 고추식물에서 특이적으로 *CaSGT1* 유전자가 억제된 식물체를 제작하고 병 저항성이 감소하는 것을 확인하고, *CaSGT1* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성 증대를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 *CaSGT1* 유전자 발현을 유도하는 재조합 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체에 병 저항성을 부여하는 방법도 제공한다.
- [0029] 보다 구체적으로 본 발명은 바이러스 유도 유전자 억제 기술(virus-induced gene silencing (VIGS))에 이용되는 TRV(Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaSGT1* 유전자를 TRV2 벡터(참고문헌: Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2:109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2:*CaSGT1*를 제작하였다. 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 *CaSGT1*의 발현이 억제된 VIGS 식물체를 제조하여 저항성이 감소하는 것을 확인하고 형질전환 식물체를 제공할 수 있었다 (도 5 ~ 도 8 참조).
- [0030] 나아가 본 발명에 의한 *CaSGT1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S:*CaSGT1*)와 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여, 애기장대 식물에서의 형질전환 발현(transgenic

expression)을 통한 *CaSGT1* 유전자의 식물체 병저항성 증가 기능을 확인하였다(도 10 ~ 도 12 참조).

- [0031] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 1) 세균성 점무늬병원균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성 단백질 에이브이알비에스티 (AvrBsT) 유전자와 저항성 관련 후보 유전자를 동일 세포주에 도입하는 단계; 2) 상기 세포주에서 AvrBsT 단백질과 저항성 관련 후보 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 결합수준을 확인하는 단계; 및 3) AvrBsT 단백질과 저항성 관련 후보 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 결합수준을 대조군과 비교하여 증가시키는 유전자를 선별하는 단계를 포함하는 식물병 저항성 관련 유전자의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0032] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 단계 2)의 단백질의 결합수준은 면역침전법(immunoprecipitation), 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블랏(Western Blotting), Glutathione-S-Transferase(GST) pull down 분석, 단백질 칩(Protein Chip), 형광 공명 에너지 전이(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET), 이분자 형광 상보(Bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 및 이스트 투-하이브리드(Yeast two-hybrid, Y2H)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 상기 방법에서 세포주는 이스트 또는 식물 세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 고추의 *SGT1*(*Suppressor of G Two allele of SKP1*) 유전자를 이스트 투-하이브리드(yeast two-hybrid)를 위한 벡터인 pGADT7에 삽입시켜 제조한 재조합 벡터 pGADT7:*CaSGT1*를 pGBKT7:*AvrBsT*와 동시에 도입시킨 이스트(yeast)를 알라닌, 히스티딘, 로이신, 트립토판이 없는 선발 배지(SD-AHLT)에서 생육시키고 알파-갈락토시다아제 활성 정도를 확인하여 *SGT1*과 *AvrBsT* 상호작용을 이스트에서 검정하였다(도 2 참조).
- [0035] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 *CaSGT1* 유전자를 pSCYCE 벡터와 pSCYCE의 형광단백질을 제거한 벡터에 도입하여 pSCYCE:*CaSGT1* 과 p35S:*CaSGT1:HA*를 제작하고, *AvrBsT* 유전자를 pVYNE 벡터와 pVYNE의 형광단백질을 제거한 벡터에 도입하여 pVYNE:*avrBsT*와 p35S:*avrBsT::mYc*을 제작하여, *CaSGT1*과 *AvrBsT*를 Bimolecular Fluorescence Complementation Assay (BiFC)와 coimmunoprecipitation analysis (Co-IP)를 수행하여, 식물체 내에서 상호작용을 검정하였다(도 3 및 도 4 참조).
- [0036] 상술한 바와 같이 본 발명에서 *CaSGT1*가 AvrBsT와 상호작용을 하며 동시 발현시 세포사멸효과가 우수하여, 식물의 병저항성 조절에 중추적 역할을 한다는 것을 확인하고 *CaSGT1*의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 병생성 관련 단백질 (PR protein)의 유전자 정보를 축적할 수 있게 되어 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병저항성이 증진되는 생명공학작 식물 을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

- [0037] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 세균의 비병원성 단백질 에이브이알비에스티 (AvrBsT)와 상호작용하여 세포사멸을 유도할 수 있는 신규 저항성 관련 유전자인 씨에이에스지티1 (*CaSGT1: Capsicum annuum Suppressor of G Two allele of SKP1 1*) 유전자를 제공하여 저항성 식물 품종 개발, 형질전환 식물체 제작 및 병저항성 탐색방법에 기여하는 효과를 기대할 수 있게 된다.
- [0038] 따라서 본 발명은 저항성 품종 개발에 있어 신규 유전자원을 제공하는 효과가 있어 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 *SGT1* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,
- 도 2는 본 발명에 의한 이스트 투-하이브리드(yeast two-hybridization) 결과를 나타낸 도면이고,
- 도 3은 *N. benthamiana* 세포에서 BiFC 결과를 나타낸 도면이고,

도 4는 *N. benthamiana* 세포에서 추출한 단백질을 Co-IP한 결과를 나타낸 도면이고,

도 5는 virus-induced gene silencing (VIGS)의 방법을 사용하여 *CaSGT1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)의 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 병 감수성이 증대되어 과민성 반응이 사라진 것을 나타낸 도면이고,

도 6은 *CaSGT1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 감염 고추 잎 조직에서의 세균 성장을 나타낸 그래프이고,

도 7은 *CaSGT1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, *CaSGT1*의 효과적인 발현 억제와 저항성 관련 유전자의 발현 차이를 나타낸 결과 그래프이고,

도 8은 *CaSGT1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 살리실산 축적량을 정량한 결과를 나타낸 그래프이고,

도 9는 상기의 재조합벡터 pBIN35S:*CaSGT1* 그리고 pBIN35S:*avrBsT* 와 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 균주를 이용하여 *Nicotiana benthamiana* 식물에서 *CaSGT1* 그리고 *avrBsT* 유전자를 여러 조합으로 과발현시켰을 때, 세포사멸에 따른 전해질 유출로 인한 전도율 변화를 측정한 결과를 나타낸 도면이고,

도 10은 형질전환 애기장대 식물에서 *CaSGT1* 유전자가 과다발현되는 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 11은 *CaSGT1* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 균주 접종시 식물체 내에서 병원균 성장을 검정한 결과를 나타낸 그래프이고,

도 12는 *CaSGT1* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 노균병균 하이알로페로노스포라 아라비돕시스 디스 노코2 (*Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2) 균주 접종시 식물체 내에서 병원균 성장을 검정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1] *CaSGT1* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정

[0042] 고추세균성점무늬병에 대한 병저항성 관련 단백질 중 하나인 씨에이에스지티1 (*CaSGT1*: *Capsicum annuum* *Suppressor of G Two allele of SKP1 1*) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0043] 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성세포사멸반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.

[0044] 다음에, 이 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리를 이용하여 yeast two-hybrid screening을 수행하여 점무늬병균의 비병원성 단백질인 AvrBsT와 상호작용하는 cDNA 클론을 동정하였다. 이 클론을 yeast 세포에서 분리 정제하여 수득하였다.

[0045] 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 SGT1 단백질 코딩 유전자를 확인하고 씨에이에스지티1 (*CaSGT1*) 유전자로 명명하였다. *CaSGT1* 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 식물의 씨에이에스지티1에서 전형적으로 나타나는 테트라트라이코펩타이드 리피트 도메인 (tetra-tricopeptide repeat domain; TPR 도메인), 코드 에스지티원 도

메인 (CHORD-Sgt1 domain; CS 도메인) 그리고 에스지티원 스페시픽 도메인 (Sgt1 specific domain; SGS 도메인)을 가지고 있었고, 담배 (*Nicotiana tabacum*)의 SGT1 (accession no. AA085509)과는 단백질 수준에서 79 %, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 SGT1a (accession no. AAL33611)와는 단백질 수준에서 63 %의 상동성을 나타냄으로써 신규임을 알 수 있었다 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, nucleotide blast program). 확인된 *CaSGT1*의 유전자 염기서열(서열번호 1)과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 도 1에 나타내었다.

[실시예 2] *CaSGT1*과 *AvrBsT*의 물리적 상호작용 확인

상기 실시예 1에서 수득한 *CaSGT1* 단백질과 *AvrBsT* 상호작용을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[단계 1]

*AvrBsT*가 *CaSGT1*의 어느 부분과 상호작용하는지 알아보기 위하여, *CaSGT1*의 3개의 도메인 중에서 각각 1개씩 혹은 2개씩 조합한 *CaSGT1* 조각을 Yeast two-hybrid vector에 삽입하여 *AvrBsT*와 상호작용하는지 알아보았다. pGADT7:*CaSGT1* 조각과 pGBKT7:*AvrBsT*를 동시에 도입시킨 yeast를 알라닌, 히스티딘, 로이신, 트립토판이 없는 선발 배지(SD-AHLT)에서 생육시키고 알파-갈락토시다아제 활성 정도를 확인하여 상호작용 강도를 결정하였다 (도 2).

pGADT7 vector (Clontech)는 제한효소 *NdeI/XhoI*로 자른 후 에탄올 침전 (ethanol precipitation)을 수행하고 살균수에 녹여 다시 DNA를 회수하였다. *CaSGT1*의 염기서열 전체 또는 5개의 부분 조각 뉴클레오타이드 (1: ATGGCGTCCGATCTCTCAACAAAAGCTAAAGAAGCATACATCGACGATCACTTTGAACTCGCCGTTGACCTGTACTCTCAAGCCATTGCTGTTACTCCTAAT AATCCAGAAGCTTTTCGCTGACCGTGCTCAAGCTAATATCAAACCTCCACAACCTCACCGAAGCTGTTACTGATGCAAAACACGGCGATTGAGTTAGATCCATCA ACGGCAAAAGCATATATGCGCAAGGGTTTGGCCTGTATGGAAGTGAAGAGTACCAAAGCTGCGAAGGCAGCTCTGAAAGCTGGTGCTTCTTTAGCACCAGGA GAATCAAGATTCACTAGCTTAATCAAGAATGTGATGAACACATTGCAGGAAAA (서열번호 3); 2: ATGGCGTCCGATCTCTCAACAAAAGCTAAAGAAGCATACATCGACGATCACTTTGAACTCGCCGTTGACCTGTACTCTCAAGCCATTGCTGTTACTCCTAAT AATCCAGAAGCTTTTCGCTGACCGTGCTCAAGCTAATATCAAACCTCCACAACCTCACCGAAGCTGTTACTGATGCAAAACACGGCGATTGAGTTAGATCCATCA ACGGCAAAAGCATATATGCGCAAGGGTTTGGCCTGTATGGAAGTGAAGAGTACCAAAGCTGCGAAGGCAGCTCTGAAAGCTGGTGCTTCTTTAGCACCAGGA GAATCAAGATTCACTAGCTTAATCAAGAATGTGATGAACACATTGCAGGAAAAAGCTGGAGAATTGCCTAACTGCTGCAAAACCAAAATACAGGCATGAATT CTATCAGAAACAGACGAGGTGGTGGTAACCATATTTGCCAAGGGTATACCTGCCAAGAATGTTTCAGTTGACTTTGGCGAACAAATACTTAGTGTTAGCAT TGATATACCAGGCGAAGTTGCATACCTTTCCAGCCTAGGTTGTTCCGTAAGATAATACCTCAAAAATGCAGATATGAAGTTATGTCTACCAAAATTTGAGAT TCGCCTTGCTAAAGCTGAATCTGTACACTGGACAACCCCTTGAGTATACTAG (서열번호 4); 3: GCTGGAGAATTGCCTAACTGCTGTCAAACCAAAATACAGGCATGAATTCTATCAGAAACAGACGAGGTGGTGGTAACCATATTTGCCAAGGGTATACCTGC CAAGAATGTTTCAGTTGACTTTGGCGAACAAATACTTAGTGTTAGCATTGATATACCAGGCGAAGTTGCATACCTTTCCAGCCTAGGTTGTTCCGTAAGAT AATACCTCAAAAATGCAGATATGAAGTTATGTCTACCAAAATTTGAGATTCGCCTTGCTAAAGCTGAATCTGTACACTGGACAACCCCTTGAGTATACTAG (서열번호 5); 4: GCTGGAGAATTGCCTAACTGCTGTCAAACCAAAATACAGGCATGAATTCTATCAGAAACAGACGAGGTGGTGGTAACCATATTTGCCAAGGGTATACCTGC CAAGAATGTTTCAGTTGACTTTGGCGAACAAATACTTAGTGTTAGCATTGATATACCAGGCGAAGTTGCATACCTTTCCAGCCTAGGTTGTTCCGTAAGAT AATACCTCAAAAATGCAGATATGAAGTTATGTCTACCAAAATTTGAGATTCGCCTTGCTAAAGCTGAATCTGTACACTGGACAACCCCTTGAGTATACTAGGGA TATTGCTGTAGTACAGAGGCCAAATGTGTCATCAGGCAGCTATAAGCCTAGCTACCCCTTCTCTAAATTGAGATGCAAGGATTGGGATAAACTAGAGGCTCA AGTAAAAAGGAGGAAAAAGAAGAAAACTGGATGGAGATGCAGCATTGAACAAATTTTCCGAGATATTTACAAAGATGCTGATGAGGATGCAAGAAGAGC TATGATGAAATCATTGTGGAATCAAATGGGACTGTTCTGTCCACAACCTGGAAGAGGTTGGTACTAAGAAGGTGGAAGGAAGCCCTCCAGATGGCATGGA GCTGAAGCAATGGGAATAC (서열번호 6); 5: GGATATTGCTGTAGTACAGAGGCCAAATGTGTCATCAGGCAGCTATAAGCCTAGCTACCCCTTCTCTAAATTGAGATGCAAGGATTGGGATAAACTAGAGGC TCAAGTAAAAAGGAGGAAAAAGAAGAAAACTGGATGGAGATGCAGCATTGAACAAATTTTCCGAGATATTTACAAAGATGCTGATGAGGATGCAAGAAG AGCTATGATGAAATCATTGTGGAATCAAATGGGACTGTTCTGTCCACAACCTGGAAGAGGTTGGTACTAAGAAGGTGGAAGGAAGCCCTCCAGATGGCAT GGAGCTGAAGCAATGGGAATAC (서열번호 7)) 부위 양쪽에 제한효소 *NdeI* (CATATG)와 *XhoI* (CTCGAG) 서열을 붙여 중 합효소연쇄반응 (PCR)를 통해 증폭시키고 Invitrogen에서 제공하는 pCR2.1-TOPO vector에 삽입시켰다. 이 TOPO vector를 제한효소 *NdeI/XhoI*로 자른 후 나온 절편을 ligase를 이용하여 pGADT7 vector에 삽입하여 pGADT7:*CaSGT1* 재조합 벡터를 생성하였다.

pGBKT7 vector (Clontech)는 제한효소 *NdeI/XhoI*로 자른 후 에탄올 침전 (ethanol precipitation)을 수행하고 살균수에 녹여 다시 DNA를 회수하였다. *AvrBsT*의 염기서열 전체 뉴클레오타이드 양쪽에 제한효소 *NdeI* (CATATG)

와 *XhoI* (CTCGAG) 서열을 붙여 중합효소연쇄반응 (PCR)를 통해 증폭시키고 Invitrogen에서 제공하는 pCR2.1-TOPO vector에 삽입시켰다. 이 TOPO vector를 제한효소 *NdeI/XhoI*로 자른 후 나온 절편을 ligase를 이용하여 pGBKT7 vector에 삽입하여 pGBKT7:*avrBsT* 재조합 벡터를 생성하였다.

[0052] pGADT7:*CaSGT1*과 pGBKT7:*avrBsT*가 도입된 yeast에서는 AD:*CaSGT1* 과 BD:*AvrBsT* 퓨전 단백질이 생성되며, AD:*CaSGT1*과 BD:*AvrBsT*가 상호작용하게 되면 퓨전된 activation domain (AD)와 binding domain (BD)가 작동하여 reporter gene인 알파-갈락토시다아제가 발현된다. 알파-갈락토시다아제는 세포 밖으로 분비되므로 X-알파-갈락토오스 또는 로-니트로페닐-알파-디-갈락토오스 기질을 분해하여 파란색 또는 노란색 발색반응으로 알파-갈락토시다아제 활성을 검정할 수 있다. 선발배지에서 X-알파-갈락토오스 분해로 파란색 발색을 보인 균을 액체 배양하여 그 상등액을 가지고 로-니트로페닐-알파-디-갈락토오스 분해도를 측정하여 알파-갈락토오스 활성을 정량화 하였다. 상등액과 소듐 아세테이트 버퍼 그리고 로-니트로페닐-알파-디-갈락토오스를 섞어주고 30도씨에서 1시간 반응시킨 후 정지시킨 다음, OD₄₁₀ 값을 측정하여 알파-갈락토시다아제에 의해 생성된 로-니트로페놀의량을 측정하였다.

[0053] 그 결과 음성 대조군인 Lam과 SV40-T는 선발배지에서 생장을 못하고 갈락토오스를 분해하지 못하여 발색반응이 나타나지 않았으며 알파-갈락토시다아제 활성이 거의 없었으며 이 정도를 1로 설정하였다. 양성 대조군인 p53과 SV40-T는 선발배지에서 왕성히 성장하고 갈락토오스를 분해하여 푸른 발색반응을 보였다. 알파-갈락토시다아제 활성도 음성 대조군에 비하여 46배 강한 활성을 보였다. *AvrBsT*와 온전한 *CaSGT1*은 선발배지에서 왕성히 성장하고 푸른 발색을 보이며 음성 대조군에 비하여 약 7배 강한 알파-갈락토시다아제 활성을 보였다. *AvrBsT*는 *CaSGT1*의 CS 도메인을 포함하는 중앙 부위의 조각과 가장 상호작용 강도가 높아 음성 대조군에 비하여 약 33배 강한 알파-갈락토시다아제 활성을 보였다. 반면 SGS도메인을 포함하는 조각과는 12배, 그리고 TPR 도메인을 포함하는 조각과는 약 3배 강한 알파-갈락토시다아제 활성을 보여 *AvrBsT*가 *CaSGT1*의 중앙부위와 가장 강하게 상호작용하는 것을 알 수 있었다.

[실시예 3] *CaSGT1*과 *AvrBsT*의 식물체 내에서의 상호작용 확인

[0055] *CaSGT1*과 *AvrBsT*가 식물체내에서 상호작용하는지 알아보기 위하여, *CaSGT1*과 *AvrBsT*를 Bimolecular Fluorescence Complementation Assay (BiFC)와 coimmunoprecipitation analysis (Co-IP)를 수행하였다. BiFC 기법은 온전한 형광단백질의 반절씩만 가진 벡터에 각각 다른 유전자를 퓨전시켜 발현시켰을 때 이들 단백질들이 결합하면 반반씩 가지고 있던 형광 단백질이 재구성되어 온전한 형광신호가 나오는 현상을 이용하여 단백질 간의 상호작용을 검정하는 기법이다. *CaSGT1* 유전자를 pSCYCE벡터와 pSCYCE의 형광단백질을 제거한 벡터에 도입하여 pSCYCE:*CaSGT1* 과 p35S:*CaSGT1:HA*를 제작하였다. *AvrBsT* 유전자를 pVYNE 벡터와 pVYNE의 형광단백질을 제거한 벡터에 도입하여 pVYNE:*avrBsT* 와 p35S:*avrBsT:cMyc*을 제작하였다.

[0056] pSCYCE vector (하단 참고문헌)는 제한효소 *SpeI/XhoI* 또는 *SpeI/SacI*로 자른 후 에탄올 침전 (ethanol precipitation)을 수행하고 살균수에 녹여 다시 DNA를 회수하였다. *CaSGT1*의 염기서열 전체 양쪽에 제한효소 *SpeI* (ACTAGT) 와 *XhoI* (CTCGAG) 또는 *SacI* (GAGCTC) 서열을 붙여 중합효소연쇄반응 (PCR)를 통해 증폭시키고 Invitrogen에서 제공하는 pCR2.1-TOPO vector에 삽입시켰다. 이 TOPO vector를 제한효소 *SpeI/XhoI*로 자른 후 나온 절편을 ligase를 이용하여 pSCYCE vector에 삽입하여 pSCYCE:*CaSGT1* 재조합 벡터를 생성하였다. 또한 TOPO vector를 제한효소 *SpeI/SacI*로 자른 후 나온 절편을 ligase를 이용하여 pSCYCE vector에 삽입하여 p35S:*CaSGT1:HA* 재조합 벡터를 생성하였다.

[0057] pVYNE vector (하단 참고문헌)는 제한효소 *SpeI/XhoI* 또는 *SpeI/SacI*로 자른 후 에탄올 침전 (ethanol precipitation)을 수행하고 살균수에 녹여 다시 DNA를 회수하였다. *AvrBsT*의 염기서열 전체 양쪽에 제한효소 *SpeI* (ACTAGT) 와 *XhoI* (CTCGAG) 또는 *SacI* (GAGCTC) 서열을 붙여 중합효소연쇄반응 (PCR)를 통해 증폭시키고 Invitrogen에서 제공하는 pCR2.1-TOPO vector에 삽입시켰다. 이 TOPO vector를 제한효소 *SpeI/XhoI*로 자른 후 나온 절편을 ligase를 이용하여 pVYNE vector에 삽입하여 pVYNE:*avrBsT* 재조합 벡터를 생성하였다. 또한 TOPO vector를 제한효소 *SpeI/SacI*로 자른 후 나온 절편을 ligase를 이용하여 pVYNE vector에 삽입하여 p35S:*avrBsT:cMyc* 재조합 벡터를 생성하였다. (참고문헌 : Waadt R. et al. (2008) Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. The Plant Journal 56: 505-516).

[0058] 이들 벡터를 *Agrobacterium tumefaciense* strain GV3101에 전기천공법 (electroporation)을 통하여 도입하고

다시 재조합백터가 들어가 있는 GV3101 균주를 *Nicotiana benthamiana*의 잎에 주사기를 이용, infiltration 방법으로 접종하여 일시적으로 유전자의 발현을 유도시켰다. BiFC는 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰하고 Co-IP는 단백질을 추출하여 cMyc 항원-아가로스로 침강시켜 상대 단백질의 존재 여부를 조사하였다.

[0059] [단계 1]

[0060] BiFC 백터를 가지고 있는 GV3101 균주를 *N. benthamiana* 잎에 균을 침투시킨 후 48시간 후에 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰 한 결과 CaSGT1과 AvrBsT가 결합하여 형광 단백질이 재구성되어 온전한 녹색 형광신호를 검출할 수 있었다 (도 3). 또한 Co-IP 실험결과 CaSGT1:HA 단백질이 AvrBsT:cMyc이 같이 발현되었을 때만 cMyc 항원-아가로스에 같이 침강되는 것으로 나타났다 (도 4). 이 결과는 CaSGT1이 AvrBsT와 식물체내에서 서로 결합하여 상호작용하는 것을 의미한다.

[0061] [실시에 4] 바이러스 유래 백터를 이용한 *CaSGT1* 유전자 발현의 억제와 그에 따른 병 저항성의 변화

[0062] 고추식물에서 *CaSGT1* 유전자의 발현이 특이적으로 억제되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 발현감소 여부 및 병에 대한 감수성의 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시에 1에서 수득한 *CaSGT1* 유전자를 Virus-induced gene silencing (VIGS)에서 이용되는 TRV (Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaSGT1* 유전자를 TRV2 백터에 도입시켜 재조합 백터인 TRV2:*CaSGT1*을 제조하였다.

[0063] TRV2 vector는 제한효소 *EcoRI*로 자른 후 에탄올 침전 (ethanol precipitation)을 수행하고 살균수에 녹여 다시 DNA를 회수한 후에 alkaline phosphatase로 탈인산화시켰다. *CaSGT1*의 염기서열 중 236개 뉴클레오타이드 (ATCAAGATTCAGCTTAATCAAAGAATGTGATGAACACATTGCAGGAAAGCTGGAGAATTGCCTAAGCATGCAACAGTTGAAACCTCAGCAAGTGTGTCCTCTGTGAATCAAAGTCACTGGATAATGTTGCTGCTGTACAAAAGATACTCAACTGGCTTATAAATCCTGTGAAAGAACCTGTGTCAAACCAAATACAGGCATGAATTCTATCAGAAACCAGACG; 서열번호 8) 부위 양쪽에 제한효소 *EcoRI* (GAATTC) 서열을 붙여 중합효소 연쇄반응 (PCR)를 통해 증폭시키고 Invitrogen에서 제공하는 pCR2.1-TOPO vector에 삽입시켰다. 이 TOPO vector를 제한효소 *EcoRI*로 자른 후 나온 절편을 ligase를 이용하여 TRV2 vector에 삽입하여 TRV2:*CaSGT1* 재조합 백터를 생성하였다. 유전자가 삽입되지 않은 공백터인 TRV2는 대조구로 이용하였다 (참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113).

[0064] 이렇게 제조한 재조합백터 TRV2:*CaSGT1*을 *Agrobacterium tumefaciense* strain GV3101에 전기천공법을 통하여 도입하고 다시 재조합백터가 들어가 있는 GV3101 균주를 고추 유묘 (seedling)의 떡잎에 주사기를 이용, infiltration방법으로 접종하여 고추식물에 도입함으로써 *CaSGT1* 유전자의 발현의 억제를 유도시켰다.

[0065] [단계 1]

[0066] *CaSGT1*의 발현이 억제된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성의 변화를 알아보기 위하여 상기의 *CaSGT1*의 유전자의 발현이 억제된 고추 식물과 대조구로서 TRV2:00 백터를 접종한 고추 녹광품종에 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)를 10^8 cfu ml⁻¹의 농도로 접종한 후 2일 이후 접종 잎의 병징을 관찰하였고, 5×10^4 cfu ml⁻¹로 접종하여 접종 후 0, 3, 6일에 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하였다. 그리고 병원균을 10^7 cfu ml⁻¹로 접종하여 접종 이후 12, 24시간 후에 실험구와 대조구의 감염 잎을 잎에서 RNA를 추출하여 양적 실시간 알티-피시알 (quantitative realtime RT-PCR)을 통해 *CaSGT1*의 특이적인 유전자 억제 효과와 함께 병 접종시 대조구 식물과 비교하여 병저항성 관련 유전자의 발현 차이를 관찰하였다 (도 7). 또한 동일한 시점에 시료로부터 살리칠산을 HPLC 기법으로 정량하여 병 저항성 관련 호르몬 축적의 변동사항을 관찰하였다 (도 8).

[0067] 도 5에서와 같이 실험결과 VIGS로 *CaSGT1*의 발현이 억제된 식물에서 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 접종 후 병징을 관찰한 결과, 비병원성 균주 접종시 대조구 식물에서 2일째 국부적 저항성 반응으로 세포사멸이 나타나지만 *CaSGT1*의 발현이 억제된 식물에서는 국부적 세포사멸이 발생하지 않은 것을 관찰하였다. 그리고 도 6에서와 같이 감염조직에서 병원성 균과 비병원성 균의 세균 생장을 측정한 결과 대조구에 비교하여 *CaSGT1*의 발현이 억제된 식물에서 비병원성 세균의 생장이 현저히 증가하였다. 알티-피시알 시험 결과 도 7과 같이, *CaSGT1*이 억제된 식물에서 효과적으로 유전자의 억제가 나타나는 것이 관찰되었고, *CaPR1* 같은 병 저항성 마커 유전자의 발현이 줄어든 것으로 나타났다. 대표적인 식물 방어 호르몬인 살리칠산의 축적량도 *CaSGT1*이 억제된

식물에서 현저히 감소하였다 (도 8).

[0068] [실시예 5] *CaSGT1* 과 *AvrBsT* 동시발현시 세포사멸 변화

[0069] 모델식물로 사용되는 *Nicotiana benthamiana* 식물체에서 *AvrBsT* 단백질은 세포사멸을 일으킨다. *AvrBsT*와 상호 작용하는 *CaSGT1*이 *AvrBsT*가 일으키는 세포사멸에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 동시에 발현시켜서 세포사멸의 변동사항을 확인하였다. 실시예 1에서 수득한 *CaSGT1* 유전자를 식물 과발현용 pBIN35S 벡터에 도입시켜 pBIN35S:*CaSGT1*를 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S:*CaSGT1*을 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101에 전기 천공법을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 기존의 pBIN35S:*avrBsT* 함유 균주와 섞어 4주차 *Nicotiana benthamiana* 잎에 접종하여 일시적으로 *CaSGT1*과 *avrBsT* 유전자의 과다발현을 유도시켜 시험을 수행하였다.

[0070] [단계 1]

[0071] *CaSGT1*을 과발현하는 재조합벡터 (35S:*CaSGT1*), *avrBsT*를 과발현하는 재조합벡터 (35S:*avrBsT*)와 어떠한 유전자도 과발현하지 않는 대조구 벡터 (35S:*EV*)를 이용하여 형질전환 시킨 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101을 Yeast-Peptone (YEP: yeast extract 10g, peptone 10g, sodium chloride 5g/L) 배지에서 진탕배양 한 뒤 spectrophotometer를 이용하여 균주현탁액농도를 optical density 600 (OD₆₀₀) 에서 0.5로 맞추고 이를 여러 조합으로 섞어 *Nicotiana benthamiana* 잎에 각각 접종하고 0, 2 그리고 3일 뒤에 세포사멸에 의한 전해질 유출로 인한 전도율 증가를 측정하여 그 결과를 도 9에 나타내었다. 접종 2일째, *avrBsT*를 발현하는 *Agrobacterium*을 접종한 잎에서 세포사멸이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. *CaSGT1*을 발현하는 *Agrobacterium*을 접종한 잎에서는 세포사멸이 나지 않았다. 그런데 *avrBsT*와 *CaSGT1*를 섞어 접종한 잎에서 세포사멸이 *avrBsT* 혼자 접종한 수준 보다 높게 나타났다 (도 9).

[0072] [실시예 6] *CaSGT1* 유전자의 과다발현 형질전환 식물체의 제조 및 병저항성 변화

[0073] 모델식물로 사용되는 애기장대 식물체에서 *CaSGT1* 유전자의 과다발현시 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 5에서 제작한 pBIN35S:*CaSGT1*이 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 균주를 floral dipping 방법을 통하여 애기장대식물에 도입함으로써 *CaSGT1* 유전자의 과다발현을 유도시킨 형질전환 애기장대를 제작하고 아래와 같은 시험을 수행하였다.

[0074] *CaSGT1* 유전자가 과다 발현된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여, 상기 *CaSGT1* 유전자가 과다 발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에서 *CaSGT1* 유전자의 발현을 관찰하였으며 그 결과를 도 10에 나타내었다. #4, #5, #9 는 사용된 형질 전환 식물의 계통번호를 나타내고, 실험결과 *CaSGT1* 유전자가 과다 발현됨을 관찰할 수 있었다.

[0075] 상기와 같이 *CaSGT1*이 과다 발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주를 접종하고 감염조직에서 세균생장을 관찰한 결과 *CaSGT1* 유전자가 과다발현된 식물에서 세균 생장이 야생형 식물 감염조직에서의 세균생장보다 적은 것을 알 수 있었다 (도 11).

[0076] 상기와 같이 *CaSGT1*이 과다 발현된 식물에 하이알로페로노스포라 아라비돕시스 노코2 노균병 균주를 접종하고 감염조직에서 노균병 생장을 관찰한 결과 *CaSGT1* 유전자가 과다발현된 식물에서 노균병 생장이 야생형 식물 감염조직에서의 세균생장보다 적은 것을 알 수 있었다 (도 12).

[0077] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

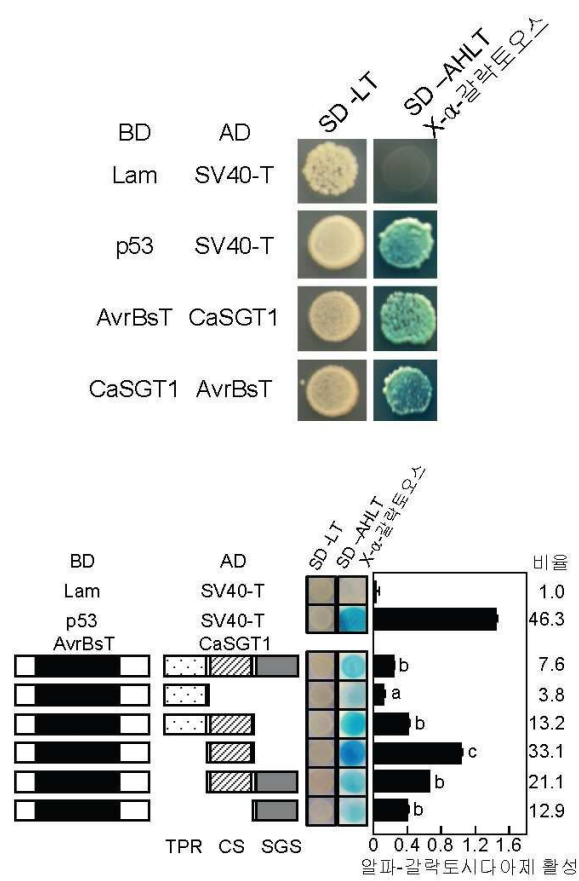
도면1

```

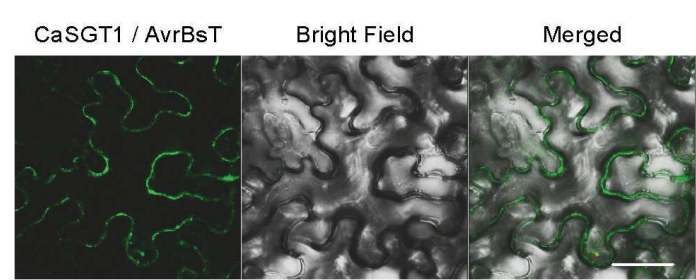
1          ctttttaaaaaatccccctccaataatcaccttttccctctc
39  tgcattctagaaactttcttctgcttctcgtctcatctcatctcctcc
74  ATGGCGTCCGATCTCTCAACAAAAGCTAAAGAAGCATACATCGAC
   M [A S D I S T K A K E A Y I D
119  GATCACTTTGAACTCGCCGTTAACCTGTACTCTCAAGCCATTGCT
   D H F E L A V N L Y S Q A I A
164  GTTACTCCTAATAATCCCGAACTTTTCGTTGACCGTGCTCAAGCT
   V T P N N] [P E L F V D R A Q A
209  AATATCAAACCTCCACAACCTTCACCGAAGCTGTTACTGATGCAAAC
   N I K L H N F T E A V T D A N
254  ACGGCGATTGAGTTAGATCCATCAACGGCAAACGCATATATGCGC
   T A I E L D P S T] [A N A Y M R
299  AAGGTTTGGCCTGTATGGAACCTGAAGAGTACCAAACCTGCGAAG
   K G L A C M E L E E Y Q T A K
344  GCAGCTCTGGAACCTGGTGCTTCTTTAGCACCAGGAGAATCAAGA
   A A I E T G A S L A P G E] S R
389  TTCACTAGCTTAATCAAAGAATGTGATGAACACATTGCAGGGAAA
   F T S L I K E C D E H I A G K
434  GCTGGAGAATTGCCTAAGCATGCAACAGTTGAAACCTCAGCAAGT
   A G E L P K H A T V E T S A S
479  GTTGTCCTCCTGCTGAATCAAAGTCACTGGATAATGTTGCTGCT
   V V P P A E S K S L D N V A A
524  GTTACAAAGATACCCAACCTGGCTTATAAATCCTGTGAAAGAACA
   V T K D T Q L A Y K S C E R T
569  CCTGCTGTCAAACCAAATACAGGCATGAATTCTATCAGAAACCA
   P A V [K P K Y R H E F Y Q K P
614  GAGGAGGTGGTGGTAACCATATTTGCCAAGGTATACCTGCCAAG
   E E V V V T I F A K G I P A K
659  AATGTTTCAGTTGACTTTGGCGAACAAATACTTAGTGTTAGCATT
   N V S V D F G E Q I L S V S I
704  GATATACCAGGCGAAGTTGCATACTCTTCCAGCCTAGGTTGTTT
   D I P G E V A Y S F Q P R L F
749  GGTAAGATAATACCTCAAAAATGCAGATATGAAGTTATGTCTACC
   G K I I P Q K C R Y E V M S T
794  AAATTTGAGATTGCGCTTGCTAAAGCTGAATCTGTACACTGGACA
   K F E I R L A K A E S V H W T
839  ACCCTTGAGTATACTAGGGATATTGCTGTAGTACAGAGGCCAAAT
   T L E] Y T R D I A V V Q R P N
884  GTGTGATCAGGCGAGCTATAAGCCTAGCTACCCTTCCTCTAAATTG
   V S S G S Y K P [S Y P S S K I
929  AGATGCAAGGATTGGGATAAACTAGAGGCTCAAGTGAAAAAGGAG
   R C K D W D K I E A Q V K K E
974  GAAAAAGAAAGAAAACCTGGATGGAGATGCAGCATTGAACAAATTT
   E K E E K L D G D A A L W K E
1019  TTCCGAGATATTTACAAAGATGCTGATGAGGATGCAAGAAGAGCT
   F E D I Y K D A D E D A E R A
1064  ATGATGAAATCATTTGTGGAATCAAATGGGACTGTTCTGTCCACA
   M H K S F V E S N G T V I S T
1109  AACTGGAAGAGGTTGGTACTAAGAAGGTGGAAGGAAGCCCTCCA
   N W K E V G T K K V E G S P F
1154  GATGGCATGGAGCTGAAGCAATGGGAATACTAGaaastgtagctc
   D G N E I K Q W E Y] *
1199  ctctttatcttttgggaccatttctgcaatttctctttt

```

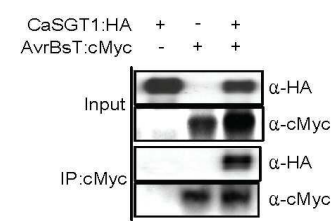
도면2



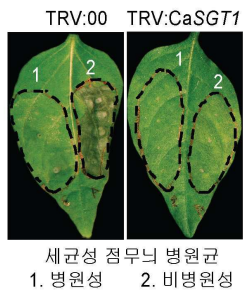
도면3



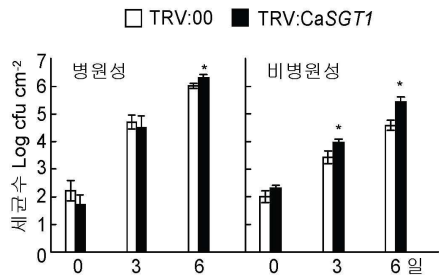
도면4



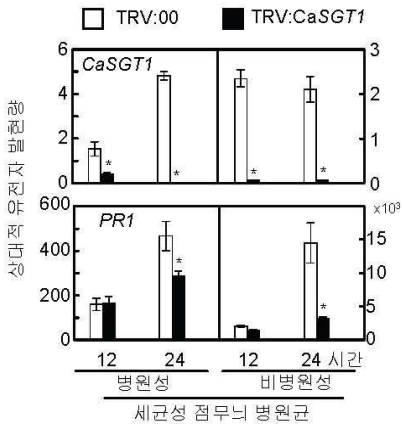
도면5



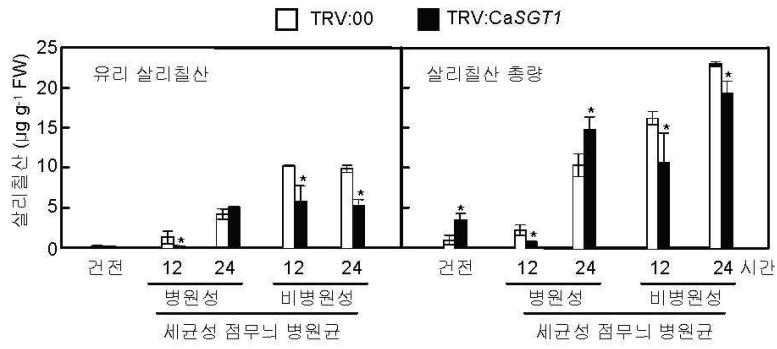
도면6



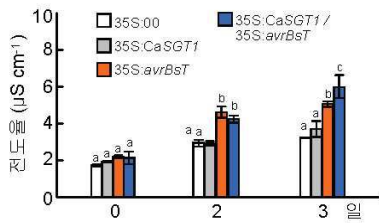
도면7



도면8



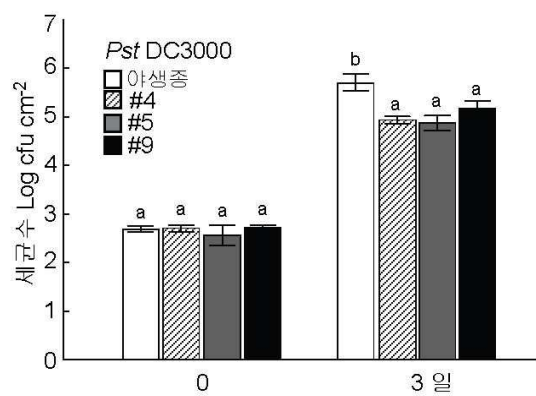
도면9



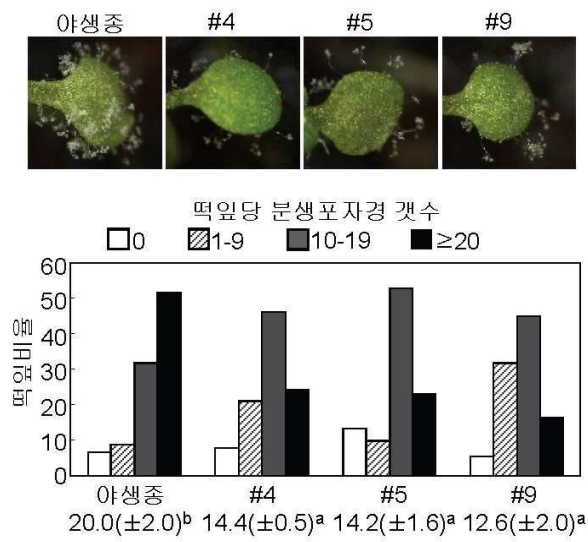
도면10



도면11



도면12



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)