



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0000624
(43) 공개일자 2012년01월04일

(51) Int. Cl.

A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0060964

(22) 출원일자 2010년06월28일

심사청구일자 2010년06월28일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 중암로 1 (안암동5가, 고려대역)

(72) 발명자

백경희

서울특별시 종로구 송인동길 21, 105동 1805호 (송인동, 종로청계힐스테이트)

최라미

서울특별시 성북구 인촌로5길 35-4 (보문동1가)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김선애

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 고추식물의 방어관련 식물특이 전사인자 유전자 CaWRKYd 및 이를 이용한 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 식물의 방어반응에 관련이 있으며 CaMK1과 상호작용하여 PMMoV-P₀에 의해 유도되는 방어반응에서 포지티브 조절자 (positive regulator)로써 기능하는 고추식물의 방어관련 식물특이 전사인자 유전자 CaWRKYd 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 본 발명은 저항성 식물체의 육종을 위한 재료를 제공하여 저항성을 갖는 식물체 제작 및 식물체의 방어 반응 메커니즘 연구에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

(72) 발명자

이길제

서울특별시 성북구 종암로25길 30, 108동 503호 (종암동, 삼성 래미안아파트)

임지혁

서울특별시 성북구 안암로 145, 생명과학대학 102호 (안암동5가, 고려대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100001459 /20090085565

부처명 한국연구재단 /한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 선도연구센터육성사업(이공학분야) /중견연구자지원_핵심연구(협동)

연구과제명 역유전학 및 상호작용에 의한 식물방어조절 신호전달 연구 /식물의 스트레스 반응 단백질에 대한 시스템생물학적 연구

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단 /고려대학교 산학협력단

연구기간 2010년 03월 01일 ~ 2011년 02월 28일 /2009년 09월 01일 ~ 2010년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

고추 유래 병 저항성 전사인자를 코딩하는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 코딩하는 분리된 유전자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 3

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질.

청구항 4

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제1항 기재의 유전자 또는 제4항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 6

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, 고추의 전사조절 유전자 *CaWRKYd*를 TRV 벡터에 재조합하여 구축된 VIGS (virus induced gene silencing)용 벡터 pTRV2-*CaWRKYd*.

청구항 7

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, 고추의 전사조절 유전자 *CaWRKYd*를 TRV 벡터에 재조합하여 구축된 VIGS (virus induced gene silencing)용 벡터 pTRV2-*CaWRKYd*로 형질전환되어 *CaWRKYd* 유전자의 발현이 억제된 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 고추식물의 방어관련 식물특이 전사인자 유전자 *CaWRKYd* 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 식물의 방어반응에 관련이 있으며 CaMK1과 상호작용하여 PMMoV-P₀에 의해 유도되는 방어반응에서 포지티브 조절자 (positive regulator)로써 기능하는 고추식물의 방어관련 식물특이 전사인자 유전자 *CaWRKYd* 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 병에 감염된 기주 식물은 여러 가지 세포내 대사 경로에서 방어기작을 작동시키게 되며, 기주식물과 식물병원균 간의 상호작용에서 병원균 감염초기에 친화적, 불친화적 반응으로 나뉘어 결정이 된다. 이러한 상호작용에 따라 병의 진전을 제한시킬 수 있는 저항성 (방어)반응의 여부가 결정되게 된다.

[0003] 불친화적 상호작용에서, 감염된 식물은 병원균의 침입을 인식(recognition)하고, 인식에 대한 반응으로 감염된 부위의 국부적 세포죽음과 같은 과민성 반응(hypersensitive response), 캘러스(callose)의 축적, 리그닌(lignin)화에 의한 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 피토알렉신(phytoalexin)과 같은 여러 종류의 항균성 물질을 생성하고, 병생성 관련 단백질[pathogenesis related (PR) protein]이라 불리는 방어관련 단백질을 생성하여 저항성 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0004] 이러한 식물들의 방어기작들은 병원균의 침입에서 뿐만 아니라, 살리실산, 메틸자스모네이트 등의 식물호르몬 자극에 의해서도 나타날 수 있으며, 물리적인 상처, 염도, 온도 등의 환경적 스트레스에 의해서도 나타나는 것

으로 보고되고 있다.

- [0005] 이러한 생물학적/물리적/환경적 스트레스에 대한 식물의 방어 반응 중에서 특히 식물이 병원체에 대하여 방어반응을 일으키는 데 중요한 역할을 하는 것은 식물과 병원균의 상호작용에 의한 식물의 병저항성의 발현과 이에 관련된 신호전달경로이다. 이러한 식물의 병 방어 기작 및 저항성 반응에 관련된 유전자가 어떻게 병원균을 인식하고, 어떠한 전달경로를 통하여 식물 전체에 반응하게 되는지 중요하게 연구되어져 왔으며, 이와 관련하여 생물학/생화학/세포생물학적인 방법을 이용한 병 방어(저항성) 유전자의 기능에 대한 연구가 이루어져 왔다.
- [0006] 식물 방어 반응의 일반적인 특징은 병원균 감염 또는 병원균 유도제 처리 시 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.
- [0007] 최근 연구에서 식물방어 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 위치 (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).
- [0008] 지난 15년 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).
- [0009] 이에 본 발명자들은 고추에서 최초로 분리된 WRKY 전사인자 유전자(*CaWRKY-a*)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 확인한 바 있다 (대한민국 특허 제10-0789846호). 그 외 고추 WRKY 전사인자로 CaWRKY1 (Oh et al., New Phytologist 2008) 및 CaWRKY2 (Oh et al., Mol. Cells, 2006) 등이 알려져 있다.
- [0010] 한편, 대표적인 가지과 작물로서 고추(*Capsicum annuum* L.)는 남아메리카 원산의 작물로서 열대와 온대지방에서 널리 재배된다. 고추의 최초 도입에 대해서는 정확히 알려져 있지 않지만 고추가 우리나라에 도입된 이후에 식생활에 매우 큰 영향을 끼쳤다. 특히 고추는 한국에서 가장 많이 재배되는 원예작물의 한가지로서 농업경제에 있어서 매우 중요한 작물이다. 이러한 고추식물에서 바이러스병, 세균병, 진균병 등이 다양하게 보고되어 있으며 실제로 병 발생에 의한 생산량 감소가 빈번히 일어난다. 그러나 현재까지 효과적인 병 저항성 작물은 보고되어 있지 않으며 식물보호를 위해서 화학적 방제에 의존적이다. 그러므로 전통적인 육종을 이용한 새로운 저항성 작물 개발을 위한 노력의 단점을 보완 할 수 있는 생명공학적인 기법을 이용한 효과적인 방어관련 유전자의 분리 및 형질전환 식물의 제작은 생산비 절감을 통한 농가소득의 증대효과 및 친환경시대에 맞는 고품질 청정작물의 생산을 가능하게 하며 이와 연계된 다양한 산업의 활성화에 기여할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 CaMK1과 상호작용하며 PMMoV-P₀에 의해 유도되는 방어반응에서 포지티브 조절자 (positive regulator)로써 기능하는 고추식물의 방어관련 식물특이 전사인자 유전자 *CaWRKYd*를 발견하고 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 본 발명의 목적은 고추식물의 방어관련 식물특이 전사인자 유전자 *CaWRKYd* 및 이에 의해 코딩되는 단백질을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 상기 유전자의 발현을 억제하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [0014] 더 나아가, 본 발명은 상기 *CaWRKYd* 유전자를 식물체에 도입하여 병 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제작하는 데 그 목적이 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명은 고추 유래 스트레스 저항성 전사인자를 코딩하는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 코딩하는 분리된 유전자를 제공한다.
- [0017] 상기 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0020] 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0021] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, 고추의 전사조절 유전자 *CaWRKYd*를 TRV 벡터에 재조합하여 구축된 VIGS (virus induced gene silencing)용 벡터 pTRV2-*CaWRKYd*를 제공한다.
- [0022] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, 고추의 전사조절 유전자 *CaWRKYd*를 TRV 벡터에 재조합하여 구축된 VIGS (virus induced gene silencing)용 벡터 pTRV2-*CaWRKYd*로 형질전환되어 *CaWRKYd* 유전자의 발현이 억제된 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0023] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.
- [0024] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 *CaWRKYd* 유전자, 그 상동형 유전자(homologs) 및 그 변이형 유전자(variants)를 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 *CaWRKYd* 단백질 또는 변이형 단백질(variants)을 제공한다. 상기 *CaWRKYd* 유전자의 "상동형 유전자(homologs)"는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 *CaWRKYd* 단백질에 대한 코딩 서열을 포함하는 유전자를 뜻한다. 따라서 상동형 유전자의 범주에는 발현 시 서열번호 2로 표시되는 *CaWRKYd* 단백질을 생산할 수 있는 모든 종류의 유전자가 포함된다. 상기 *CaWRKYd* 단백질의 "변이형 단백질(variants)"은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 *CaWRKYd* 단백질 중 하나 이상의 아미노산 잔기를 결실, 부가, 삽입 또는 치환시킨 단백질을 의미하며, 상기 *CaWRKYd* 유전자의 "변이형 유전자 (variants)"는 *CaWRKYd* 단백질의 변이형 단백질을 코딩하는 모든 유전자를 의미한다. 상기 *CaWRKYd* 단백질의 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것이 바람직하며, 상기 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하다(도 1).
- [0025] WRKY 전사인자 (transcription factor)는 식물에서 고유하게 발견되는 전사인자로 병원균에 의해 유도되는 방어 반응을 조절하는데 중요한 역할을 하고 있다. Yeast two hybrid screening 방법을 이용하여 고추 EST clone 들에서 *Capsicum annuum* MAP kinase1 (CaMK1)의 추정 기질 (putative substrate)을 코딩 (coding)하는 *CaWRKYd*를 찾아내었다.

- [0026] *CaWRKYd*는 하나의 WRKY 도메인과 Cys₂-His₂zinc-finger motif를 가지고 있는 WRKY group IIa에 속한다. *CaWRKYd*는 320 개의 아미노산 (서열번호 2)을 인코딩 (encoding)하는 963개의 뉴클레오타이드 (neucleotide)로 이루어진 하나의 ORF를 가지고 있으며, GFP-융합 단백질 타겟팅 (GFP-fused protein targeting) 실험을 통하여 핵 안에 위치하고 있다는 것을 알아내었다. 상기 아미노산 서열을 여러 식물에서 유래한 WRKY와 대비하였다 (도 2 및 3 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 본 발명에 의한 *CaWRKYd*가 식물체의 스트레스 저항성 유도 전사인자로서 작용할 것임을 추정할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 의한 *CaWRKYd*의 병저항성 관련 여부를 조사하기 위해 다양한 종류의 생물 또는 비생물 스트레스에 대한 상기 유전자의 발현 양상을 측정하였다.
- [0028] 우선 *CaWRKYd*는 고추에 저항성을 가지고 있는 PMMoV-P₀를 처리했을 때 발현이 증가되는 것으로 나타났다 (도 4 참조). *CaWRKYd*가 다른 자극물질을 처리할 경우에도 발현이 증가되는지 알아보기 위해 식물의 방어반응에 관련된 신호전달 경로 (signaling pathway)의 신호 (signal) 분자로 알려진 살리실산 (salicylic acid, SA), 에테폰 (ethephon), 그리고 메틸자스몬산 (methyl jasmonic acid, MeJA)을 처리하였다. 그 결과 *CaWRKYd*의 전사 (transcripts)는 SA와 MeJA 처리에 의해 매우 빠른 시간 내에 발현이 증가되며, 에테폰 (ethephon)을 처리했을 때 역시 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (도 7a 내지 도 7c 참조). 그리고 고추 잎에 상처를 주는 처리를 했을 때에도 *CaWRKYd*의 발현이 증가하였다 (도 7d 참조).
- [0029] 이상에서 본 발명에 의한 *CaWRKYd*는 다양한 스트레스에 의해 발현이 유도되며 식물 방어 반응에 중요 요소로 기능한다고 할 것이다.
- [0030] *CaWRKYd*는 고추의 잎, 뿌리, 줄기, 꽃, 과육 등의 모든 조직에서 발현되며 특히 잎에서 높은 수준으로 발현이 되고 있는 것으로 나타났다 (도 8 참조). 세포내 위치를 확인하기 위한 GFP-융합 단백질 타겟팅 (GFP-fused protein targeting) 실험을 통하여 핵 안에 위치하고 있다는 것으로 확인되었다 (도 9 참조).
- [0031] 바이러스-유도 유전자 침묵 (Virus-inducing gene silencing, VIGS) 방법 (Chung, E., Seong, E., Kim, Y.-C., Eun Joo Chung, E. J., Oh, S.-K., Lee, S., Park, J. M., Joung, Y. H., and Choi, D.(2004) A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). Mol. Cells 17: 377-380.; Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M. and Baulcombe, D.C. (2001) Tobacco rattle virus as a vector analysis of gene function by silencing. Plant J. 25, 237-245)을 이용하여 고추에서 *CaWRKYd* 유전자의 발현을 감소시킨 녹다운 (knockdown) 식물을 만들고 여기에 PMMoV-P₀를 처리하였을 때 식물이 어떤 표현형을 보이는지 관찰한 결과, PMMoV-P₀에 의해 유도되는 과민성 세포 사멸 (hypersensitive cell death)이 감소되는 표현형을 관찰하였다. 또한 병 반응 동안 관련된 다수의 유전자들인 PR 유전자들의 발현이 감소되는 것으로 확인 되었다 (도 5 및 도 6 참조).
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현벡터, 이를 포함하는 형질전환 식물 세포 및 식물체를 제공한다.
- [0033] 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다. 본 발명의 발현 벡터에 포함되는 유전자는 *CaWRKYd*를 코딩하는 염기서열을 포함하며, 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 것이다.
- [0034] 상기 유전자를 삽입하기 위하여 사용되는 벡터로는 일반적인 식물 형질전환용 발현 벡터이면 어느 것이든 무방하나, 본 발명에서는 *CaWRKYd* 유전자를 삽입하기 위한 벡터로 식물 형질전환용 pCambia2300 벡터나 pCambia2300 M2 HA2 벡터 등을 사용할 수 있다.
- [0035] 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.

[0036] 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.

[0037] 상기와 같은 결과는 본 발명에 의한 *CaWRKYd7*가 식물의 방어 반응에 관련하여 식물체 내 호르몬 신호전달 사이의 크로스 토크 (cross talk)에 관련된 중요한 전사인자임을 나타낸다. 본 발명의 *CaWRKYd*는 *CaMK1*과 상호작용하여 *PMMoV-Po*에 의해 유도되는 방어반응에서 식물체에 병 저항성을 부여하는 포지티브 조절자 (positive regulator)로써 기능한다고 할 것이다.

발명의 효과

[0038] 상술한 바와 같이, 고추에서 유래된 신규 유전자 *CaWRKYd*는 *PMMoV-Po*, SA, MeJA, 에테폰 (ethephon) 처리 및 상처 스트레스에 의해 발현이 유도되고, 식물의 방어 반응에 관련이 있다는 것이 확인됨으로써, 본 발명은 저항성 식물체의 육종을 위한 재료를 제공하여 저항성을 갖는 식물체 제작 및 식물체의 방어 반응 메커니즘 연구에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 본 발명에 의한 *CaWRKYd*의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이다.

도 2는 아미노산 서열의 유사성에 기초하여 본 발명에 의한 *CaWRKYd*와 다른 WRKY와의 예측되는 진화적 관계를 나타내는 계통수이다. 수평선의 길이는 연관된 서열 사이의 비유사성을 나타내고, 선 아래의 숫자는 근접한 노드로부터의 상대적 거리를 나타낸다.

도 3은 다른 종의 WRKY와 본 발명에 의한 *CaWRKYd* cDNA로부터 유추된 아미노산 서열을 비교한 도면이다. *Capsicum annuum* (*CaWRKYd*), *Solanum lycopersicum* (CAN 38396), *Larrea tridentate* (AAW30662), *Capsicum annuum* (AAX20040), *Arabidopsis thaliana* (AtWRKY40, NP178199), and *Boea hygrometrica* (ACI62177)의 서열을 나타낸다.

도 4는 *PMMoV-Po*의 접종에 의한 본 발명에 의한 *CaWRKYd* 발현을 qRT-PCR로 분석한 결과를 나타낸 도면이다. 총 RNA는 접종 후 0, 12, 24, 48, 72 시간에 잎으로부터 추출되었다 (HAI). 대조군으로 이용된 잎은 버퍼와 카보린 덩만으로 모조-접종 (mock-inoculation) 되었다. 수치는 *CaActin* 유전자의 발현으로 표준화된 mRNA 수준을 나타낸다.

도 5는 본 발명에 의한 *CaWRKYd* 유전자가 칠레 고추 (*Capsicum annuum*) 식물에서 침묵한 것을 나타낸 사진이다. 2주된 칠레 고추 유묘에 아그로인필트레이션 (agroinfiltration)에 의해 pTRV1 및 pTRV2-*CaWRKYd* 벡터가 접종되었다. 4주 후, 상부 잎들에 *PMMoV-Po*가 접종되었고, 사진은 *PMMoV-Po*가 접종된 후 4일 후 pTRV2 및 pTRV2-*CaWRKYd*의 잎을 나타낸다.

도 6은 *PMMoV-Po* 접종에 따른 *CaWRKYd* 침묵 식물에서의 고추 병 관련 (*Capsicum annuum* pathogenesis-related, *CaPR*) 유전자의 발현 양상을 나타낸다. qRT-PCR을 이용하여 pTRV2 및 pTRV2-*CaWRKYd* 침묵 식물 잎에서의 *CaPR* 유전자 발현을 분석한 결과를 나타낸다. 총 RNA는 *PMMoV-Po* 접종 후 24, 48, 72 및 96 시간에 잎으로부터 추출되었다. 수치는 *CaActin* 유전자의 발현으로 표준화된 mRNA 수준을 나타낸다.

도 7은 방어 신호전달 분자 및 상처 처리에 의해 *Capsicum annuum* *CaWRKYd*가 유도되어 발현되는 것을 qRT-PCR로 분석한 결과를 나타낸다.

도 7a는 살리실산 (SA)으로 처리된 칠레 고추 식물 (*Capsicum annuum* cv. Bukang)에서 *CaWRKYd*의 전사가 확인

된 결과를 나타낸다. 고추 잎에 10mM SA가 분무되거나 모조(mock)로 10% 에탄올이 처리되었다.

도 7b는 에테폰 (ethephon)으로 처리된 칠레 고추 식물 (*Capsicum annuum* cv. Bukang)에서 *CaWRKYd*의 전사가 확인된 결과를 나타낸다. 고추 잎에 10mM 에테폰이 분무되거나 모조(mock)로 10% 에탄올이 처리되었다.

도 7c는 메틸자스몬산 (MeJA)으로 처리된 칠레 고추 식물 (*Capsicum annuum* cv. Bukang)에서 *CaWRKYd*의 전사가 확인된 결과를 나타낸다. 고추 잎에 10 μ M MeJA이 분무되거나 모조(mock)로 10% 에탄올이 처리되었다.

도 7d는 여러 시기에 상처 처리된 칠레 고추 식물 (*Capsicum annuum* cv. Bukang)에서 *CaWRKYd*의 전사가 확인된 결과를 나타낸다. 정단 라미나 (apical lamina)를 여러 번 부수어 고추 식물의 잎 면적의 90% 이상에 효과적으로 상처 처리하였다. 수치는 *CaActin* 유전자의 발현으로 표준화된 mRNA 수준을 나타낸다.

도 8은 칠레 고추의 여러 조직에서 *CaWRKYd*의 조직 특이적 발현을 qRT-PCR로 분석한 결과를 나타낸다. 다양한 조직에서 추출된 총 RNA가 이용되었다. 수치는 *CaActin* 유전자의 발현으로 표준화된 mRNA 수준을 나타낸다.

도 9는 *GFP3G::CaWRKYd* 융합 단백질의 세포내 위치를 나타낸다.

도 9a는 *GFP3G::CaWRKYd* 융합 유전자의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

도 9b는 *GFP3G::CaWRKYd* 융합 단백질의 세포내 위치를 나타낸다. 상기 *GFP3G::CaWRKYd* 융합 구조체는 PEG-매개 형질전환에 의해 애기장대 원형질체로 도입되었다. 도입된 유전자의 발현은 형광 또는 광학 현미경관찰로 24시간 후에 확인되었다.

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.

[0041] 실시예 1. yeast two-hybrid 분석

[0042] MatchMaker yeast two-hybrid system을 Clontech에서 구입하였다. *EcoRI* 및 *BamHI*를 이용하여 *CaMK1*, *CaWRKYd* 단편 (fragment)을 pGBKT7 (DNA binding domain vector)에 클론하였고, *EcoRI* 및 *BamHI*를 이용하여 *CaMK1*, *CaWRKYd*를 pGADT7 (DNA activation domain vector)에 클론하였다. 이 클론된 벡터를 AH109 strain에 코-트랜스포메이션 (co-transformation) 시켰다. 형질전환된 효모를 Leu 및 Trp가 부족한 minimal synthetic dropout (SD) 에서 선발하였다. 효모 세포를 5-7일 동안 30℃에서 생장시킨 후 X-a-gal assays를 하여, 기질로 5-bromo-4chloro-3-indolyl α -D-galactoside (X-gal)을 이용하여 α -갈락토시다제 활성 (α -galactosidase activity)을 측정하였다.

[0043] 실시예 2. DNA 분리 및 서열분석

[0044] 서열결정 결과, *CaWRKYd*는 하나의 WRKY 도메인과 Cys₂-His₂zinc-finger motif를 가지고 있는 WRKY group IIa에 속하는 것으로 나타났다. 도 1에 나타난 바와 같이 *CaWRKYd* cDNA 핵산 서열은 1681bp (서열번호 1)이며, 320 개의 아미노산 (서열번호 2)을 인코딩 (encoding)하는 963개의 뉴클레오타이드 (nucleotide)로 이루어진 하나의 ORF를 가지고 있다. 상기 아미노산 서열은 여러 식물에서 유래한 WRKY와 대비되었다 (도 2 및 3 참조).

[0045] 실시예 3. 식물 재배 및 병원균 접종에 따른 *CaWRKYd* 발현

[0046] PMMoV의 Po 병원형에는 저항성이나 P_{1,2} 병원형에는 감수성인 고추 식물체 (*Capsicum annuum* L. cv. Bugang)를 식물 재료로 이용하였다. 식물체를 6h 광/ 8h 암의 광주기로 23℃의 생장 챔버에서 생장시켰다. 2달 된 식물체로부터 수거된 건강하고 잘 벌어진 잎을 병원균 접종 및 핵산 추출에 이용하였다. CaCl₂-함유 페트리 디쉬에 PMMoV-P₀ 또는 PMMoV- P_{1,2} 계통을 감염된 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) 잎과 함께 두었다. 5mM EDTA를 함유하는 0.25M 포스페이트 버퍼와 함께 감염된 잎을 갈아서 PMMoV-P₀ 또는 PMMoV- P_{1,2}를 함유하는 잎 수액을 준

비하였다. 식물에 접종하기 위해, 바이러스를 함유하는 수액을 고추 식물체의 4 또는 5번째의 완전히 벌어진 잎의 표면에 도포하고 카보런덤(mesh 500)(Hayashi Chemical, Japan)으로 문질렀다. 모조-접종 식물체는 포스페이트 버퍼 및 카보런덤만으로 문질렀다. 시스템적 반응을 확인하기 위해, 2개 아래의 잎을 PMMoV-P₀ 수액으로 접종하였고 상부의 접종되지 않은 잎을 접종 후 0, 6, 12, 24, 48, 및 72h 시간에 수거하였다(DAI).

[0047] 상기와 같은 PMMoV-P₀의 접종에 의한 본 발명에 의한 *CaWRKYd* 발현을 qRT-PCR로 분석한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0048] 이때, RNA 추출, RP-PCR 및 정량 리얼타임 PCR 분석 (quantitative real-time PCR analysis)은 다음과 같이 하였다. 50mg의 식물 재료를 액체 질소에서 막자사발 및 막자에 의해 갈아 약간 하얀 분말이 되었다. 이 분말을 0.5ml RNA 추출 버퍼 (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M LiCl, 10 mM EDTA, 및 1 % SDS) 및 물-포화 페놀 (pH 4.5)과 혼합되는 1.5ml e-tube에 옮긴 다음, 강하게 볼텍싱 하였다. 같은 부피의 클로로포름을 상기 튜브에 추가한 다음, 강하게 볼텍싱 하였다. 상기 튜브를 4 °C에서 10분 동안 13,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 튜브로 옮기고 0.5ml 클로로포름을 추가하고 강하게 볼텍싱 하였다. 상기 튜브를 4 °C에서 10분 동안 13,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 튜브로 옮기고 0.5ml의 4M LiCl을 추가하고 부드럽게 뒤집은 다음 80 °C 에서 밤새 배양하였다. 4 °C에서 30분 동안 13,000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 펠릿을 70% 에탄올로 세척하였고 DEPC-처리 물에 용해시켰다.

[0049] 추출된 총 RNA를 RT-PCR 분석을 위해 이용하였다. 5 마이크로그램 RNA 샘플들을 MMLV-역 전사효소 (Promega, USA)를 이용하여 역전사 하였다. 각 첫 번째-가닥 (first-strand) cDNA 산물을 *CaWRKYd* 3'-UTR, *CaPR-1*, -2, -4, -5, -9, -10, -13, -16, *actin*, *PIN2* 프라이머들 (표 1, 서열번호 3 ~ 서열번호 22)을 이용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 리얼타임-PCR은 KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KAPABIOSYSTEM) 및 유전자-특이 프라이머를 이용하여 LightCycler 480 (Roche, Germany)에서 수행하였다. 특정 mRNA 검출하기 위해 사용된 qRT-PCR 프라이머 조합(Combination of qRT-PCR primer for specific mRNA detection)이 표 1에 나타나 있다.

표 1

[0050]

Gene name	Sequence(5'to 3')
CaWRKYd 3'-UTR	CAAGTTTTCAGCAGCCTTAG (서열번호 3) CTTGACAACATATCCTAGTGGCTA (서열번호 4)
CaPR-1 qRT-PCR	GAGGACAACGTCCTATGGT (서열번호 5) AACTCCAGTTACTGCACCATTAGA (서열번호 6)
CaPR-2 qRT-PCR	CTACTTAAGCTTTGCAAGACACCA (서열번호 7) AGATCTCTTTCCATCATCGTCACTT (서열번호 8)
CaPR-4 qRT-PCR	GAACACAAGCAACGGTGAGA (서열번호 9) GGCACTTGTTAGGCAGAGC (서열번호 10)
CaPR-5 qRT-PCR	TGCCCCAAGTTGGACTACTGATTA (서열번호 11) TCAACCAAAATTGAACAAAAGAGA (서열번호 12)
CaPR-9 qRT-PCR	GACTAGTTTCAAGAGCATCA (서열번호 13) AATTGTATAGCCTGTAGCTG (서열번호 14)
CaPR-10 qRT-PCR	CTGTCTATGTTTAAGCCAATGACC (서열번호 15) AAAGTTCTTTCCATGACAACCAAT (서열번호 16)
CaPR-13 qRT-PCR	CTGTAAAGAGCTCACAAAC (서열번호 17) GCGAGAGTTTATAGCATTAC (서열번호 18)
CaPR-16 qRT-PCR	CCCTAGAGGACTTGTACATT (서열번호 19) TTAGTCAAGACAGAATCAGG (서열번호 20)
CaActin qRT-PCR	CTGTCTGTGATAATGGAAC (서열번호 21) GGATACTTCAAGGTGAAGAAT (서열번호 22)

[0051] CaWRKYd 3'-UTR : 고추에서 CaWRKYd 유전자를 침묵(silencing) 시킨 식물에서 CaWRKYd 유전자가 knock-down 되었는지 확인하는데 사용한 프라이머(primer)

[0052] *CaPR-1/-2/-3/-4/-5/-9/-10/-13/-16*은 고추에 존재하는 여러 가지 병 고나련 유전자들(pathogen-related genes)의 종류이며 대조군과 *CaWRKYd*를 침묵(silencing) 시킨 식물에서 여러 가지 PR 유전자들의 발현 양상을 조사하기 위해 사용한 프라이머(primer)

- [0053] *CaActin* : 고추에 존재하는 house keeping 유전자로 qRT-PCR 실험시 cDNA양을 보정해 주는데 사용한 프라이머 (primer)
- [0054] **실시예 4. 화학물질 및 상처 처리에 따른 *CaWRKYd* 발현**
- [0055] 2달 된 고추 잎에 10 mM SA 용액을 분무하였다. 가능한 때마다, 다른 대조군 식물 세트에 증류수로 유사하게 처리하였다. 처리 후 제시된 시점에서 잎을 수거하였고, 액체 질소에서 급속 냉동된 후 -80℃에서 보관하였다. 10 mM 에테폰 (ethephon) 또는 100 μ M 메틸자스모네이트 (methyl jasmonate, MeJA) 처리를 위해, 뿌리채 뽑은 고추 식물을 다양한 시간 동안 에테폰, MeJA 또는 증류수로 채워진 팔콘 튜브 (Falcon tube)에 방치한 후 추가 분석을 위해 액체 질소로 냉동하였다. 상처 처리를 위해, 잎을 가위로 여러 조각으로 절단하였다. 절단된 잎을 처리 후 0, 1, 2, 6, 12, 24 및 48 h 후 수거하였다.
- [0056] 상기와 같이 방어 신호전달 분자 및 상처 처리에 의해 *Capsicum annuum CaWRKYd*가 유도되어 발현되는 것을 실시예 2에 기재된 방법대로 qRT-PCR로 분석한 결과를 도 7에 나타냈다. 도 7a는 살리실산 (SA)으로 처리된 칠레 고추 식물 (*Capsicum annuum* cv. Bukang)에서 *CaWRKYd*의 전사가 확인된 결과를 나타낸다. 고추 잎에 10 mM SA를 분무하거나 모조(mock)로 10% 에탄올을 처리하였다. 도 7b는 에테폰 (ethephon)으로 처리된 칠레 고추 식물 (*Capsicum annuum* cv. Bukang)에서 *CaWRKYd*의 전사가 확인된 결과를 나타낸다. 고추 잎에 10mM 에테폰을 분무하거나 모조(mock)로 10% 에탄올을 처리하였다. 도 7c는 메틸자스몬산 (MeJA)으로 처리된 칠레 고추 식물 (*Capsicum annuum* cv. Bukang)에서 *CaWRKYd*의 전사가 확인된 결과를 나타낸다. 고추 잎에 10 μ M MeJA를 분무하거나 모조(mock)로 10% 에탄올을 처리하였다. 도 7d는 여러 시기에 상처 처리된 칠레 고추 식물 (*Capsicum annuum* cv. Bukang)에서 *CaWRKYd*의 전사가 확인된 결과를 나타낸다. 정단 라미나 (apical lamina)를 여러 번 부수어 고추 식물의 잎 면적의 90% 이상에 효과적으로 상처 처리하였다. 수치는 *CaActin* 유전자의 발현으로 표준화된 mRNA 수준을 나타낸다.
- [0057] **실시예 5. 바이러스 유도 유전자 침묵 (virus-induced gene silencing, VIGS)을 이용한 본 발명에 의한 *CaWRKYd* 기능 분석**
- [0058] PCR에 의해 증폭된 *CaWRKYd*의 216-bp 3' UTR 단편을 TRV2 벡터 (Liu *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004)의 *Bam*HI 사이트에 클론하였다. PCR 프라이머로 5'-GGATCCAAATGTTCCAGAAAAAG -3' (서열번호 23) 및 5'-GGATCCAGGCCACCCAAGTCAC -3' (서열번호 24)을 이용하였다. pTRV2 및 pTRV2-*CaWRKYd*로 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)를 형질전환시켰고, 형질전환된 세포를 50 mg 카나마이신 (kanamycin), 및 100 mg 리팜피신 (rifampicin)을 함유하는 YEP 배지에서 선발하였다. 형질전환체를 28℃에서 생장시키고, 원심분리 후 박테리아는 10 mM MES-KOH (pH 5.7), 10 mM MgSO₄, 및 200 μ M 아세토시링원 (acetosyringone)을 함유하는 버퍼에서 A₆₀₀ 0.3될 때까지 재현탁하였고, 2-4 시간 동안 실온에서 세워 두었다. 형질전환체 배양물은 TRV1 벡터를 포함하는 아그로박테리움 투메파시엔스 (*A. tumefaciens*)와 1:1 비율로 혼합하였고 (OD₆₀₀ nm, 0.2), 혼합물을 부광 칠레 고추 식물에 인필트레이션 시켰다. 각 실험을 위해, 50개의 칠레 고추 식물체에 pTRV2 벡터 및 pTRV2-*CaWRKYd*-3' UTR 벡터를 각각 접종하였다. 상기 접종 후 1개월 후, *CaWRKYd*-침묵 식물에 *PMMoV*-P₀을 접종하였다. 잎은 RNA 추출에 이용되었다.
- [0059] 몇 가지 변형된 Thordal-Christensen *et al.* (1997) 방법에 따라 과산화수소의 축적을 3,3'-디아미노벤지딘 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 염색을 이용하여 시각화하였다. TRV2 및 TRV2-*CaWRKYd* 3' UTR 침묵 식물체로부터 잘라낸 잎을 DAB 용액 (1 mg ml⁻¹)을 함유하는 50ml 팔콘 튜브로 옮겼다. DAB 용액을 2회 10분 동안 진공으로 인필트레이션 하였다. 그런 다음 96 % (v/v) 에탄올로 옮겨 10-30분 동안 96 % (v/v) 에탄올을 끓여 엽록소를 제거하였다. DAB은 식물체에 의해 신속하게 흡수되어 H₂O₂ 및 페록시다아제 (peroxidase)의 존재 하에서 국지적으로 중합되어 갈색 염색으로 나타난다.
- [0060] 도 5는 본 발명에 의한 *CaWRKYd* 유전자가 칠레 고추 (*Capsicum annuum*) 식물에서 침묵한 것을 나타낸 사진이다. 2주된 칠레 고추 유묘에 아그로인필트레이션 (agroinfiltration)에 의해 pTRV1 및 pTRV2-*CaWRKYd* 벡터를 접종

하였다. 4주 후, 상부 잎들에 PMMoV-Po를 접종하였고, 사진은 PMMoV-Po가 접종된 후 4일 후 pTRV2 및 pTRV2-*CaWRKYd*의 잎을 나타낸다.

[0061] 도 6은 PMMoV-Po 접종에 따른 *CaWRKYd* 침묵 식물에서의 고추 병 관련 (*Capsicum annuum* pathogenesis-related, *CaPR*) 유전자의 발현 양상을 나타낸다. 실시예 2에 제시된 방법에 따라 qRT-PCR을 이용하여 pTRV2 및 pTRV2-*CaWRKYd* 침묵 식물 잎에서의 *CaPR* 유전자 발현을 분석한 결과를 나타낸다. 총 RNA를 PMMoV-Po 접종 후 24, 48, 72 및 96 시간에 잎으로부터 추출하였다. 수치는 *CaActin* 유전자의 발현으로 표준화된 mRNA 수준을 나타낸다.

[0062] 실시예 6. *CaWRKYd* 조직 내 발현 위치 확인

[0063] 칠레 고추의 여러 조직에서 *CaWRKYd*의 조직 특이적 발현을 qRT-PCR로 분석하였다. 실시예 2에 기재된 방법에 따라 다양한 조직에서 추출된 총 RNA가 이용되었다. 그 결과 도 8에 나타난 바와 같이, *CaWRKYd*는 고추의 잎, 뿌리, 줄기, 꽃, 과육 등의 모든 조직에서 발현되며 특히 잎에서 높은 수준으로 발현이 되고 있는 것으로 나타났다.

[0064] 실시예 7. *CaWRKYd* 세포내 위치 확인

[0065] 35S-GFP3G-*CaWRKYd* 융합 단백질을 이용하여 *CaWRKYd*의 세포내 위치를 확인하였다. 주형으로 *CaWRKYd* cDNA 및 2개의 프라이머 (forward, 5'-CCCGGGCAATGCCTGACAAA-3' (서열번호 25) 및 reverse, 5'-CCCGGGTTTGTCTGTATGATTA-3' (서열번호 26))를 이용하여 PCR에 의해 종료 코돈이 없는 전체 길이 (full-length)의 *CaWRKY1* 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 준비하였다. *XmaI* 사이트를 포함하는 PCR 산물을 *XmaI*로 절단하여 GFP 발현 인자에 융합하였다. PCR-증폭된 *CaWRKYd* cDNA 단편의 N-터미널 부위를 GFP3G 발현 벡터의 C-터미널 부위에 융합하였다. *CaWRKYd*가 없는 35S-GFP3G 벡터를 대조군으로 사용하였다. PEG-형질전환을 이용하여 적절한 융합 구조체 (2~3 μ g each of 35S-GFP3G-*CaWRKYd* or p35S-GFP3G)의 플라스미드 DNA를 애기장대 원형질체로 도입하였다. 형광이미지는 fluorescein isothiocyanate filters (an excitation filter of 520 nm and an emission filter of 488)가 장착된 UV light incident fluorescence microscope (Zeiss, Axioskop, Germany)를 이용하여 캡처 하였고 그 결과를 도 9에 나타냈다.

[0066] 도 9a는 GFP3G::*CaWRKYd* 융합 유전자의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다. 도 9b는 GFP3G::*CaWRKYd* 융합 단백질의 세포내 위치를 나타낸다. 도입된 유전자의 발현을 형광 또는 광학 현미경관찰로 24시간 후에 확인하였다.

[0067] 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

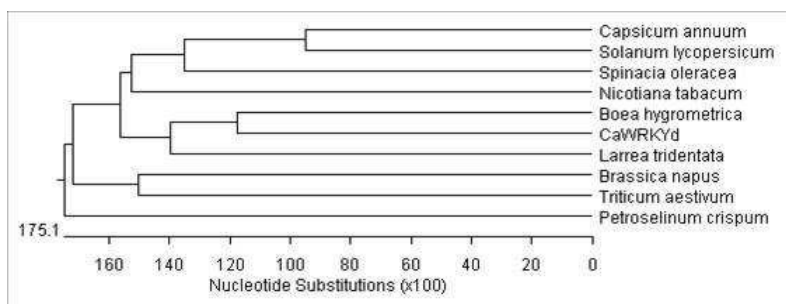
도면1

```

1  accagtttagt tga
15  tacttctttggatctcagcttcagacctcttcaggttccetgatga
60  tataccgggtgtgtggagatctataaaacattttagagttgattta
105  ttictcatatcatcgttactaatagtacatgttagctcagaaaa
151  gtacagatttaatttctttgtcgaagaaaattggaatcaggaagg
196  aggatcgtgattttccactgtataatcaatcatatgcatgaattta
241  gctagtttgccttaattgttttaattttagatttgcctttgctctcag
296  aaacaagaagttgagagtaatttcatctgggcttgggaagagatctc
341  atgctgacaaagatgatcaggcaggtgatttgttggaggaacta
    M P D K D D Q A G D L L E E L 15
386  aatagagttaagtgtgaaacaagaactgactgagatgttaaca
    N R V S A E N K K L T E M L T 30
431  gttatgtgccagaattacaatgcattgagaaccaattgactgaa
    V M C Q N Y N A L R N Q L T E 45
476  tatttgaacaagcaaaacagtactactagtactgcagctgataat
    Y L N K Q N S T T S T A A D N 60
521  aatcatgatcatcatagcgatggatcgaaaaaagaaangtcgaa
    N H D H H S D G S K K R K V E 75
566  aacaacaacaatgaattgtgaatcagttcaaggattacactca
    N N N N E I V K S V Q G L H S 90
611  gagagcagctcaagtgatgaagattcatctacaagaaccaaga
    E S S S S D E D S S N K K P R 105
656  gaacaacacattaaactaacactttagagatttatgtcaaaacc
    E Q H I K T N T C R V Y V K T 120
701  gaagcatctgatacttctcttatttgaaggatggatcatcagtg
    E A S D T S L I V K D G Y Q W 135
746  aggaatatgttcagaaagtaacaagagataacccatctccaga
    R K Y G Q K V T R D N P S P R 150
791  gcttatttcaaatgctcttttgcctcactgcccagtcacaaaa
    A Y F K C S F A P T C P V K K 165
836  aaggtgcaagaagttgtgaagaccaatcgattctagtacgcaca
    K V Q R S V E D Q S I L V A T 180
881  tatgaaggagaacacaacattccaaaatggatggttcaggcccc
    Y E G E H N H S K M D G S G P 195
926  gttacaacttcccgctctagcggattaaacccgaaaaactcttt
    V T T S P S S R L N P K N T L 210
971  gtgggtgctaataactactactctgcatgccatgctccagttactgt
    V G A N T T T V M P C S S T S 225
1016  atcatcaacacacattcaggaccaacttaacattggatcttaca
    I I N T P S G P T L T L D L T 240
1061  caacaaaaaaattacaaaatgaccaaaagaaagtgaacagcaat
    Q P K K L Q N D Q K K V N S N 255
1106  actagtactagttaatgcaagtggtcaaaaaagcaaatcaccagga
    T S T S N A S G Q K S K S P G 270
1151  ggacatgatcatcatcagcaaaatagaccagagtttcaacagttg
    G H D H H Q Q N R P E F Q Q L 285
1196  tttagatcaaatggcttcttcatctgactaaagatccaagtttt
    F I D Q M A S S L T K D P S F 300
1241  caagcagccttagccgtgccatctcggaataattcttacaataat
    Q A A L A A A I S G K F L Q N 315
1286  aatcatacagacaataa
    N H T D K * 321
1304  atgatgattataatcaaacgtgtgaacttcatgtttaatgagetgt
1349  tcaatgttttcaagttgacacatttgagaaatgttcagaaaaaa
1394  gataatagccactaggatattgttgaagatgtaaatatgtttc
1439  atttttgggtgaacggtagtgggtggactaggaagtgcacgtgc
1484  aaatggaaatgggctaattttctatggcagcctaaattggttaggt
1529  ctcaatttgtgcctatgagttctacaagatgtgacttgggtggg
1574  ccttaaatgttgaatttgcctatttatgcaatttgcgaaaaataa
1619  atacttatatagtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
1664  aaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

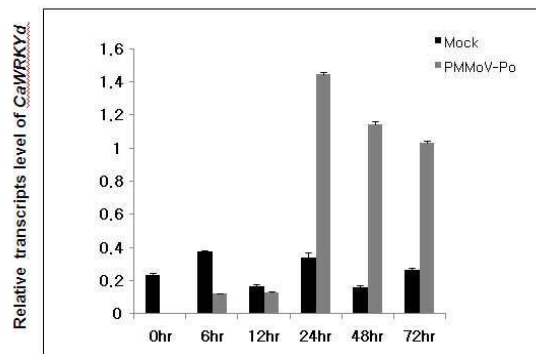
도면2



도면3

[illegible]

도면4



도면5

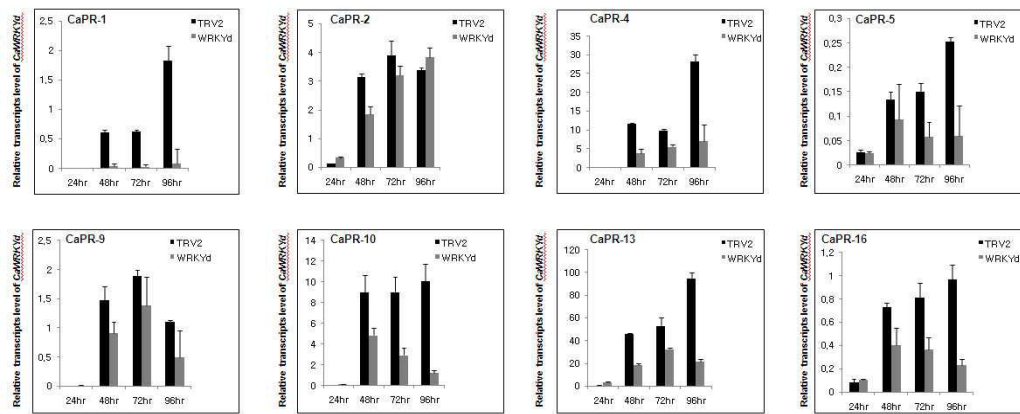
PMMoV-P₀

TRV2

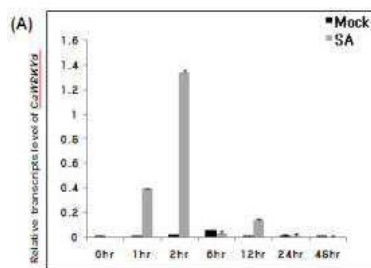
TRV2-CaWRKYd



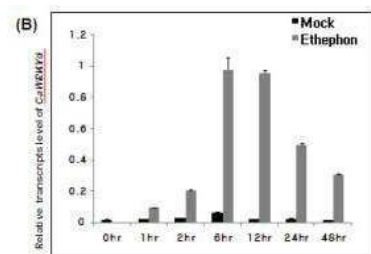
도면6



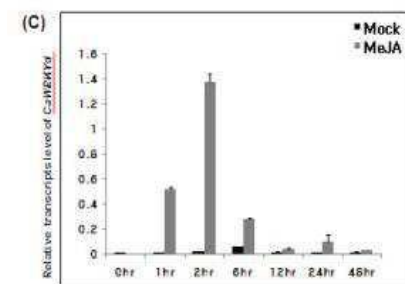
도면7a



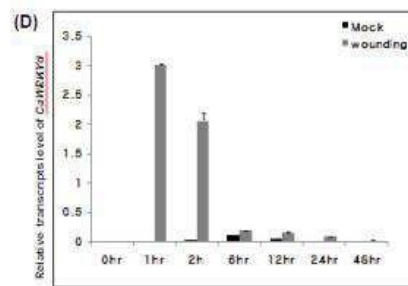
도면7b



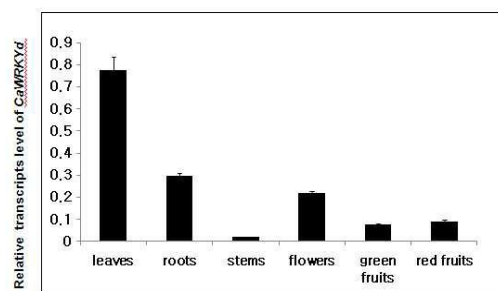
도면7c



도면7d



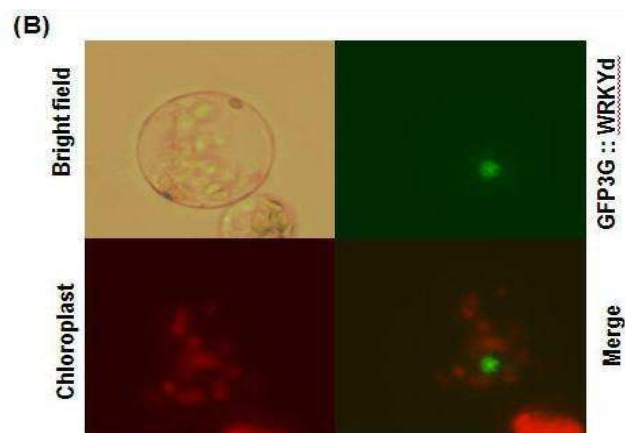
도면8



도면9a



도면9b



서열 목록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation

<120> A hot pepper transcription factor gene, CaWRKYd related to plant

defence response and transgenic plants using the same gene

<130> P11-100422-01

<160> 26

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1681

<212> DNA

<213> Capsicum annuum cv. Bukang

<400> 1

accagtttag ttgatacttc tttggatctc agcttcagac ctcttcgagt tcctgatgat 60

ataccggtgt gtggagatct ataaaactat tttacagttg attattttctc atatcatcgc 120

ttaactaata gtacatgta gctcagaaag tcacgattta atttctttgt cgaagaaaat 180

tggaatcagg aaggaggatc gtgattttcc actgtataat caatcatatg catgaattag 240

ctagtttgcc ttaatgtttt aatttgattt gcttttgctc tcagaaacaa gaagttgaga 300

glaatttcat tgggcttggg agagatctca tgcctgacaa agatgatcag gcaggtgatt 360

tgttggagga actaaataga gtaagtctg aaaacaagaa actgactgag atgttaacag 420

ttatgtgcc gaattacaat gcattgagaa accaattgac tgaatatttg aacaagcaaa 480

acagtactac tagtactgca gctgataata atcatgatca tcatagcgat ggatcgaaaa 540

aaagaaaagt cgaaaacaac aacaatgaaa ttgtgaaatc agttcaagga ttacactcag 600

agagcagctc aagtgatgaa gattcatctc acaagaaacc aagagaacaa cacattaaaa 660

ctaacacttg tagagtttat gtcaaaaccg aagcatctga tacttctctt attgtgaagg 720

atggatatca gtggaggaaa tatggtcaga aagtaacaag agataacca tctccagag 780

cttatttcaa atgctctttt gctcctacct gcccagtc aaagaaaggc caaagaagtg 840

tggaagacca atcgattcta gtagcgacat atgaaggaga acacaacat tccaaaatgg 900

atggttcagg ccccggttaca acttccccgt ctagecgatt aaacccgaaa aatactcttg 960

tgggtgctaa tactactact gtcagccat gctccagtac tagtatcatc aacacacat 1020

caggaccaac cttacattg gatcttacac aacaaaaaa attacaaaat gacaaaaaga 1080

aagtgaacag caatactagt actagtaatg caagtgtgca aaaaagcaaa tcaccaggag 1140

gacatgatca tcatcagcaa aatagaccag agtttcaaca gttgtttata gatcaaatgg 1200

cttcttcatt gactaaagat ccaagttttc aagcagcctt agccgctgcc atatcgggaa 1260

aattcttaca aaataatcat acagacaaat aatgatgat tataatcaaa ctgtgaactt 1320

cattgttaat gagctgttca atgtttttca agttgacaca tttgagaaat gttccagaaa 1380

aagatatata gccactagga tatgttgtca agatgtaaat aatgttcatt ttttgtgaac 1440

ggtacgtagg ttggactagg aagtgcacgt ggaaatggaa tgggctaatt ttctatggca 1500

gcctaaattg gttaggtctc aatttgtgcc tatgagtcctc acaagattgt gacttgggtg 1560

ggccttaaat tgttgaattt gctcatttat gcaatttgcg aaaataaata cttataatag 1620

taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680

a 1681

<210> 2

<211> 320

<212> PRT

<213> Capsicum annuum cv. Bukang

<400> 2

Met Pro Asp Lys Asp Asp Gln Ala Gly Asp Leu Leu Glu Glu Leu Asn

1 5 10 15

Arg Val Ser Ala Glu Asn Lys Lys Leu Thr Glu Met Leu Thr Val Met

20 25 30

Cys Gln Asn Tyr Asn Ala Leu Arg Asn Gln Leu Thr Glu Tyr Leu Asn

35 40 45

Lys Gln Asn Ser Thr Thr Ser Thr Ala Ala Asp Asn Asn His Asp His

50 55 60

His Ser Asp Gly Ser Lys Lys Arg Lys Val Glu Asn Asn Asn Asn Glu

65 70 75 80

Ile Val Lys Ser Val Gln Gly Leu His Ser Glu Ser Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Glu Asp Ser Ser Asn Lys Lys Pro Arg Glu Gln His Ile Lys Thr Asn

100 105 110

Thr Cys Arg Val Tyr Val Lys Thr Glu Ala Ser Asp Thr Ser Leu Ile

115 120 125

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

130 135 140

Asp Asn Pro Ser Pro Arg Ala Tyr Phe Lys Cys Ser Phe Ala Pro Thr

145 150 155 160
 Cys Pro Val Lys Lys Lys Val Gln Arg Ser Val Glu Asp Gln Ser Ile
 165 170 175
 Leu Val Ala Thr Tyr Glu Gly Glu His Asn His Ser Lys Met Asp Gly
 180 185 190
 Ser Gly Pro Val Thr Thr Ser Pro Ser Ser Arg Leu Asn Pro Lys Asn
 195 200 205

 Thr Leu Val Gly Ala Asn Thr Thr Thr Val Met Pro Cys Ser Ser Thr
 210 215 220
 Ser Ile Ile Asn Thr Pro Ser Gly Pro Thr Leu Thr Leu Asp Leu Thr
 225 230 235 240
 Gln Pro Lys Lys Leu Gln Asn Asp Gln Lys Lys Val Asn Ser Asn Thr
 245 250 255
 Ser Thr Ser Asn Ala Ser Gly Gln Lys Ser Lys Ser Pro Gly Gly His
 260 265 270
 Asp His His Gln Gln Asn Arg Pro Glu Phe Gln Gln Leu Phe Ile Asp

 275 280 285
 Gln Met Ala Ser Ser Leu Thr Lys Asp Pro Ser Phe Gln Ala Ala Leu
 290 295 300
 Ala Ala Ala Ile Ser Gly Lys Phe Leu Gln Asn Asn His Thr Asp Lys
 305 310 315 320

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 3

caagttttca agcagcetta g

21

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER
 <400> 4
 cttgacaaca taccctagt gcta 24
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 5
 gaggacaacg tccgtatggt 20
 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 6
 aactccagtt actgcacat taga 24
 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 7
 ctacttaagc ttgcaagac acca 24
 <210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 8
 agatctcttt cctcatcgtc actt 24
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 9

gaacacaagc aacggtgaga

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 10

ggcacttggt taggcagagc

20

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 11

ttgccaaagt tggactactg atta

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 12

tcaaccaa at tgaacaaaa gaga

24

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 13

gactagtttc aagagcatca

20

<210> 14

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 14
 aattgtatag cctgtagctg 20
 <210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 15
 ctgtctatgt ttaagccaat gacc 24

 <210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 16
 aaagttcttt ccatgacaac caat 24
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 17
 ctgtaaagag ctcacaaaac 20
 <210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 18

gcgagagttt tagcattac

19

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 19

ccctagagga ctgtacatt

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 20

ttagtcaaga cagaatcagg

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 21

cttgtctgtg ataatgaac

20

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 22

ggatacttca aggtgaagaa t

21

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER
 <400> 23
 ggatccaaat gttccagaaa aag 23
 <210> 24
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 24
 ggatccaggc ccaccaagt cac 23
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 25
 cccgggcaat gcctgacaaa 20
 <210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 26
 cccgggtttg tctgtatgat ta 22