



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0094419

(43) 공개일자 2007년09월20일

(51) Int. Cl.

C12N 15/29(2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0025077

(22) 출원일자 2006년03월17일

심사청구일자 2006년03월17일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

황병국

서울 강남구 역삼2동 개나리아파트 42동 303호

홍점규

서울 강북구 수유5동 516-58 미광빌라 가동 101호

(74) 대리인

김선애

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 고추 링-핑거 단백질 유전자 (C a R F P 1) 및 이를이용한 식물체의 병저항성 탐색 방법 및 형질전환식물

(57) 요약

본 발명은 고추 한별 품종에서 분리한 식물병 방어 관련 링-핑거 도메인을 가지는 단백질을 코딩하는 유전자 CaRFP1 및 상기 유전자의 염기서열에 의해 코딩되는 식물병 방어 단백질에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용한 저항성 형질전환식물체 및 병원균, 화학물질 또는 환경스트레스 저항성 유도처리시 유도저항성 발현 여부를 탐색하는 저항성 탐색방법도 제공한다. 상기한 본 발명에 의하면, 식물체 병원균의 방어반응의 표지 및 환경 스트레스 내성 식물의 분자육종을 위한 유전체료를 제공할 수 있고, 식물병 저항성 등의 탐색을 촉진시킬 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도1

```

1 gtttgcgggt attaggataa tgcagaacaa ccagagtcct tatttttagt cggttatgta
61 tgtatgtatg tatgtataca agttccagtt ttatacccat ctatagccgc ctttaattct
121 tcttacaacg gtttaagtaa tattcaagat tcaagaacct tccatttttt atacataaaa
181 agatcctttc ttgataaag atcagatcct tagtaccat ttgggttttg ttgttttttt
241 ttgattgatt ttgacagcg ctttttgttg attctgttgg agaagaaaa aaagtgttaa
301 tttttttttg atcaagggat ttgagatatt tgggtagaa aggggtgact ttgatgggtg
361 gaagaggttc aaagagggat agttgaaggc aaacatcatc gactagatct tcttggaatc
421 aatcagaata tctccaact cactcatcat cactctotta tctccaagat agttatagtt
481 attcatctca gcagcaggct gtctctctct atgcaactcc accacccac cagcaagctg
541 ttcttctcta tgcacctgca ccaccccaac agaattatgc ctctcatgct tcaagaccca
601 ggcttgacgg gagatactcg aggtttgcag ataattataa ttccctggat gagtgactg
661 aagcccttgc acgagctggc tttagctctt ogaactcaat tgttggtatc gatttcacca
721 agagcaatga atggacaggt aagaggtctt ttggtaatcg gacctacat cacattgggc
781 agaatttgaa cccctatgag caagcaattt ctataatgg aaaaaccttg gcagcatttg
841 atgagataaa cttgattccg tgttttgatc tggagatgac atcaactcat gatcaagatg
901 tattcagttt ctttccgat gaaaggtttt gtaatggctt tgaggaagtt ctgtttcgtt
961 acagagaaat tgttccccag ttgaagcttg caggacccac gtcaattgac ccagtcattg
1021 aaatggccat gacaatagtt gagcagatg gaggccagta ccatgttcta ttaatcatg
1081 cagatgggca ggtaactaga agtgttgata ccggacgtgg acaattaagt cccaggagc
1141 agaaaacggt ggaatgaatt gtacaacaa gcaagtttcc cttgtcaatt ataactgttg
1201 gggttgccga tgaacctgg gatatgatga aggaatttga tgataatatt cctgctcggg
1261 actttgataa ttccagttt gtcaatttca ccgagatcat ggcccaaat gtgctccat
1321 ctgaaagga gacggagttt gctctttcag cgttgatgaa aatcccttca caatataaag
1381 cgacgatgga actgcacta ctgggtgggc aaagtggaaa atctccagat aggttagctc
1441 ttccccctcc tatgtatgg gcaactctg tgggtgcttc aaagccctcg cgtgcaacga
1501 gtttttcagca gctcaacag tcttattatg gttatggaag cctgcagat gcagctccgc
1561 attttcagca gaactcaagt tcttattata atagtgtca ccaagtgcac actgttccat
1621 ctgctcctag ctctccctac attgtcccca gtctacata tgacaatcag gtttgcccca
1681 ttgtccttac caacccaaaa gacatgggtt tgggtgtgg gcatacagac ttgttgagatt
1741 gggggagag gottggaat tgtccaatat gtggaagtc aattcaaac cgaataaag
1801 totactgagc gagtgttttt gtcccagatt cctttgtgtg ctccaatctc tgotattctt
1861 ttgatcagtt tggatgggta tgatgtgat tttttattt gttggaagg ogttgactca
1921 atgtcaaggt ggattttatt ctgtaaatga ttgttgaca gatataggc ttcaagatcc
1981 cctgatatca gaagatttgt aatcaacta tttatttgtc gcatacgaat tctgcaaga
2041 gtctgtgtct tctaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa aaaa

```

특허청구의 범위

청구항 1

고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul)으로부터 분리된 서열번호 1의 염기서열을 갖는 식물병 방어 관련 링-핑거 단백질 유전자(CaRFP1).

청구항 2

제1항 기재의 유전자에 의해 코딩되는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 식물병 방어 관련 링-핑거 단백질.

청구항 3

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

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

청구항 5

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

청구항 6

식물체의 저항성 탐색방법에 있어서,

고추세균성점무늬병의 병원성균, 비병원성균, 고추잎 탄저병균 중 하나를 접종한 고추의 식물체로부터 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나일론막으로 전이시킨 후, ³²P를 처리한 제1항 기재의 CaRFP1 유전자 프로브와 반응시켜 CaRFP1 유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성되는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 7

식물체의 저항성 탐색방법에 있어서,

살리실산, 에틸렌, 메틸자스모네이트, 메틸 비올로젠, 마니톨, 염화나트륨 중 어느 하나를 처리한 고추 식물체로부터 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나일론막으로 전이시킨 후, ³²P를 처리한 제1항 기재의 CaRFP1 유전자 프로브와 반응시켜 CaRFP1 유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성되는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 8

식물체의 병방어반응 및 환경스트레스 내성 탐색방법에 있어서,

병원균 접종 또는 환경스트레스 물질 처리 후 제1항 기재의 CaRFP1 유전자를 이용하여 제조한 형질전환 식물체와 야생형 식물체의 반응 차이를 보임으로 구성되는 식물체의 병방어반응 및 환경스트레스 내성 탐색방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<13>

본 발명은 식물병 방어관련 유전자인 CaRFP1 유전자, 이를 이용한 식물체의 병저항성 탐색방법 및 분자 육종 재료인 저항성 형질전환식물의 개발에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 본 발명은 고추세균성점무늬병에 대해 저항성을 가진 것으로 알려진 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul)으로부터 신규 저항성 관련 유전자인 CaRFP1 유전자를 분리하여 해독(Sequencing)함으로써 그 염기서열 및 아미노산 서열을 제공하고, 이 유전자 염기 서열을 이용하여 생물적/화학적/물리적 저항성 유도 처리 시 유도저항성의 발현 여부를 탐색하는 저항성

탐색방법을 제공하며, 이 유전자를 이용하여 병저항성 및 환경 스트레스 내성 작물 개발의 분자 육종 재료로의 개발에 관한 것이다.

- <14> 담배, 토마토와 함께 대표적인 가지과 식물인 고추는 우리나라에서 오래전부터 향신료 또는 양념으로 사용되어 온 대표적인 작물로서, 그에 대한 병으로는 바이러스병, 세균병, 진균병 등이 고루 다양하게 보고되어 있는데, 그 중 치명적인 것으로 난균류에 의한 역병과 진균에 의한 탄저병 및 세균에 의한 세균성점무늬병 등을 들 수 있다.
- <15> 고추에 대한 이러한 식물 병들을 방제하기 위해 지금까지는 농약을 이용한 화학적 방제법이 주로 사용되어 왔는데, 그 독성으로 인하여 병원균뿐만 아니라 주변 생태계의 생물까지도 대량 살상하여 생태계를 파괴시키고 토양과 수질을 오염시키는 폐해가 있어 왔다.
- <16> 따라서 앞으로는, 식물이 처해 있는 환경 및 조건을 고려하여 물리적/생물학적 방제수단을 적절히 혼용함으로써 농약의 사용을 가능한 줄이는 방법을 사용하는 것이 바람직하다고 할 수 있으며, 더 바람직하게는 병에 대해 저항성을 가지고 있는 저항성 품종의 개량 및 육종 등을 통해 병 발생 자체를 억제하는 방법을 찾는 것이 바람직하다고 할 수 있다.
- <17> 사실, 그동안 농약을 사용하지 않고 병해충에 의한 피해를 감소시키기 위한 노력의 일환으로 고추를 비롯한 다양한 작물 및 병원균을 대상으로 병 저항성 작물의 육종 프로그램들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 병 저항성에 대한 이해 및 이의 실제적 응용을 위해 병 저항성 식물에서의 저항성 기작에 대한 연구가 역시 고추를 비롯한 여러 가지 작물 및 모델식물을 대상으로 실시되어 왔다.
- <18> 일단 식물이 병에 감염되면, 기주식물은 여러 가지 세포내 대사 시스템을 작동시켜 방어기작을 시작하는데, 이러한 방어기작에 의해 병원균 감염 초기에 기주식물과 식물병원균간의 반응이 친화적 반응과 불친화적 반응으로 나뉘어 결정되고, 이에 따라 병의 진전을 제한시킬 수 있는지의 여부가 결정되는 것이다.
- <19> 불친화적 반응에서, 감염된 식물은 자체의 인식작용에 의해 병원균의 침입을 인지하고, 이에 대하여 감염부위의 세포에 국부적 세포 죽음과 같은 과민성 반응(hypersensitive reaction), 캘로스(callose)의 축적, 리그닌(lignin)화에 의한 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 피토알렉신(phytoalexin) 등 여러 종류의 항균성 물질을 생성하고, 소위 병생성 관련 단백질[pathogenesis related (PR) protein]이라 불리는 방어 단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다.
- <20> 이러한 방어 기작들은 병원균의 침입하는 경우뿐만 아니라, 살리실산이나 아미노부티르산 등 인위적인 화학적 자극에 의해서도 나타나며, 물리적 상처나 염도, pH 등의 환경적 스트레스에 의해서도 나타난다고 보고되고 있다.
- <21> 이렇게 인위적인 생물학적/물리적/환경적 스트레스를 줌으로써 유도되는 저항성을 일반적으로 유도저항성이라고 하는데, 이러한 저항성 유도 반응은 식물이 병원체에 대해 방어할 수 있는 능력에서 중요한 역할을 하는 신호전달 경로로써 평가된다.
- <22> 이것은, 이와 같은 유도저항성이 신호전달에 대한 모형으로서 흥미가 있으며 실용적인 가치가 있을 뿐만 아니라, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병 저항성이 증진되는 유전공학적 식물을 개발하거나 식물의 저항성 유전기작을 촉진하도록 작동하는 식물보호 화학물질을 개발하는 데에 이용될 수 있기 때문이다.
- <23> 근래, 이러한 유도저항성 연구는 유전공학적 기술의 개입에 의해 훨씬 더 그 발전 속도가 빨라졌는데, 종래에는 저항성 유도 처리를 한 후 저항성 발현 여부를 확인하기 위해 식물을 재배하고 병을 접종한 후 저항성이 나타나는지의 여부를 확인해야 했던 반면, 지금은 유도하고자 하는 저항성 관련 단백질을 코딩하는 유전자를 밝혀내고 이를 이용하여 실험실 수준에서 저항성 발현 여부를 확인할 수 있게 됨으로써, 포장(Field)에서의 작물재배, 병 접종, 병반 출현 여부 확인 등의 절차를 생략할 수 있게 되었기 때문이다.
- <24> 이것은 전체적인 저항성 유도 시험의 주기를 단축함으로써 종래에 비해 더 짧은 시간 내에 더 많은 시험을 할 수 있게 되었음을 의미하며, 결국 더 우수한 저항성 품종을 개발할 수 있게 되었음을 의미한다.
- <25> 그러나 이것은 유도하고자 하는 유전자 서열이 밝혀지고 이에 따라 해당 유전자의 클론이 확보되어 있다는 전제하에 가능한 것으로서, 이러한 의미에서, 식물 병에 저항성을 나타내는 다양한 병생성 관련 단백질(PR protein)의 유전자 정보를 축적함으로써, 이를 이용한 탐색방법을 촉진시키는 것은 시급한 당면 과제라고 할 수 있다.

<26> 수많은 병생성 관련 유전자들이 분리되어 오늘날에 이르지만 실제로 병저항성에 기여하는 유전자를 찾는 일은 쉽지 않다. 그러므로 이들 유전자를 모델 식물에 도입하여 병저항성의 증진 여부를 검토하는 연구가 선행될 필요가 있다. 이렇게 하여 애기장대와 같은 모델 식물을 이용한 병저항성 형질전환식물의 제조로 기능이 확인된 병생성관련 유전자들을 주요 작물에 도입하기 위한 분자 육종의 기초를 마련할 수 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<27> 본 발명은 이와 같은 종래기술 상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 식물병 및 환경 스트레스에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 방어관련 유전자의 하나인 링-핑거 단백질을 코딩하는 CaRFP1 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.

<28> 본 발명의 다른 목적은 상기 CaRFP1 유전자 염기서열을 이용하여 식물병에 대한 저항성 존재 여부를 탐색하는 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공하며, 이 유전자를 이용하여 환경스트레스 내성 형질전환 식물체를 제공하고 자 하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<29> 본 발명의 상기 목적은, 고추세균성점무늬병에 대해 저항성을 가진 것으로 알려진 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* cv. Hanbyul)으로부터 mRNA를 분리한 다음 cDNA 라이브러리를 제조한 후 이를 스크린하여 신규 병방어 관련 링-핑거 단백질 유전자 CaRFP1을 선발한 후 그 염기서열을 결정하고, 고추에 병원균 또는 화학물질을 접종 또는 처리하여 상기 CaRFP1 유전자의 발현 여부를 조사함으로써 달성하였다.

<30> 본 발명은 또한 상기 유전자를 이용하여 병 접종, 저항성 유도 물질 처리 시의 발현 여부로 식물체 병저항성을 탐색하는 방법 및 이 유전자를 이용하여 제조한 재조합 벡터 및 환경스트레스 내성 형질전환 식물을 제공한다.

<31> 이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 구성을 상세히 설명한다.

<32> 먼저, 본 발명은 고추세균성점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 의해 저항성이 유도된 한별고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추 식물에서 얻은 각각의 mRNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하는 과정에서 생성되는 DNA 조각을 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지함으로써 프로브(Probe)를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하여 병저항성에 관련된 것으로 추정되는 유전자를 선발하여 클론을 얻고, 이 클론 중 링-핑거 단백질 코딩 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독(nucleotide sequencing)함으로써, CaRFP1으로 명명하고 서열번호 1을 부여하였다(도 1 참조).

<33> 본 발명에 의한 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* cv. Hanbyul)의 CaRFP1 유전자는 고추세균성점무늬병에 대한 방어기작을 가지는 병생성 관련 단백질(PR rotein)의 일종인 링-핑거 단백질을 코딩하는 유전자이다. GenBank 검색결과 이 유전자와 유사한 염기서열 또는 아미노산 서열을 가지는 다른 식물 유전자가 애기장대, 벼, 수수에서 밝혀져 있다. 이들 유전자 또한 링-핑거 단백질을 코딩하리라 예상되지만 그 단백질의 기능을 알 수 없는 것들이다.

<34> 본 발명에 의한 상기 CaRFP1 유전자의 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)은 도 2에 나타나 있다. 상기 CaRFP1 유전자에 의해 코딩되는 단백질은 484 개의 아미노산으로 구성되며, 분자량인 약 53 kDa 정도의 염기성 단백질을 구성한다. 상기 아미노산 서열에 존재하는 세린-리치 도메인 (5번부터 45 번 아미노산), 본빌레브란트인자 A(von Willebrand Factor A; VWFA) 도메인 (114번부터 286번 아미노산), 시스테인-리치의 링-핑거 도메인(441번부터 474번 아미노산)은 이 CaRFP1 유전자가 특이한 구조의 단백질을 코딩하는 것을 보여준다(도 3 참조).

<35> 이와 같은 링-핑거 단백질은 고추 식물 이외에 다른 동물, 식물들에서 그 존재가 발견 및 분리되었으나, 전체적으로 볼 때 CaRFP1 유전자에 의해 코딩되는 아미노산과 비슷한 아미노산 구조를 지닌 단백질에 대한 연구 보고는 없다(도 4 및 도 5 참조).

<36> 다음에, 본 발명은, 상기와 같이 서열이 제공된 CaRFP1을 유전자를 이용하여 병원성 균주 또는 비병원성 세균 균주, 곰팡이 균주, 화학물질, 환경스트레스를 접종 또는 처리한 식물에서 링-핑거 단백질 유전자의 유도발현 여부를 확인하는 식물체 병저항성, 화학물질 및 환경 스트레스 내성 탐색방법을 제공한다.

<37> 본 발명에 의한 링-핑거 단백질 유전자 CaRFP1이 다양한 식물병원균, 화학물질 또는 환경스트레스에 의해 차별

적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 6 내지 8 참조). 따라서, 본 발명에 의한 유전자 CaRFP1은 식물체의 병저항성 탐색방법에 이용될 수 있다.

- <38> 보다 구체적으로 병원균, 화학물질 또는 환경스트레스 등을 접종 또는 처리한 식물체로부터 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나일론막으로 전이시킨 후, ³²P를 처리한 상기 CaRFP1 유전자 프로브와 반응시켜 CaRFP1 유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성되는 식물체의 병저항을 탐색할 수 있다.
- <39> 상기 식물병원균은 고추세균성점무늬병의 병원성균 또는 비병원성균, 탄저병균일 수 있고, 상기 화학물질은 살리실산, 에틸렌, 메틸자스모네이트, 메틸비올로젠, 마니톨, 염화나트륨 중 하나일 수 있다. 상기 환경스트레스는 건조처리일 수 있다.
- <40> 다음에, 본 발명은, 상기와 같이 염기서열이 제공된 CaRFP1을 유전자를 이용하여 재조합 벡터를 제조하여 식물체를 형질전환시켜서, 병방어반응 및 환경스트레스 내성 증가를 통하여 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다.
- <41> 도 9a 및 도 9b는 링-핑거 단백질 유전자 CaRFP1을 이용한 형질전환 식물체 개발에 이용한 벡터와 형질전환 식물체에서의 CaRFP1 유전자 발현 유도 결과를 나타낸 도면이다. 도 10 내지 12b에 도시된 바와 같이, 본 발명에 의한 CaRFP1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대는 화학물질 또는 환경스트레스 처리에 대해 내성을 나타낸다.
- <42> 이하, 실시예들을 통해 본 발명을 더 구체적으로 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- <43> [실시예 1] 링-핑거 단백질을 코딩하는 CaRFP1 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 결정
- <44> 식물의 병생성 관련 단백질(PR protein) 중 하나인 링-핑거 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.
- <45> 고추 한별품종(*Capsicum annuum* cv. Hanbyul)에 고추세균성점무늬병의 비병원성균인 BV5-4a(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strain BV5-4a)를 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성반응이 나타난 식물체를 대상으로 잎을 수거하였다.
- <46> 다음에, 수거된 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR(Polymerase Chain Reaction)증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다.
- <47> 다음에, 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로부터 개개의 cDNA 클론을 제조하여 나일론막에 일정하게 흡착시킨 후, 각각 고추세균성점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하고, 여기에서 생성되는 DNA 조각을 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 상기 cDNA와 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하였다.
- <48> 하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주가 접종된 식물체의 DNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 cDNA를 병저항성에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 획득하였다.
- <49> 획득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 링-핑거 단백질 코딩 유전자임을 확인하고 CaRFP1 유전자로 명명하였다.
- <50> 이 CaRFP1 유전자에서 유추한 아미노산 서열을 다른 식물에서 발견된 링-핑거 단백질의 아미노산 서열과 비교한 결과, 애기장대, 벼, 수수의 단백질과 낮은 수준의 상동성을 나타냄으로써 신규인 것임을 알 수 있었다(도 2 내지 도 4 참조).
- <51> 이들 다른 식물 유래의 링-핑거 단백질들은 특성 분석이 이루어 지지 않았다. 다만 링-핑거 도메인만 비교하여 보면, 애기장대, 벼, 밀, 인간, 제브라피쉬, 쥐에서 유래한 E3 ligase의 링-핑거 도메인과 유사성을 가지고 있었다(도 5 참조).
- <52> 확인된 CaRFP1 유전자의 염기서열을 도 1에 나타내고 서열번호 1로 표시하고, 상기 CaRFP1 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열은 도 2에 나타나 있으며 서열번호 2로 표시하고 서열목록으로 제출하였다.
- <53> [실시예 2] CaRFP1 유전자의 발현 탐색 방법

- <54> 상기 실시예 1에서 수득한 CaRFP1 유전자를 이용하여 식물체의 저항성을 탐색하기 위하여 하기와 같이 시험하였다.
- <55> 먼저, 상기 실시예 1에서 수득된 CaRFP1 유전자를 이용한 구체적인 식물체의 저항성 탐색방법을 제공하기 위하여, 하기와 같이 고추세균성점무늬병균, 잎 탄저병균 및 화학 물질 처리에 대한 노던블러팅(Northern Blotting) 시험을 수행하였다.
- <56> 각 노던블러팅 수행시 25S 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였다.
- <57> [실험예 1] 세균성 병원균에 의한 CaRFP1 유전자의 유도 발현
- <58> 고추세균성점무늬병균 중 식물체와 친화적 반응을 나타내는 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10^8 cfu/ml의 농도로 1 분지기 고추식물체 잎의 뒷면에 배큘-인필트레이션(vacuum-infiltration) 방법으로 접종하고, 28℃, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실 처리하였다.
- <59> 접종 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간 후에 각각 잎을 채취하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나일론막(Hybond N+)으로 전이시켰다.
- <60> 다음에, 실시예 1에서 수득된 CaRFP1 유전자를 ^{32} P로 표지한 후, 이를 반응액[0.25M 인산완충액, 7% SDS, 1mM EDTA, 5% 텍스트란 황산염 (Dextran Sulfate)]에 첨가하고 65℃에서 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다.
- <61> 이렇게 ^{32} P로 표지된 상기 DNA 프로브는 나일론막에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나일론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 ^{32} P로 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 이것으로 발현 여부를 알아볼 수 있게 하였다.
- <62> 이와 같이 고추세균성점무늬병균의 병원성균주 접종 후 나타나는 친화적 반응과 비병원성균주 접종 후 나타나는 불친화적 반응에서 CaRFP1 유전자의 발현 양상을 도 6에 나타내었다. 도 6에서 숫자는 접종한 후 고추잎 채취시까지의 경과시간을 나타낸다.
- <63> 시험 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, CaRFP1 유전자가 세균성점무늬병 감염에 의해 빠르고 강하게 발현되었다. CaRFP1 유전자 또한 지금까지 알려진 고추 병방어 관련 유전자들의 발현에서처럼 친화적 반응에서 보다 불친화적 반응에서 빠르고 강하게 발현되었다. 버퍼인 10 mM $MgCl_2$ 만을 모크(mock)로 고추 잎에 인필트레이션한 경우는 CaRFP1 유전자 발현이 유도되지 않았다.
- <64> 친화적 반응에서 접종 후 2 시간에 약하게 발현되고 18 시간까지 그 발현 양이 증가, 유지되다가 24 시간이 되면 그 발현양이 약간 감소하였다. 불친화적 반응에서 CaRFP1 유전자의 mRNA는 접종 후 0.5 시간에 처음으로 관찰되고, 2-6 시간에 발현이 뚜렷하게 증가 하였으며, 12-18 시간에 이르러 최대로 강한 발현을 나타내었다. 불친화적인 균주 접종 24 시간 후에는 18 시간보다 그 발현양이 약간 감소되었으나, 친화적 반응에서의 발현보다는 매우 강하게 나타났다.
- <65> 이상과 같은 결과로 볼 때, 식물-병원균 상호 작용에서 나타나는 병방어 관련 유전자의 전형적인 발현 양상과 마찬가지로, CaRFP1 유전자는 친화적 반응에서보다 불친화적 반응에서 더욱 빠르고 강하게 발현됨을 알 수 있었다.
- <66> [실험예 2] 곰팡이 균주에 의한 CaRFP1 유전자의 유도 발현
- <67> 고추 잎 탄저병을 일으키는 곰팡이 균주 *Colletotrichum coccodes* 2-25의 균사 현탁액을 오토밀 아가 배지에서 5 일간 배양한 후, 5×10^5 cfu/ml의 분생 포자의 농도로 4 엽기와 8 엽기의 고추 식물체 잎에 분무 방법으로 접종하고, 28℃, 100 % 상대습도 조건에서 30 시간 동안 습실 처리하였다.
- <68> 접종 12, 24, 36, 48, 72 시간 후에 각각 잎을 채취하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기 영동한 후 나일론막으로 전이시켰다.
- <69> 시험 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, CaRFP1 유전자는 고추 잎 탄저병 감염에 대하여 4 엽기와 8 엽기의 고추 식물에서 모두 유도 발현되었다. 다만 8 엽기 고추 식물에서의 발현이 4 엽기 고추 식물에서의 발현보다 약간 강하였다.

- <70> 이상과 같은 결과로 볼 때, 병원균에 대한 식물의 성체 식물 저항성 발현에 있어, CaRFP1 유전자는 어린 식물에서보다 성체 식물에서 더욱 강하게 발현됨을 알 수 있었다.
- <71> [실험예 3] 화학적 유도체에 의한 CaRFP1 유전자의 유도 발현
- <72> 본 발명의 CaRFP1 유전자가 통상 저항성 유도에 사용되는 화학적 유도체에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여, 살리실산 (salicylic acid), 에틸렌(ethylene), 메틸자스모네이트 (methyl jasmonate), 소디움나이트로푸루사이트 (sodium nitropurusside), 메틸비올로젠 (methyl viologen), 마니톨 (mannitol) 및 염화나트륨 (sodium chloride)에 대하여 유전자 발현 유도 시험을 수행하였다.
- <73> 각각의 유전자 발현 유도 시험은 4 엽기의 고추식물을 이용하여 수행되었으며, 각 노던블러팅 수행시 25S 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였다.
- <74> 살리실산 처리를 위해서는, 5 mM 농도의 살리실산을 식물의 잎과 줄기에 골고루 엮면 살포하였다.
- <75> 에틸렌 처리를 위해서는, 고추 식물을 500 mL의 유리병에 옮기고 뚜껑을 막은 후, 뚜껑에 있는 실리콘을 통해 5 μ l/l의 에틸렌을 병 속으로 주입하였다.
- <76> 메틸자스모네이트 처리를 위해서는, 25 μ M 농도의 메틸자스모네이트를 고추식물의 잎과 줄기에 골고루 엮면 살포한 후 비닐로 싸 주었다.
- <77> 소디움나이트로푸루사이트 처리를 위해서는, 100 μ M의 농도의 소디움 나이트로 푸루사이트를 식물의 잎과 줄기에 골고루 엮면 살포하였다.
- <78> 메틸비올로젠 처리를 위해서는, 100 μ M의 농도의 메틸비올로젠을 식물의 잎과 줄기에 골고루 엮면 살포하였다.
- <79> 마니톨 처리를 위해서는, 고추 식물을 포트에서 조심스럽게 꺼내어 400 mM 농도의 마니톨에 뿌리를 담갔다.
- <80> 염화나트륨 처리를 위해서는, 고추 식물을 포트에서 조심스럽게 꺼내어 400 mM 농도의 염화나트륨에 뿌리를 담갔다.
- <81> 각각의 화학물질을 처리하고 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간 후에 각각 고추식물의 잎을 채취하여 이로부터 RNA를 분리한 다음, 상기 실시예 4, 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써 CaRFP1 유전자의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 8a 내지 도 8c에 나타내었다.
- <82> 시험 결과, 도 8a 내지 도 8c에 나타난 바와 같이, 식물병 방어반응에 관련되어 있는 식물체내의 식물 호르몬이자 신호 전달 물질(signal molecules)의 일종인 살리실산, 에틸렌(ethylene), 메틸자스모네이트(methyl jasmonate)와 환경 스트레스인 메틸비올로젠 (methyl viologen), 마니톨 (mannitol) 및 염화나트륨 (sodium chloride)의 외부적인 처리에 의하여 CaRFP1 유전자의 발현이 유도됨이 관찰되었다. 그러나 소디움나이트로푸루사이트 (sodium nitropurusside)에 의해서는 발현이 유도되지 않았다.
- <83> 살리실산의 처리에 반응하여 2 시간에 빠르고 강하게 발현되고, 5 시간에 최대로 발현되다가 10 시간에 20 시간에 걸쳐서 발현이 다소 감소되었다. 에틸렌의 처리에 반응하여 2 시간에 발현, 10 시간까지 발현이 증가하다가 20 시간에는 감소경향을 보였다. 메틸 자스모네이트에 의해서도 2 시간에 발현, 5 시간 이후로는 감소경향을 보였다. 메틸 비올로젠의 처리로 처리 3 시간에서 12 시간까지 매우 약한 발현이 관찰되었다. 마니톨 처리로 1 시간에 발현이 유도되었으며, 6 시간까지 약간 증가하며, 이후에는 감소 경향을 나타내었다. 염화나트륨 처리로 3 시간에 처음으로 유전자 발현이 일어났으며, 6 시간에서 24 시간에는 발현이 뚜렷하게 증가하였다.
- <84> 이상과 같은 결과로 볼 때, CaRFP1 유전자는 식물 외부로부터 유래한 다양한 종류의 신호전달경로에 의해 시간적인 양적인 차이를 보이며 발현이 활성화됨을 알 수 있었다.
- <85> [실시예 3] CaRFP1 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조
- <86> 상기 실시예 1에서 수득한 CaRFP1 유전자 이용한 형질전환 식물체 제조의 방법을 하기와 같이 시험하였다.
- <87> CaRFP1 유전자를 pBIN35S 바이너리 벡터에 도입하기 위해 pBluescript SK(-) vector에 삽입되어 있는 이 유전자를 제한효소 *Bam*HI과 *Sac*I의 제한 효소를 달아 증폭해 내고, pBIN35S 벡터에 라이게이션(ligation)하였다(도 9a 참조).
- <88> 이 벡터 구성물(construct)을 아그로박테리움 튜메파시엔스 EHA105 균주에 도입한 후 리팜피신과 카나마이신이 포함된 YEB 배지에서 형질 전환된 EHA105 균주를 선발하였다. 이 아그로박테리움을 배양한 후 꽃침지(Floral

dipping) 방법을 통하여 애기장대를 형질 전환하였다. T₁ 종자를 수확하여 카나마이신이 포함된 MS 배지에 파종하여 형질전환 식물체를 선발하여 각 형질전환 식물체 라인에서 CaRFP1 유전자가 정상적으로 발현됨을 관찰하였다(도 9b 참조). 대부분의 실험은 T₂ 또는 T₃ 종자를 가지고 수행되었다.

<89> [실험예 1] 병원성 슈도모나스 시린게 패소바 토마토 DC3000 균주에 대한 병방어 반응

<90> 슈도모나스 시린게 패소바 토마토 DC3000 균주를 King's B 배지에서 배양한 후 수거하여 10⁵ cfu/ml 농도로 세균 현탁액을 준비하였다. 바늘이 없는 1 ml 짜리 주사기를 이용하여 야생형과 형질전환 애기장대 식물체의 잎의 뒷면에 세균 현탁액을 인필트레이션 하였고, 식물을 습실 상에서 생육하여 병 진전을 관찰하였다. 접종한 잎을 취하여 10 mM MgCl₂로 마쇄 후 시리얼 희석한 용액을 King's B 배지에 도말하여 식물 잎 조직 내에서의 세균의 생장을 모니터링 하였다.

<91> 시험 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 야생형 식물에 비해 형질전환체 식물들은 슈도모나스 시린게 패소바 토마토 DC3000 균주의 감염에 대해 더욱 감수성으로 나타났다.

<92> [실험예 2] 염화나트륨에 의한 스트레스 내성

<93> 야생형과 형질전환 애기장대 식물체를 150 mM 염화나트륨이 포함된 MS 배지에서 생육하여, 본엽이 정상적으로 형성된 유묘의 수를 비교하였다. 성체 식물의 잎을 300 mM 염화나트륨 용액에 띄운 후 고농도의 염류의 처리에 대한 애기장대 식물의 잎 상태를 관찰하였다.

<94> 시험 결과, 도 11a 및 도 11b에 나타난 바와 같이, 야생형 식물에 비해 형질전환체 식물들은 염화나트륨 처리에 대해 내성을 보였다. 150 mM 염화나트륨 배지에서 형질전환 식물체는 야생형 식물체에 비하여 높은 수준의 본엽 형성률을 나타내었다. 300 mM 염화나트륨 용액에 띄운 야생형 식물의 잎 조직은 엽록소가 빠지면서 백화현상을 나타내었으나, 형질전환체 식물들은 라인별로 정도의 차이가 있으나 훨씬 저항성을 나타내었다(도 11a 및 도 11b 참조).

<95> [실험예 3] 건조에 의한 스트레스 내성

<96> 야생형과 형질전환 식물체로부터 잎을 취하여 40% 상대 습도 조건에서 잎을 건조시키면서 생체중의 변화를 관찰하였다.

<97> 시험 결과, 도 12a 및 도 12b에 나타난 바와 같이, 야생형 식물의 잎에서는 시간의 경과에 따라 급격한 생체중의 감소를 보였으나, 형질전환 식물체는 상대적으로 완만한 감소를 나타내었다.

발명의 효과

<98> 상술한 바와 같이, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병에 대해 저항성을 보이는 고추 한별 품종으로부터 식물병 방어반응에 관련된 신규한 단백질 유전자를 분리하여 그 염기서열을 결정하고 그에 의하여 코딩되는 아미노산 서열을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 기존의 링-핑거 단백질과는 구별되는 구조를 지닌 링-핑거 단백질유전자를 이용한 형질전환 벡터 및 형질전환 식물체를 제공한다.

<99> 따라서 본 발명은 상기 CaRFP1 유전자는 식물체 병원균, 화학물질, 및 환경스트레스에 대한 방어반응의 표지 및 식물병 감수성, 고염류 및 건조 내성 작물의 분자유종을 위한 유전자재료로 이용될 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

<100> 나아가, 본 발명은 상기 식물병 방어 세포막 단백질 유전자의 차별적 발현을 확인하는 것으로 구성되는 식물병원균, 화학물질 및 환경스트레스에 의한 식물체의 방어반응 여부 탐색방법을 제공함으로써 저항성 품종 개발을 촉진시킬 수 있는 효과가 있으므로 식물육종산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명에 의한 고추 링-핑거(RING-finger) 단백질 유전자 CaRFP1의 염기서열(서열번호 1)을 나타낸 도면이고,

<2> 도 2는 본 발명에 의한 고추 링-핑거 단백질 유전자 CaRFP1에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 서열(서열번호 2)을 나타낸 도면이고,

<3> 도 3은 본 발명에 의한 고추 링-핑거 단백질 유전자 CaRFP1에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 일차 구조에서

나타나는 독특한 도메인을 나타낸 도면이고,

- <4> 도 4는 본 발명에 의한 고추 링-핑거 단백질 유전자 CaRFP1에 의해 코딩되는 단백질과 유사한 단백질들과의 유연관계를 나타낸 도면이고,
- <5> 도 5는 본 발명에 의한 고추 링-핑거 단백질 유전자 CaRFP1에 의해 코딩되는 단백질의 링-핑거 도메인을 동물 및 식물 유래의 다른 단백질의 링-핑거 도메인의 아미노산 서열 비교한 도면이고,
- <6> 도 6은 고추 한별 품종에 고추세균성점무늬병을 일으키는 병원성 또는 비병원성 균주를 접종한 후 시간 경과에 따라 나타나는 감수성, 저항성 반응에서의 링-핑거 단백질 유전자 CaRFP1의 발현 양상을 나타낸 도면이고,
- <7> 도 7은 고추 한별 품종에 잎 탄저병을 일으키는 곰팡이 균주를 접종한 후 시간 경과에 따라 나타나는 4 엽기와 8 엽기 고추 식물에서의 링-핑거 단백질 유전자 CaRFP1의 발현 양상을 나타낸 도면이고,
- <8> 도 8a 내지 도 8c는 살리실산, 에틸렌, 메틸 자스모네이트, 소디움 나이트로 푸루사이트, 메틸 비올로젠, 마니톨, 염화나트륨에 의한 링-핑거 단백질 유전자 CaRFP1의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,
- <9> 도 9a 및 도 9b는 링-핑거 단백질 유전자 CaRFP1을 이용한 형질전환 식물체 개발에 이용한 벡터와 형질전환 식물체에서의 CaRFP1 유전자 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,
- <10> 도 10은 병원성 세균 슈도모나스 시린게 패소바 토마토 DC3000 균주 감염에 대한 CaRFP1 유전자 도입 형질전환 애기장대의 병 감수성을 나타낸 도면이고,
- <11> 도 11a 및 도 11b는 염화나트륨 처리에 대한 CaRFP1 유전자 도입 형질전환 애기장대의 내성을 나타낸 도면이고,
- <12> 도 12a 및 도 12b는 마니톨 및 건조 처리에 대한 CaRFP1 유전자 도입 형질전환 애기장대의 내성을 나타낸 도면이다.

도면

도면1

```

1 gtttgccggt attaggataa tgcagaacaa ccagagtcct tatttttagt cggttatgta
61 tgtatgtatg tatgtataca agtctcagtt ttatacccat ctatagccgc ctttaattct
121 tcttacacgc gtttaagtaa tattcaagat tcaagaaact tccatttttt atacataaaa
181 agatcctttc tttgataaag atcagatctt tagtaccaat ttgggttttg tttgtttttt
241 ttgattgatt tttgacaggc ctttttggtt attcttggg agaaagaaaa aaagttgtaa
301 tttttttttg atcaagggat ttgagatatt tgggtgtagaa agggttgact ttgatgggtg
361 gaaagagttc aagagaggat agttggaggc aaacatcatc gactagatct tcttggaatc
421 aatacgaata tcctccaact cactcatcat caccttctta tcctcaagat agttatagtt
481 attcatctca gcagcaggct gttccttcct atgcacctcc accacccac cagcaagctg
541 ttccttccta tgcacctgca ccacccaac agaattatgc ctctcatgct tcaagaccga
601 ggcttgaccg gagatactcg aggattgcag ataattataa ttccctggat gaggtgactg
661 aagcccttg cagagctggc ttagagtctt cgaatctaatt tgttggtatc gatttcacca
721 agagcaatga atggacaggat aagaggtctt ttggtaatcg gagcctacat cacattgggc
781 agaatttgaa cccctatgag caagcaattt ctataattgg aaaaaccttg gcagcatttg
841 atgaggataa cttgattccg tgttttggtt tgggagatgc atcaactcat gatcaagatg
901 tattcagttt ctttcccgat gaaaggtttt gtaatggctt tgaggaagtt ctgtttcggt
961 acagagaaat tgttccccag ttgaagcttg caggaccac gtcatttgcc ccagtcattg
1021 aaatggccat gacaatagtt gagcagagtg gaggccagta ccatgttcta ttaatcatcg
1081 cagatgggca ggtaactaga agtggttgata cgggacgtgg acaattaagt cccaggagc
1141 agaaaacggg ggtatgcaatt gtacaagcaa gcaagtcttc cttgtcaatt atactggtg
1201 gggttggcga tggaccctgg gatatgatga aggaatttga tgataatatt cctgctcggg
1261 actttgataa tttccagttt gtcaatttca cggagatcat ggccaaaaat gtgcctcaat
1321 ctgaaaagga gacggagttt gctctttcag cgttgatgga aatcccttca caatataaag
1381 cgacgatgga actgcaccta ctgggtgggc aaagtggaaa atctcccagt agggtagctc
1441 ttccccctcc tatgtatggg gcaacttctg tgggtgcttc aaagccctcg cgtgcaacga
1501 gttttcagca gcctacaagc tcttattatg gttatggaag ccctgcagat gcagctccgc
1561 attttcagca gacttcaagt tcttattata atagtgtctc cccagttgac actgttccat
1621 ctgctcctag ctctccctac attgctccca gttctacata tgacaatcag gtttgcccca
1681 tttgccttac caaccaaaa gacatggctt tgggtgtggt gcatcagaca tgttgcgatt
1741 gcgggagagc gcttgagaat tgtccaatat gtcgaagttc aattcaaacc cgaataaagc
1801 tctactgagc gagttgtttt gtcccagatt ccttttgctg ctccaatctc tgctattctt
1861 ttgatcagtt tggatggtga tgatgctgat ttttttattt gttggatagg cggtgactca
1921 atgtcaaggt ggattttatt ctgtaaatga tttggtgaca gtatagaggc ttcaagatcc
1981 cctgatatca gaagatttgt aaatcaacta tttatttgtc gcatgcaatg tcctgcaaga
2041 gtcttgtgct tctaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

```

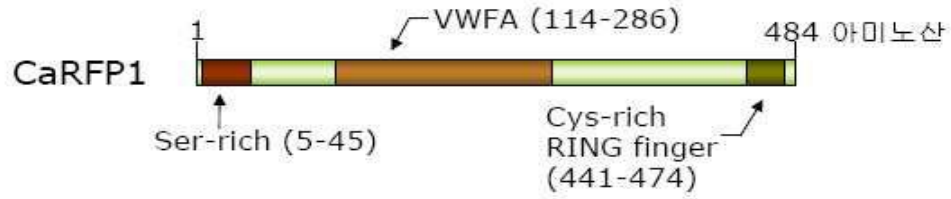
도면2

```

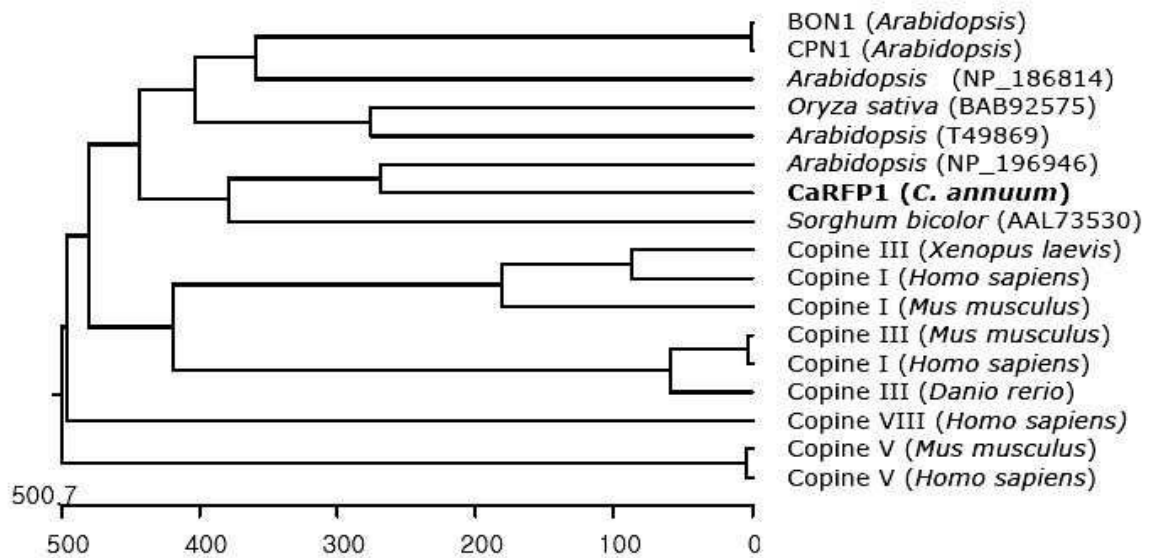
1 MGGKSSREDSWRQTSSTRSSWNQYEPPTHSSSPSYQDSYSYSSQQQAVPSYAPPPPHQQAVPSYAPAP
71 PQQNYASHASRPLDRYSRIADNYNSLDEVTEALARAGLESSNLIVGIDFTKSNEWTGKRSFGNRSLLH
141 IGQNLNPYEQAI SIIGKTLAAFDEDNLI PCFGFGDASTHDQDVFSFFPDERFCNGFEEVLFYREIVPQL
211 KLAGPTSFAPVIEAMTIVEQSGGQYHVLLIIADGQVTRSVDTGRGQLSPQEQTVDIVQASKFPLSII
281 LVGVGDGPWDMKEFDDNI PARDFDNFQFVNFT EIMAKNV PQSRKETEFALSALMEIPSQYKATMELHLL
351 GGQSGKSPSRVALPPPMYGATSVGASKPSRATSFQQPTSSYYGYGSPADAAPHFQQTS SSSYYNSAHPVDT
421 VPSAPSSPYIAPSSTYDNQVCPICLTNPKDMAFGCGHQTCDCGRALENCPICRSSIQTRIKLY

```

도면3



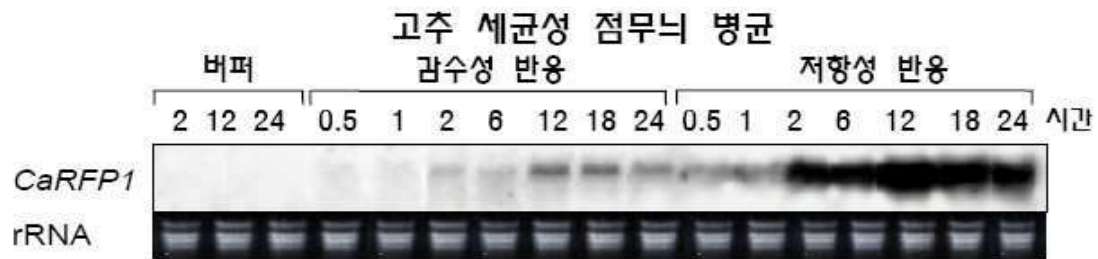
도면4



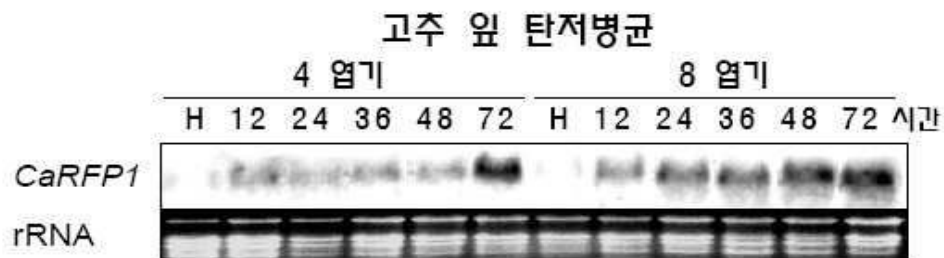
도면5

CaRFP1		*	*			*	*	*	**		*	*																					
NP_196946	425	CPIC	CL	TN	PK	DMA	F	G	C	G	H	Q	T	C	C	D	C	G	R	A	L	E	N	C	P	I	C		457				
NP_186814	446	CPIC	CL	SN	PK	DMA	F	G	C	G	H	Q	T	C	C	E	C	G	P	D	L	Q	M	C	P	I	C		478				
NP_201202	323	CPIC	CL	TN	PK	DMA	F	S	C	G	H	T	T	C	K	E	C	G	V	V	I	T	T	C	P	I	C		355				
NP_565206	357	CPIC	CL	TN	RK	DVA	F	S	C	G	H	M	T	C	G	D	C	G	S	K	I	S	N	C	P	I	C		389				
NP_914244	358	CPIC	CL	TN	PK	DMA	F	Q	C	G	H	L	T	C	K	E	C	G	P	T	L	S	T	C	P	I	C		390				
CAE53908	168	CPIC	W	S	E	A	K	N	L	A	F	G	C	G	H	Q	T	C	A	D	C	G	K	D	L	K	V	C	P	I	C	200	
BAC00992	955	CPIC	I	D	S	H	I	R	L	V	F	Q	C	G	H	G	A	C	A	P	C	G	S	A	L	S	A	C	P	I	C	987	
BAC00994	965	CPIC	I	D	S	H	I	R	L	V	F	Q	C	G	H	G	A	C	A	P	C	G	S	A	L	S	A	C	P	I	C	997	
NP_775393	987	CPV	C	L	D	R	L	K	N	M	I	F	L	C	G	H	G	T	C	Q	L	C	G	D	R	M	S	E	C	P	I	C	1019
BAC00993	904	CPIC	I	D	S	H	I	R	L	V	F	Q	C	G	H	G	A	C	A	P	C	G	S	A	L	S	A	C	P	I	C	936	
BAC77353	955	CPIC	I	D	R	H	I	R	L	V	F	Q	C	G	H	G	A	C	A	P	C	G	S	A	L	S	A	C	P	I	C	987	
NP_065825	963	CPV	C	L	D	R	L	K	N	M	I	F	L	C	G	H	G	T	C	Q	L	C	G	D	R	M	S	E	C	P	I	C	995
AAN18023	954	CPV	C	L	D	R	L	K	N	M	I	F	L	C	G	H	G	T	C	Q	L	C	G	D	R	M	S	E	C	P	I	C	986
AAN18022	954	CPV	C	L	D	R	L	K	N	M	I	F	L	C	G	H	G	T	C	Q	L	C	G	D	R	M	S	E	C	P	I	C	986

도면6



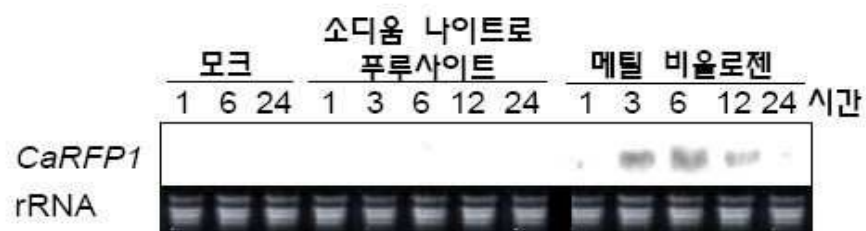
도면7



도면8a



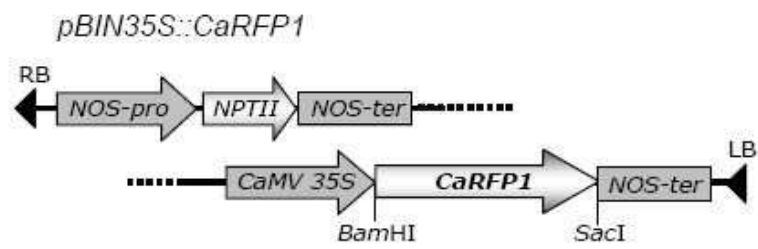
도면8b



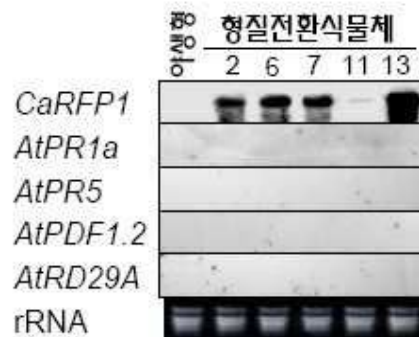
도면8c



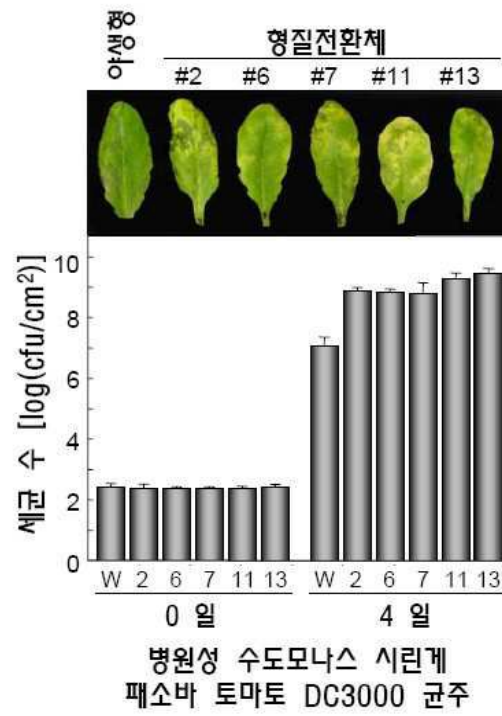
도면9a



도면9b



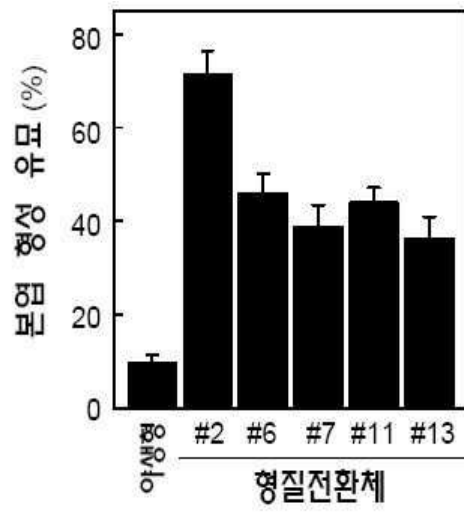
도면10



도면11a



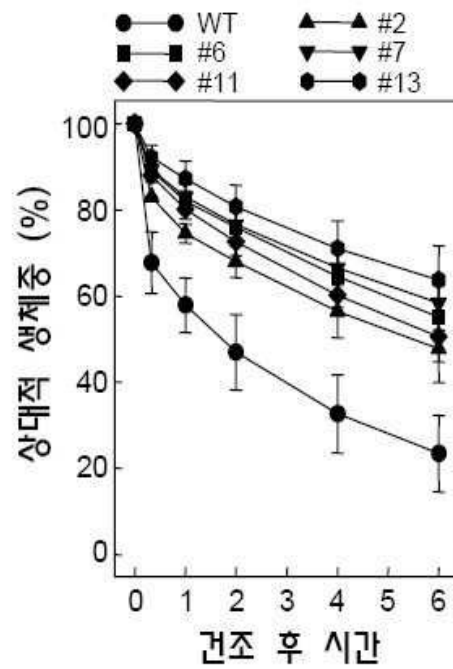
도면11b



도면12a



도면12b



서열목록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
- <120> Pepper RING-finger protein gene CaRFP1, useful detection method of plant disease defense responses, and transgenic plants using the same
- <130> P11-051229-02
- <160> 2
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 2084
- <212> DNA
- <213> Capsicum annuum L. cv. Hanbyul
- <400> 1
gtttgccggt attaggataa tgcagaacaa ccagagtcct tatitttagt cggttatgta

tgtatgtatg tatgtataca agtctcagtt ttatacccat ctatagccgc ctttaattct	120
tcttacacgc gttaaagtaa tattcaagat tcaagaaact tccatTTTTT atacataaaa	180
agatcccttc ttigataaag atcagatcct tagtaccaat ttgggttttg ttgtttttt	240
ttgattgatt ttigacaggc cttttgttg attcttgtgg agaaagaaaa aaagtgtaa	300
TTTTTTTT atcaagggat ttgagataat tgggttagaa agggttgact ttgatgggtg	360
gaaagagttc aagagaggat agttggaggc aaacatcatc gactagatct tcttgaatc	420
aatacgaata tctccaact cactcatcat caccttctta tctcaagat agttatagtt	480
attcatctca gcagcaggt gtctcttct atgcacctcc accacccac cagcaagctg	540
ttcttctta tgcacctgca ccacccaac agaattatgc ctctcatgct tcaagaccga	600
ggcttgaccg gagatactcg aggattgcag ataattataa ttccctggat gaggtgactg	660
aagcccttc acgagctggc ttagagtctt cgaatctaatt tgttggtatc gatctcacca	720
agagcaatga atggacaggt aagaggcttt ttggtaatcg gaggctacat cacattgggc	780
agaatttgaa ccctatgag caagcaattt ctataattgg aaaaacctg gcagcatttg	840
atgaggataa ctigattccg tgttttggat tcggagatgc atcaactcat gatcaagatg	900
tattcagttt cttcccgat gaaaggtttt gtaatggctt tgaggaagtt ctgttctgtt	960
acagagaaat tgttccccag ttgaagcttg caggaccac gtcatttgcc ccagtcattg	1020
aatggccat gacaatagtt gagcagagt gaggccagta ccatgttcta ttaatcatcg	1080
cagatgggca ggtaactaga agtgttgata ccggacgtgg acaattaagt cccaggagc	1140
agaaaacggt ggatgcaatt gtacaagcaa gcaagtttcc cttgtcaatt atactggttg	1200
gggttggcga tggacctgg gatatgatga aggaatttga tgataatatt cctgctcggg	1260

actttgataa tttccagttt gtcaatttca cggagatcat ggccaaaaat gtgcctcaat 1320

ctcgaaagga gacggagttt gctctttcag cgttgatgga aatcccttca caatataaag 1380

cgacgatgga acigcaccta ctgggtgggc aaagtggaaa atctcccagt agggtagctc 1440

ttccccctcc taigtatggg gcaacttctg tcggtgcttc aaagccctcg cgtgcaacga 1500

gttttcagca gcctacaagc tcttattatg gttatggaag cctgcagat gcagctccgc 1560

attttcagca gacttcaagt tcttattata atagtgtca cccagttgac actgttccat 1620

ctgtccttag ctctccctac attgtccca gttctacata tgacaatcag gtttgcccca 1680

tttgccttac caacccaaaa gacatggctt tcggctgtgg gcatcagaca tgttgcgatt 1740

gcgggagagc gcttgagaat tgtccaatat gtcgaagttc aattcaaacc cgaataaagc 1800

tctactgagc gagtgtttt gtcccagatt ccttttgctg ctccaatctc tgctattctt 1860

ttgatcagtt tggatgggta tgatgctgat ttttttattt gttggatagg cgttgactca 1920

atgtcaaggt ggattttatt ctgtaaatga tttggtgaca gtatagaggc ttcaagatcc 1980

cctgatatca gaagatttgt aaatcaacta tttatttgtc gcatgcaatg tcctgcaaga 2040

gtcttgtgct tctaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2084

<210> 2

<211> 484

<212> PRT

<213> Capsicum annuum L. cv. Hanbyul

<400> 2

Met Gly Gly Lys Ser Ser Arg Glu Asp Ser Trp Arg Gln Thr Ser Ser
1 5 10 15

Thr Arg Ser Ser Trp Asn Gln Tyr Glu Tyr Pro Pro Thr His Ser Ser
 20 25 30

Ser Pro Ser Tyr Pro Gln Asp Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Gln Gln Gln
 35 40 45

Ala Val Pro Ser Tyr Ala Pro Pro Pro Pro His Gln Gln Ala Val Pro
 50 55 60

Ser Tyr Ala Pro Ala Pro Pro Gln Gln Asn Tyr Ala Ser His Ala Ser
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Leu Asp Arg Arg Tyr Ser Arg Ile Ala Asp Asn Tyr Asn
 85 90 95

Ser Leu Asp Glu Val Thr Glu Ala Leu Ala Arg Ala Gly Leu Glu Ser
 100 105 110

Ser Asn Leu Ile Val Gly Ile Asp Phe Thr Lys Ser Asn Glu Trp Thr
 115 120 125

Gly Lys Arg Ser Phe Gly Asn Arg Ser Leu His His Ile Gly Gln Asn
 130 135 140

Leu Asn Pro Tyr Glu Gln Ala Ile Ser Ile Ile Gly Lys Thr Leu Ala
 145 150 155 160

Ala Phe Asp Glu Asp Asn Leu Ile Pro Cys Phe Gly Phe Gly Asp Ala
 165 170 175

Ser Thr His Asp Gln Asp Val Phe Ser Phe Phe Pro Asp Glu Arg Phe
 180 185 190

Cys Asn Gly Phe Glu Glu Val Leu Phe Arg Tyr Arg Glu Ile Val Pro
 195 200 205

Gln Leu Lys Leu Ala Gly Pro Thr Ser Phe Ala Pro Val Ile Glu Met
 210 215 220

Ala Met Thr Ile Val Glu Gln Ser Gly Gly Gln Tyr His Val Leu Leu
 225 230 235 240

Ile Ile Ala Asp Gly Gln Val Thr Arg Ser Val Asp Thr Gly Arg Gly
 245 250 255

Gln Leu Ser Pro Gln Glu Gln Lys Thr Val Asp Ala Ile Val Gln Ala
260 265 270

Ser Lys Phe Pro Leu Ser Ile Ile Leu Val Gly Val Gly Asp Gly Pro
275 280 285

Trp Asp Met Met Lys Glu Phe Asp Asp Asn Ile Pro Ala Arg Asp Phe
290 295 300

Asp Asn Phe Gln Phe Val Asn Phe Thr Glu Ile Met Ala Lys Asn Val
305 310 315 320

Pro Gln Ser Arg Lys Glu Thr Glu Phe Ala Leu Ser Ala Leu Met Glu
325 330 335

Ile Pro Ser Gln Tyr Lys Ala Thr Met Glu Leu His Leu Leu Gly Gly
340 345 350

Gln Ser Gly Lys Ser Pro Ser Arg Val Ala Leu Pro Pro Pro Met Tyr
355 360 365

Gly Ala Thr Ser Val Gly Ala Ser Lys Pro Ser Arg Ala Thr Ser Phe
370 375 380

Gln Gln Pro Thr Ser Ser Tyr Tyr Gly Tyr Gly Ser Pro Ala Asp Ala
385 390 395 400

Ala Pro His Phe Gln Gln Thr Ser Ser Ser Tyr Tyr Asn Ser Ala His
405 410 415

Pro Val Asp Thr Val Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Tyr Ile Ala Pro
420 425 430

Ser Ser Thr Tyr Asp Asn Gln Val Cys Pro Ile Cys Leu Thr Asn Pro
435 440 445

Lys Asp Met Ala Phe Gly Cys Gly His Gln Thr Cys Cys Asp Cys Gly
450 455 460

Arg Ala Leu Glu Asn Cys Pro Ile Cys Arg Ser Ser Ile Gln Thr Arg
465 470 475 480

Ile Lys Leu Tyr

