

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0041118 (43) 공개일자 2016년04월18일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/53 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)		(71) 출원인 세종대학교산학협력단 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(21) 출원번호 10-2014-0134198		(72) 발명자 좌남수 서울 광진구 자양변영로3길 65, 102동 1501호 (자양동, 자양삼성아파트)
(22) 출원일자 2014년10월06일 심사청구일자 2015년10월06일		(74) 대리인 양부현

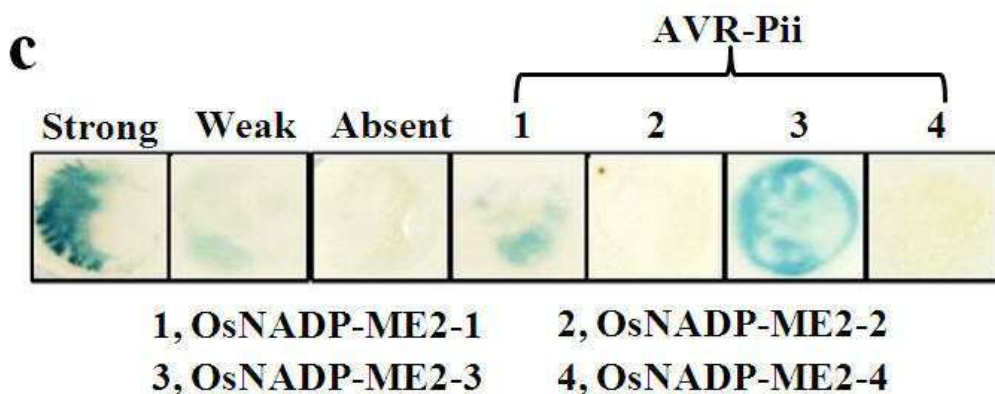
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 식물 질병에 대한 저항성 증진물질의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 식물 질병에 대한 저항성 증진물질의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 특히 병원체(pathogen)에 대한 저항성을 증진시키는 신규한 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해 선별된 물질은 이펙터 단백질과 저항성 단백질의 결합을 차단함으로써, 식물체의 초기 보호기작인 ROS의 생성을 유도한다. 특히, ROS 생성과 관련된 효소를 유도하는 저항성 단백질인 NADP-ME2과 M. 오리자의 이펙터 단백질인 AVR-Pii 간의 결합을 차단함으로써, 식물체로의 초기 균류의 침입을 효과적으로 방어한다. 한편, 본 발명의 병원체 저항성 증진 조성물은 식물 생장과 수확량에 전혀 영향을 주지 않으면서 병원균 침입 시 효과적으로 식물 면역 시스템을 조절할 수 있으며, 이로써 식물 질병 저항성 품종의 육종소재로서의 가능성을 제시한다.

대표도 - 도1c



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008061

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21

연구과제명 형질전환을 통한 인디카벼 육종기반기술 구축

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 식물 질병을 유발하는 병원균(pathogen)의 이펙터 단백질(effector protein), 식물의 저항성 단백질(resistance protein) 및 시험물질을 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 이펙터 단백질 및 저항성 단백질의 결합 여부를 측정하는 단계를 포함하는 식물 질병에 대한 저항성 증진물질의 스크리닝 방법으로서, 상기 이펙터 단백질이 상기 저항성 단백질과 결합하지 않거나 결합이 감소되는 경우, 상기 시험물질을 식물 질병에 대한 저항성 증진물질로서 판단한다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 이펙터 단백질은 비병원성-이펙터 단백질(avirulence-effector protein)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 저항성 단백질은 식물의 초기 방어기작 관련된 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 저항성 단백질은 ROS 생성 관련 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 이펙터 단백질은 상기 저항성 단백질에 결합하여 상기 저항성 단백질의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 이펙터 단백질 및 식물 저항성 단백질은 각각의 결합 모티프(binding motif) 서열로 이루어진 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 이펙터 단백질은 Avr-Pii이고, 식물 저항성 단백질은 NADP-ME2 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 식물은 벼, 밀 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류;

장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 식물체는 벼이고, 상기 병원체는 벼 도열병균인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 벼 도열병균은 마그나포르테(*Magnaporthe*) 속인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

식물 질병을 유발하는 병원체(pathogen)의 이펙터 단백질(effector protein) 또는 식물의 저항성 단백질(resistance protein)의 결합 모티프(binding motif)에 결합하여 상기 이펙터 단백질과 저항성 단백질의 결합을 억제하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 유전자 전달체를 포함하는 식물의 저항성 증진 조성물.

청구항 12

제 11 항의 조성물로 형질전환된 식물세포.

청구항 13

제 11 항의 조성물로 형질전환된 식물체.

청구항 14

다음의 단계를 포함하는 식물 질병 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법:

- (a) 제 11 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계; 및
- (b) 상기 식물세포로부터 식물 질병 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

청구항 15

제 11 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 식물의 저항성 부여방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물 질병에 대한 저항성 증진물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Flor의 유전자 대 유전자설(Flor gene-for-gene hypothesis)이 도입된 이래, 식물의 질병 저항성 메커니즘은

아직 불명확한 것으로 남아있다. 박테리아성 병원균에서 타입 III 분비 시스템의 동정과 관련하여, 이펙터 단백질(effector protein)이 병독성(virulence)에 중요한 것으로 증명되었고, 최근 균류 병원균에서의 이펙터(effectors)의 생물학적 활성이 특정되었다. 그러나, 저항성-단백질(resistance-protein, R-protein) 및 비병원성-이펙터(avirulence-effectors, AVR-effectors)가 식물 질병 반응과 어떠한 연관성이 있는지는 아직 불명확하다. 반활물기생 마그네포르테 오리자(hemibiotrophic *Magnaporthe oryzae*)는 벼 도열병(rice blast disease)을 유발시키는 매우 파괴적인 식물 균류 병원균으로서, 유전자 대 유전자 모델로서 널리 연구되어 왔다. M. 오리자(*M. oryzae*)는 상피 세포벽을 관통하는 부착기(appressorium)를 형성하고, 기생영양(biotrophic) 상호작용(2)을 위한 세포내 침습적 균사(invasive hyphae, IH)를 형성한다. 이러한 기생영양 상호작용은 숙주 대사체(3) 및 전사체(4)의 대규모 리프로그래밍(reprogramming)을 유도한다. 최근, 생세포 이미징을 적용하여, 균류 병원체-유래 단백질 전좌(translocation)가 가능함이 확인되었다(2, 5-9). 이러한 기술은 사상균 IH로부터 발달한 과근상 가성균사(bulbous pseudohyphal) 구조를 감싸는 추가-침습적 균사 막(extra-invasive hyphal membrane, EIHM)을 연구하는데 이용되어 왔다. IH를 둘러싼 추가-침습적 균사 매트릭스(extra-invasive hyphal matrix, EIHMx)는 역동적인 분자적 상호작용 또는 숙주가 정상적인 기능을 하지 못하도록 하는 다양한 생물체를 위한 공간으로서 존재한다(10). Pep1(7), Pit2(11), Cmul(8), 및 Avr2(12)는 EIHMx에서 숙주 면역 반응을 억제하는 균류 이펙터이다. EIHMx에서의 숙주-미생물 상호작용과 함께, M. 오리자는 Avr-이펙터가 축적되는 곳에서 특정 기생영양 계면복합체(biotrophic interfacial complex, BIC)를 형성한다(2, 13). 이 때, BIC는 식물-유래 계면 작용자 운반 시스템인 것으로 판단되며, 반활물기생 콜레토틱리쿰 히그인시아눔(*Colletotrichum higginsianum*)(5)에서 유사한 구조가 관찰되었다. M. 오리자 Avr-Pizt(14), AVR-Pita1(15), PwL1(15), 및 PwL2(2,15)는 주로 BIC에 축적되며, 벼의 세포질로 분비된다. BIC-매개 전달 시스템은 소포체-골지 분비 경로(16)를 포함하여 두 가지 구별되는 분비 메커니즘을 나타낸다. M. 오리자 AVR-이펙터는 작은 분자량을 가지는 다른 알려진 단백질에 대하여 낮은 서열 상동성 및 종 특이성을 나타낸다 [AVR-Pita(17), AVR-Pii(18), AVR-Piz-t(18), AVR-Pik-m(18), 및 AVR-Pia(19)]. 최근, M. 오리자 AVR-Pizt는 벼의 면역반응을 유발하는 병원균-연관 분자 패턴을 억제하는 것으로 나타났다(14).

[0003] 식물에서의 ROS 생성은 병원균을 인식한 후 초기 보호기작 중의 하나이며(20), 이는 식물의 방어 기작과 관련하여 잘 알려져 있다(21). 최근 연구에서 감염에 대한 반응을 포함하여(22, 23) 복잡한 신호 네트워크에서의 주요 분자로서 ROS의 광범위한 역할이 밝혀진 바 있다. 최근 무독성 병원균의 감염 후 특정 이 상성(biphasic) ROS 축적이 관찰되었으며, 반면 독성 병원균의 감염 후에는 단일 상(monophasic)의 ROS 축적만이 관찰되었다(24-26). 그러나, 이 상성(biphasic) ROS 생성 메커니즘이 유전자 대 유전자 상호작용을 통한 무독성 반응과 어떠한 관련이 있는지는 불명확하다. IH(3)에 의한 군집화된 세포에 인접한 숙주 세포에서 유의적인 ROS 축적이 나타났다.

[0004] NADPH-옥시다아제(NADPH-oxidase D, RbhoD)는 슈퍼옥사이드 음이온($O_2^{\cdot -}$)을 생성하는 플라즈마 막-결합된 효소로서, 슈퍼옥사이드 음이온은 ADP-ME2(23)에 의해 제공되는 NADPH를 이용하여 효소적 또는 자발적으로 과산화수소로 불균등화(dismutation)된다. ADP-ME2는 M. 오리자 감염에 대하여 ROS 생성과 관련된 효소를 빠르고 충분하게 유도한다(3, 4). 특히, ADP-ME2 활성은 저항성 품종에서 빠르게 증가된다; 그러나, 민감한 재배 품종에서는 현저히 억제된다(3). 이러한 종-특이적 ROS 축적 패턴은 유전자 대 유전자-기반 식물 질병 저항성에 있어서 ADP-ME2가 관련됨을 강력히 뒷받침해 준다. 이에, 본 발명자들은 M. 오리자의 이펙터 단백질(effector protein)인 AVR-Pii가 숙주의 선천적 면역계를 파괴하고 ADP-ME2의 활성을 방해하는 중요한 병원성 결정인자로서 작용함을 밝히고, 이를 이용하여 벼 도열병 방제를 위한 조성물을 개발하고자 한다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 반활물기생(hemibiotrophic) 균류 병원균인 M. 오리자의 이펙터 단백질인 AVR-Pii의 활성을 억제

하여 병원균의 침입 초기단계에 균류(예컨대, 벼 도열병균)의 침입을 근본적으로 차단할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, AVR-Pii의 타겟 단백질인 NADP-malic 효소를 동정하였으며, 상기 AVR-Pii가 NADP-malic 효소에 결합하여 효소의 활성을 직접적으로 억제함으로써 숙주의 선천적 면역계를 파괴한다는 사실을 밝혀냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

- [0007] 따라서 본 발명의 목적은 식물 질병에 대한 저항성 증진물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 식물 질병에 대한 저항성 증진 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 식물 질병에 대한 저항성 식물체의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 식물 질병에 대한 저항성 식물세포 및 식물체를 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 식물의 저항성 부여방법을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 식물 질병을 유발하는 병원체(pathogen)의 이펙터 단백질(effector protein), 식물의 저항성 단백질(resistance protein) 및 시험물질을 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 이펙터 단백질 및 저항성 단백질의 결합 여부를 측정하는 단계를 포함하는 식물 질병에 대한 저항성 증진물질의 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 이펙터 단백질이 상기 저항성 단백질과 결합하지 않거나 결합이 감소되는 경우, 상기 시험물질을 식물 질병에 대한 저항성 증진물질로서 판단한다.
- [0014] 본 발명자들은 반활물기생(hemibiotrophic) 균류 병원균인 M. 오리자의 이펙터 단백질인 AVR-Pii의 활성을 억제하여 병원균의 침입 초기단계에 균류(예컨대, 벼 도열병균)의 침입을 근본적으로 차단할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, AVR-Pii의 타겟 단백질인 NADP-malic 효소를 동정하였으며, 상기 AVR-Pii가 NADP-malic 효소에 결합하여 효소의 활성을 직접적으로 억제함으로써 숙주의 선천적 면역계를 파괴한다는 사실을 밝혀내었다.
- [0015] 마그네포르테 오리자(*Magnaporthe oryzae*)는 세계적으로 벼의 생산량에 영향을 주는 균류 병원균으로서, 새로운 균종의 출현으로 인하여 남미에서의 밀 생산량을 위협하고 있다. 병원균은 숙주 면역체계를 억제시킴으로써 숙주에서 대량 서식하게 되고, 숙주의 R-단백질 및 AVR-이펙터(effector)는 감염과 연관성이 높은 것으로 알려져 있다. 그러나 M. 오리자(M. oryzae)가 숙주의 면역계를 어떻게 극복하는지에 대해서는 불분명하다. 이에, 본 발명자들은 반활물기생(hemibiotrophic) 균류 병원균인 M. 오리자가 AVR-Pii를 분비하여 벼의 NADP-malic 효소를 직접적으로 억제함으로써 숙주의 선천적 면역계를 파괴한다는 그 첫 번째 기능적인 근거를 제공한다. 특히, 본 발명자들은 AVR-Pii가 타겟-특이적 이펙터로서 기능하여 감염에 대한 벼의 중요 방어 기작인 아포플라스틱(apoplastic) 활성 산소종(ROS) 생성 시스템을 무능화시킨다는 것을 증명하였다. AVR-Pii-유발 벼의 선천성 면역계의 파괴는 식물-미생물 상호작용에서 AVR-이펙터가 중요한 기능을 함을 보여준다.
- [0016] 즉, 본 발명자들은 AVR-Pii의 타겟 유전자로서 NADP-ME2를 규명하였고, AVR-Pii와 NADP-ME2의 결합을 방해함으로써 식물에서의 발병을 억제할 수 있음을 최초로 밝혀내었으며, 이를 이용하여 식물체로의 초기 균류의 침입을 효과적으로 방어할 수 있다.
- [0017] 본 명세서에서 용어 “면역(immunity)”은 생물적 또는 비생물적 환경스트레스에 대한 내성 또는 저항성을 나타내는 것을 의미하며, 방어 반응(defense response)과 동일한 의미로 사용된다. 상기 생물적 스트레스란 해충, 균류, 박테리아 등의 병원체(pathogen) 등에 대한 스트레스이고, 상기 비생물적 스트레스란 염, 저온, 건조 또는 광(빛) 등에 대한 스트레스를 포함한다. 본 발명에서 상기 면역은 바람직하게는 생물적 스트레스에 대한 면역을 의미하고, 보다 바람직하게는 병원체에 대한 면역을 의미한다.
- [0018] 본 발명의 방법은 공지된 다양한 식물체에 적용될 수 있으며, 예컨대 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥,

귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 툴페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료 작물류에 적용될 수 있다.

- [0019] 본 명세서에서 용어 “이펙터 단백질(effector protein)”은 병원균, 예컨대, 균류(fungi), 박테리아(bacteria) 등에서 숙주 세포 내로 분비되는 단백질로서, 숙주세포 내로 병원균의 침입을 유도하여 숙주의 면역 시스템을 억제하거나 병원균의 생존을 돕는 역할을 한다. 본 발명에 따르면, 상기 이펙터 단백질은 비병원성-이펙터 단백질(avirulence-effector protein)이며 유전자 대 유전자설(gene for gene hypothesis)에서는 숙주의 저항성 유전자(Resistance gene)에 대응했을 때 저항성이 발휘되는 단백질을 의미한다. 상기 이펙터 단백질은 식물의 저항성 단백질에 결합하여 이의 활성을 억제시키는 기능을 한다.
- [0020] 본 명세서에서 용어 “병원체(pathogen)”는 박테리아(bacteria), 균류(fungi), 효모(yeast), 오어마이시트(oomycete) 및 바이러스를 포함한다. 본 발명에 따르면, 상기 병원체는 균류(fungi)이다.
- [0021] 본 발명의 식물 질병에 대한 저항성 증진물질의 스크리닝 방법에 대하여 각각의 단계 별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0022] 단계 (a): 병원체의 이펙터 단백질, 식물의 저항성 단백질 및 시험물질의 접촉
- [0023] 우선, 병원체의 이펙터 단백질, 식물의 저항성 단백질 및 시험물질을 서로 접촉시킨다. 병원체의 이펙터 단백질과 식물의 저항성 단백질에 결합 모티프가 있는 경우, 양 단백질은 복합체를 형성하며, 저항성 단백질의 활성은 이펙터 단백질에 의해 저해된다.
- [0024] 본 발명의 식물 질병 저항성 증진 물질(시험물질)의 스크리닝 방법은 상기 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질에 결합하여 양 단백질의 결합을 억제 또는 감소시키는 물질을 스크리닝함으로써 실시할 수 있다. 이 경우 이펙터 단백질 및 저항성 단백질로서, 분리된 형태의 단백질 또는 세포 내에 포함되어 있는 단백질 등 어떠한 형태의 것도 사용할 수 있다. 상기 식물 질병 저항성 증진 물질은 상기 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질의 결합 모티프(binding motifs) 결합하여 양 단백질의 결합을 차단하거나, 상기 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질에 결합함으로써 결합 모티프의 구조를 변형시키는 방법으로써, 식물의 저항성을 억제시키는 이펙터 단백질의 기능을 무력화시킬 수 있다.
- [0025] 상기 접촉은 인 비트로 또는 인 비보 상에서 수행될 수 있으며, 예컨대 상기 방법이 (1) 단백질간 상호작용-기반(protein-protein interaction-based)의 인 비트로 스크리닝 방법일 경우에는 상기 이펙터 단백질, 저항성 단백질 및 시험물질을 인 비트로 상에서 결합시켜 수행할 수 있고, (2) 세포-기반(cell-based) 스크리닝일 경우에는 식물 질병을 유발하는 균류의 이펙터 단백질(effector protein), 식물의 저항성 단백질(resistance protein)을 포함하는 세포에 시험물질을 접촉시켜 세포 내 이펙터 단백질-저항성 단백질의 결합을 유도하여 수행할 수 있다. 이 경우, 세포 내 상기 이펙터 단백질 및 저항성 단백질의 결합 여부를 측정하는 단계를 포함하게 되고, 상기 이펙터 단백질과 상기 저항성 단백질의 결합이 하향 조절(down-regulation)되는 경우, 상기 시험물질을 식물 질병에 대한 저항성 증진물질로서 판단한다. 한편, (3) 본 발명에서와 같이 식물체에 균류를 직접 도포하여 접촉함으로써 이펙터 단백질-저항성 단백질의 결합을 유도하여 수행할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 이용되는 세포는 식물 세포로서, 균류의 이펙터 단백질이 접종된 또는 침입한 모든 식물 세포를 포함한다. 본 발명에 따르면, 상기 세포는 벼 또는 밀의 세포이다.
- [0027] 본 발명에 따르면, 식물의 저항성 단백질은 식물의 초기 방어기작 관련된 단백질로서, ROS 생성 관련 단백질인 NADP-ME2 단백질이다.
- [0028] 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험 물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)이다. 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable

parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

[0029] 단계 (b): 이펙터 단백질 및 저항성 단백질의 결합 측정

[0030] 이어, 이펙터 단백질 및 저항성 단백질의 결합 정도를 측정한다.

[0031] 이펙터 단백질-저항성 단백질의 결합은 다양한 분석 방법에 따라 실시할 수 있으며, 특히 당업계에 공지된 다양한 결합 분석(binding assay)에 따라 고속(high throughput) 방식으로 실시할 수 있다. 예컨대, 세포 기반 분석법, 인 비트로 분석법 또는 이스트-투 하이브리드 분석법을 이용할 수 있다. 한편, 이펙터 단백질-저항성 단백질의 결합 모티프를 이용한 분석법(binding assay)도 가능하다. 이 경우, 상기 이펙터 단백질 및 식물 저항성 단백질은 각각의 결합 모티프(binding motif) 서열로 이루어진 아미노산 서열로 구성된다.

[0032] 한편, 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 시험물질, 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질은 검출가능한 표지(detectable label)로 레이블링될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지(detectable label)는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼린 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시페라아제, β -갈락토시다아제 및 β -글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광 표지 [예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM], 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.

[0033] 검출가능한 표지가 레이블링된 시험물질, 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질을 이용하는 경우, 시험물질, 이펙터 단백질 및 저항성 단백질 사이의 결합 발생 여부는 표지로부터 나오는 시그널을 검출하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 표지로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을 검출한다. 표지로서 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌과 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.

[0034] 택일적으로, 시험물질의 이펙터 단백질, 저항성 단백질, 이펙터 단백질 및 저항성 단백질, 또는 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질의 결합 모티프(binding motif)로의 결합 여부는 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 분석할 수도 있다. 예를 들어, 마이크로피지오미터(microphysiometer)를 이용하여 시험물질이 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질에 결합하는 지 여부를 분석할 수 있다. 마이크로피지오미터는 LAPS(light-addressable potentiometric sensor)를 이용하여 셀이 그의 환경을 산성화하는 속도를 측정하는 분석 도구이다. 산성화 속도의 변화는, 시험물질과 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질 사이의 결합에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다(McConnell et al., *Science* 257:19061912(1992)).

[0035] 시험물질의 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질과의 결합 능력은 실시간 이분자 상호작용 분석(BIA)를 이용하여 분석할 수 있다(Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63:23382345(1991), and Szabo et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699705(1995)). BIA는 실시간으로 특이적 상호작용을 분석하는 기술로서, 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 실시할 수 있다(예컨대, BIAcore™). 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자들 사이의 실시간 반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 스크리닝 방법은, 투-하이브리드 분석 또는 쓰리-하이브리드 분석 방법에 따라 실시할 수 있다(U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al., *Cell* 72, 223232, 1993; Madura et al., *J. Biol. Chem.* 268,

1204612054, 1993; Bartel et al., *BioTechniques* 14, 920924, 1993; Iwabuchi et al., *Oncogene* 8, 16931696, 1993; 및 WO 94/10300). 이 경우, 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질을 바이트(bait) 단백질로 이용할 수 있다. 이 방법에 따르면, 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질에 결합하는 물질, 특히 단백질을 스크리닝 할 수 있다. 투-하이브리드 시스템은 분할 가능한 DNA-결합 및 활성화 도메인으로 구성된 전사인자의 모듈 특성에 기초한다. 간단하게는, 이 분석 방법은 두 가지 DNA 컨스트럭트를 이용한다. 예컨대, 하나의 컨스트럭트에서, 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질-코딩 폴리뉴클레오타이드를 공지의 전사 인자(예컨대, GAL-4)의 DNA 결합 도메인-코딩 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 다른 컨스트럭트에서, 분석 대상의 단백질(“프레이” 또는 “시료”)을 코딩하는 DNA 서열을 상기 공지의 전사인자의 활성화 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 만일, 바이트 및 프레이가 인 비보에서 상호작용하여 복합체를 형성하면, 전사인자의 DNA-결합 및 활성화 도메인이 인접하게 되며, 이는 리포터 유전자(예컨대, *LacZ*)의 전사를 촉발하게 된다. 리포터 유전자의 발현을 검출할 수 있으며, 이는 분석 대상의 단백질이 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질과 결합할 수 있음을 나타내는 것이며, 결론적으로 이펙터 단백질을 무력화시켜 식물 질병 저항성 증진 물질로 이용될 수 있음을 나타내는 것이다.

[0037] 본 발명에 따르면, 병원체가 균류인 벼 도열병인 경우, 상기 벼 도열병균은 마그나포르테(*Magnaporthe*) 속이며, 상기 이펙터 단백질은 Avr-Pii (서열목록 제 1 서열)이고, 식물 저항성 단백질은 NADP-ME2 (서열목록 제 2 서열) 단백질이다.

[0038] 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 상기 이펙터 단백질과 상기 저항성 단백질의 결합을 하향 조절(down-regulation) 하는 것으로 분석된 물질은 식물 질병 치료제 또는 식물 질병 저항성 증진물질의 후보물질로서 이용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 식물 질병을 유발하는 병원체(pathogen)의 이펙터 단백질(effector protein) 또는 식물의 저항성 단백질(resistance protein)에 결합하여 상기 이펙터 단백질과 저항성 단백질의 결합을 억제하는 물질을 포함하는 식물체의 저항성 증진 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명의 식물체의 저항성 증진 조성물은 병원체(pathogen)의 이펙터 단백질(effector protein), 식물의 저항성 단백질(resistance protein), 이펙터 단백질 및 저항성 단백질, 또는 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질의 결합 모티프(binding motif)에 결합가능한 물질을 모두 포함한다.

[0041] 상기 물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물) 또는 핵산 분자, 아미노산 서열, 단백질 등의 유기 분자를 포함한다. 화합물인 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있으며, 이에 대한 설명은 상술한 바와 같다. 한편, 상기 물질이 아미노산 서열인 경우 이펙터 단백질(effector protein) 또는 저항성 단백질(resistance protein)의 결합 모티프(binding motif)에 결합하여 양 단백질의 결합을 차단할 수 있다. 또는 상기 물질이 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질에 결합하여 결합 모티프의 구조를 변화시켜 이펙터 단백질이 저항성 단백질에 결합하는 것을 차단할 수도 있다.

[0042] 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질에 결합가능한 아미노산은 이펙터 단백질 또는 저항성 단백질의 결합 부위의 아미노산 서열과 적어도 약 50%, 60% 또는 70%의 상동성이 있고, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80% 또는 82%의 상동성이 있으며, 보다 더 바람직하게는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% 또는 97%의 상동성이 있으며, 보다 더욱 더 바람직하게는 적어도 98%, 99% 또는 그 이상의 상동성이 있다.

[0043] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 식물 질병을 유발하는 병원체(pathogen)의 이펙터 단백질(effector protein) 또는 식물의 저항성 단백질(resistance protein)의 결합 모티프(binding motif)에 결합하여 상기 이펙터 단백질과 저항성 단백질의 결합을 억제하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 유전자 전달체를 포함하는 식물체의 저항성 증진 조성물이다.

[0044] 상기 핵산 분자는 결합 모티프(binding motif)의 코딩 서열, 이의 프로모터, 5' UTR (untranslated region) 및 3' UTR의 서열을 모두 포함한다.

[0045] 본 발명에서 상기 핵산 서열을 운반하는 상기 유전자 전달체(gene carrier)는 당업계에 공지된 다양한 유전자 전달체(벡터)를 이용할 수 있으며, 예컨대, 플라스미드, 파아지 등을 포함하며, 바람직하게는 상기 유전자 전달체는 플라스미드이다.

[0046] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은

Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

- [0047] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 유전자 전달체는 (i) 병원체(pathogen)의 이펙터 단백질(effector protein) 또는 식물의 저항성 단백질(resistance protein)의 결합 모티프(binding motif)의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자; (ii) 상기 핵산 분자에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터이다.
- [0048] 본 발명의 상기 재조합 벡터는 식물세포에서 작동가능한 프로모터를 포함한다. 본 발명에 적합한 프로모터는, 식물체의 형질전환을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예컨대, 콜리플라우어 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 신타아제(nos) 프로모터, 피그윌트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤벨리나 엘로우 모틀 바이러리스 프로모터, 리볼로오스-1,5-비스-포스페이트 카복실라아제 스몰 서브유닛(ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토솔 트리오스 포스페이트 이소머라아제(TPI) 프로모터, 아라비도시스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(APRT) 프로모터, 옥토파인 신타아제 프로모터 및 옥수수의 유비퀴틴 프로모터를 포함하며, 바람직하게는 콜리플라우어 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터이다.
- [0049] 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절 인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.
- [0050] 본 발명에서 상기 재조합 벡터는 적합한 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열(3' -비-해독화 부위)은 아그로박테리움 튜메이션스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것(nos 3' end)(Bevan et al., *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385(1983)), 아그로박테리움 튜메이션스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분 및 CaMV 35S 터미네이터를 포함하며, 바람직하게는 CaMV 35S 터미네이터이다.
- [0051] 선택적으로, 상기 재조합 벡터는 리포터 분자(예: 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반할 수 있다. 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 선택 표지로서 항생제(예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자(예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(*npt II*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제(*hpt*), 등)를 포함한다.
- [0052] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 병원체에 대한 면역을 증진시켜 상기 식물체에 병원체(pathogen) 저항성을 부여하며, 상기 병원체는 박테리아(bacteria), 균류(fungi), 효모(yeast), 오어마이시트(oomycete) 및 바이러스(virus)를 포함하며, 보다 바람직하게는 박테리아 또는 균류이다.
- [0053] 상기 박테리아는 슈도모나스 아베나(Pseudomonas avenae subsp. avenae), 슈도모나스 안드로포고니스(Pseudomonas andropogonis), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 헤르니파라시틱 박테리아(Herniparasitic bacteria) 또는 코리네박테리움 미치가넨스(Corynebacterium michiganense pv. nebraskense)를 포함하며 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 균류는 마그나포르테 오리자(Magnaporthe oryzae), 마그나포르테 그리시아(Magnaporthe grisea), 글로멜라 그라미니콜라 폴리티스(Glomerella graminicola Politis), 글로멜라 루쿠마넨시스(Glomerella lucumanensis), 아스페르질러스 플라부스(Aspergillus flavus), 컬버라리아 클라바타(Curvularia clavata, C. maculans), 컬버라리아 이나카스(Curvularia inaequalis) 또는 컬버라리아 루나타(Curvularia lunata)를 포함하며 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 상기 균류는 마그나포르테 오리자(Magnaporthe oryzae) 또는 마그나포르테 그리시아(Magnaporthe grisea)이다.
- [0055] 상기 바이러스는 미국 밀조흔 모자이크 바이러스(AWSMV), 대맥줄무늬 모자이크 바이러스(BSMV), 맥류황화위축 바이러스(BYDV), 대맥황반 모자이크 바이러스(BYMV), 동부퇴록열록 바이러스(CCMV), 벼줄무늬 바이러스(RSV), 벼 검은줄오갈병 바이러스(RBSDV), 또는 옥수수모자이크 바이러스(MMV)을 포함하며 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0056] 상기 본 발명의 식물 질병 저항성 증진 조성물은 다양한 형태로 제형화 될 수 있으며, 예컨대 현탁제(suspension), 용제(solution), 유화액제(emulsion), 분제(dusting powder), 분산성입제(dispersible granule), 수화제(wettable powder), 유제(emulsifiable concentrate), 연무제(aerosol), 미립제

(microgranule) 또는 도포제(paste)로 제형화 될 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0057] 한편, 본 발명의 식물체의 면역 증진용 조성물은 추가적으로 계면활성제, 불활성 담체(inert carrier), 방부제, 습윤제, 캡슐화제, 바인더(binder), 유화제, 염색제, UV 보호제, 유도제(flow agent) 또는 비료를 포함할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 식물체의 저항성 증진 조성물로 형질전환된 식물세포 및 식물체를 제공한다.
- [0059] 본 발명자들은 신규한 형질전환 식물세포 및 식물체를 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 식물 질병(예컨대, 벼 도열병)에 저항성을 가지는 형질전환 식물세포 및 식물체를 구축하였다.
- [0060] 본 발명의 형질전환된 식물세포 및 식물체는 상술한 본 발명의 식물체의 저항성 증진 조성물을 이용한 것으로서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0061] 본 발명의 형질전환 식물세포 및 형질전환 식물체를 제조하기 위하여 당업계에 일반적으로 공지된 방법(*Methods of Enzymology*, Vol. 153, (1987))에 따라 실시될 수 있다. 외래성 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물을 형질전환시킬 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며(Chilton et al. *Cell* 11:263:271(1977)), 직접 외래성 폴리뉴클레오타이드를 식물 세포내로 도입시켜 식물을 형질전환시킬 수 있다(Lorz et al. *Mol. Genet.* 199:178-182;(1985)). 예를 들어, T-DNA 부위를 포함하지 않는 벡터를 이용하는 경우에는 전기천공법(electroporation), 입자충격법(microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake)을 이용할 수 있다. 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이 외래성 폴리뉴클레오타이드로 형질전환된 아그로박테리움 투메페이스이션스(*Agrobacterium tumefaciens*)로 식물 세포나 종자 등을 감염시키는 방법이다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).
- [0062] 아그로박테리움 투메페이스이션스에 의한 식물세포 또는 식물체의 형질전환은 당업계에 공지된 방법을 포함한다. 바람직하게는, 상기 형질전환 과정은 아그로박테리움 투메페이스이션스의 배양물에 자엽을 함침시켜 공동배양하는 과정을 포함한다. 이에 의해 아그로박테리움 투메페이스이션스는 식물내로 감염된다. 아그로박테리움 투메페이스이션스에 의해 형질전환된 식물세포 또는 식물체는 재분화 배지에서 재분화되며, 이는 신초의 재분화를 성공적으로 야기한다. 당업자는 상기 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물 세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다. 최종적으로, 발근 배지에서 재분화된 신초의 발근에 의해 형질전환 식물이 생산된다.
- [0063] 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제 (예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물 세포는 상기 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스포이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (npt II) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명의 조성물은 다양한 식물체에 적용되지만, 바람직하게는 벼에 적용된다. 본 발명에 있어서, 유전자 도입에 적합한 잎은 발아된 종자로부터 유래된 어떠한 조직도 포함한다.
- [0065] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 병원체(pathogen) 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다:
- [0066] (a) 본 발명의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계; 및
- [0067] (b) 상기 식물세포로부터 병원체 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.
- [0068] 상기 병원체(pathogen) 저항성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법은 식물체에서의 병원체(pathogen) 저항성 증진방법 또는 식물의 저항성 부여방법으로도 이해될 수 있으며, 본 발명에서는 이를 동일한 의미로 사용한다. 본 발명의 병원체(pathogen) 저항성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법은 상술한 본 발명의 저항성 증진용 조성물을 이용한 것으로서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

- [0069] 상기 병원체(pathogen) 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법에 대하여 각각의 단계 별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0070] 단계 (a): 식물세포의 형질전환
- [0071] 우선, 본 발명의 식물체 저항성 증진용 조성물을 식물 세포에 도입시킨다. 형질전환은 상술한 식물의 형질전환 방법을 이용할 수 있다.
- [0072] 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제(예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물세포는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (npt II) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜드로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).
- [0073] 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물체는 특별하게 제한되지 않는다. 예컨대, 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물로는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과 나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류가 있다.
- [0074] 본 발명의 방법에 있어서, 용어 “식물(체)”는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직, 묘목(seedlings), 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.
- [0075] 단계 (b): 형질전환 식물체의 수득
- [0076] 이어, 상기 식물세포로부터 병원체 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 수득한다.
- [0077] 본 발명에 따라 형질전환된 식물은 당업계에 공지된 방법에 의해 형질전환 여부가 확인될 수 있다. 예를 들어, 형질전환된 식물의 조직으로부터 얻은 DNA 시료를 이용하여, PCR을 실시하면 형질전환 식물의 지놈에 삽입된 외래 유전자가 규명될 수 있다. 택일적으로, 노던 또는 서던 블롯팅을 실시하여 형질전환 여부를 확인할 수 있다 (Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989).)
- [0078] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 식물체는 벼이고, 상기 병원체는 벼 도열병균이다. 본 발명의 실시예에서는 상기 벼 도열병균을 상기 본 발명의 형질전환 식물체에 접종하였을 때 병원균에 대해 저항성 또는 내성이 나타남을 알 수 있었다.
- [0079] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 벼 도열병균은 마그나포르테 속(*Magnaporthe*)이고, 보다 바람직하게는 마그나포르테 오리자(*Magnaporthe oryzae*), 마그나포르테 그리시아(*Magnaporthe grisea*), 마그나포르테 포아(*Magnaporthe poae*), 마그나포르테 리조필라(*Magnaporthe rhizophila*) 및 마그나포르테 살비니(*Magnaporthe salvinii*)를 포함하며, 보다 바람직하게는 상기 벼 도열병균은 마그나포르테 오리자(*Magnaporthe oryzae*) 또는 마그나포르테 그리시아(*Magnaporthe grisea*)이다.
- 발명의 효과**
- [0080] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0081] (a) 본 발명은 식물 질병에 대한 저항성 증진물질의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 특히 병원체(pathogen)에 대한 저항성을 증진시키는 신규한 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0082] (b) 본 발명의 방법에 의해 선별된 물질은 이펙터 단백질과 저항성 단백질의 결합을 차단함으로써, 식물체의 초

기 보호기작인 ROS의 생성을 유도한다.

[0083] (c) 특히, ROS 생성과 관련된 효소를 유도하는 저항성 단백질인 NADP-ME2과 M. 오리자의 이펙터 단백질인 AVR-Pii 간의 결합을 차단함으로써, 식물체로의 초기 균류의 침입을 효과적으로 방어한다.

[0084] (d) 한편, 본 발명의 병원체 저항성 증진 조성물은 식물 성장과 수확량에 전혀 영향을 주지 않으면서 병원균 침입 시 효과적으로 식물 면역 시스템을 조절할 수 있으며, 이로써 식물 질병 저항성 품종의 육종소재로서의 가능성을 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 Y2H 시스템에서의 AVR-Pii 및 OsNADP-ME2-3간의 상호작용을 나타낸다. a, X-gal 분석법을 이용한 양성 상호작용 (레인 1); b, 13 가지 다른 크기의 OsNADP-ME2-3 cDNAs의 동정 및 이들의 인식 빈도; c, AVR-Pii는 OsNADP-ME2-1 및 OsNADP-ME2-3 alternative splice form 과 특이적인 상호작용을 보여준다; d, OsNADP-ME2-3 및 AVR-Pia, 또는 AVR-Pizt 및 AVR-Pikm 간에는 상호작용이 나타나지 않았다.

도 2는 AVR-Pii 및 OsNADP-ME2-3을 인 비보 및 인 비트로에서 확인한 결과이다. a, AVR-Pii::mCherry::NLS는 NB에서 3448 hpi로서 BIC (화살표) 및 핵에 위치하였다. AVR-Pii::mCherry::NLS는 HY 및 ΔOsnadp-me2-3 돌연변이체에서는 관찰되지 않았다; b, BiFC는 벼의 피(sheath) 세포에서의 인 비보 상호작용을 입증하였다. 애기장대 CnX6 및 CnX7 단백질 간의 상호작용은 대조군으로서 사용하였다; c, 35Sp::GFP::OsNADP-ME2-3을 포함하는 NB, BIC에서 3448 hpi로서 AVR-Pii::mCherry 시그널을 나타내었다. 2개의 시그널은 BIC에서 오버래핑되었으며, HY 돌연변이체에서는 이러한 현상이 나타나지 않았다; d, 재조합 GST::AVR-Pii의 벼 His::OsNADP-ME2-3에 대한 결합 분석을 위한 인 비트로 GST 풀-다운 어세이 결과이다. AP, appressoria; BIC, biotrophic interfacial complex; IB, immunoblotting IH, invasive hyphae; NU, nucleus; VC, pDEST-VYCE; VN, pDEST-VYNE스케일 바, 10

도 3은 ΔOsnadp-me2-3 돌연변이체의 유전형 및 표현형 분석 결과를 나타낸다. a, 검은색 화살표는 각각 돌연변이체 확인 및 호모/헤테로 선별을 위한 프라이머 세트를 나타낸다. RB, right border; b, ΔOsnadp-me2-3 돌연변이체는 M. oryzae INA168에 대하여 HY보다 민감함 표현형을 나타내었다; c, NB, HY, 및 ΔOsnadp-me2-3 돌연변이체에서의 주요 3가지 표현형을 나타낸다. 콜론화된(colonized) 균사(colonizing hyphae, CH), 침윤성 균사의 차단(arrest of visible invasive hyphae, IH) (HR+IH), 및 어프레소리알 감염의 차단(sudden arrest of appressorial infection, HR+AP); d, NB, HY, 및 ΔOsnadp-me2-3 돌연변이체의 상술한 감염 표현형의 빈도를 나타낸다(표 2). 스케일 바, 10

도 4는 M. oryzae 감염동안의 과산화수소 발생량을 검출한 결과이다. a, NB는 HY에서 보다 적은 과산화수소 축적을 나타내었으며, ΔOsnadp-me2-3 돌연변이체에서는 과산화수소 축적이 거의 관찰되지 않았다(DAB 염색); b, 과산화수소 생성은 NB 및 HY와 비교하여 ΔOsnadp-me2-3 돌연변이체에서 현저히 감소되었다(Amples 레드 염색, Invitrogen); c, 디페닐렌이오도늄 클로라이드(Diphenyleneiodonium chloride, DPI; Sigma, D2926)-처리된 HY에서는 진균성 침윤이 증가되었으며, 반면 ΔOsnadp-me2-3 돌연변이체 및 NB에서는 48 hpi에서 DPI 처리에 의한 영향을 강하게 받지 않았다. 스케일 바, 10

도 5는 OsNADP-ME2-3의 효소 활성 분석. a, 20 nM에서 OsNADP-ME2-3 활성 분석; b, OsNADP-ME2-3 활성/min; c, 정제된 AVR-Pii의 첨가에 따른 OsNADP-ME2-3 활성 억제; d, AVR-Pii/min 첨가에 따른 OsNADP-ME2-3 활성 억제. OsNADP-ME2-3 활성 변화는 분광분석으로 측정하였다.

도 6은 M. oryzae-벼 상호작용에서 AVR-Pii 및 OsNADP-ME2-3의 작용 모델을 나타낸다. AVR-Pii의 OsNADP-ME2-3에 대한 특이적 결합 친화도는 OsNADP-ME2-3 활성을 억제하고, BIC에서의 NADPH 생산 활성을 억제한다. BIC-지향성(oriented) 강한 AVR-Pii::mCherry 시그널은 균사 성장에 따라 점차 감소하였다. AVR-유발된 ROS 억제에서, AVR-Pii 분비는 ΔOsnadp-me2-3의 감응성(susceptibility)을 증가시켰다. ROS-assisted 선천적 면역반응동안, AVR-Pii 기능은 알려지지 않은 숙주 인자에 의해 억제되어, OsNADP-ME2-3가 활성화된다. 활성화된 OsNADP-ME2-3는 말산을 피루브산으로 변화시켜 NADPH를 생성하고, 이어 M. oryzae에 대한 저항성을 증가시키는 아포플라스틱 ROS를 생성한다. EIHM, extra-invasive hyphal membrane.

도 7은 AVR-이펙터의 시그널 펩타이드 분석결과이다. AVR-이펙터인 AVR-Pii (a), AVR-Pikm (b), AVR-Pia (c), 및 AVR-Pizt (d)는 SignalIP 4.1 서버 프로그램을 이용하여 예측되었다

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). 각 AVR-이펙터의 시그널 펩타이드의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 우측 패널에 나타내었다.

도 8은 UTR을 포함하는 OsNADP-ME2의 서로 다른 alternative splice form의 모식도를 나타낸다. UTR (보라색 박스), 인트론(검은색 실선), 및 엑손(적갈색 박스). 스플라이스 폼은 벼 지놈 아노테이션 프로젝트에 기반하여 특성화되었다(http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/ORF_infopage.cgi).

도 9는 AVR-Pii 이펙터의 벼 세포질로의 분비를 나타낸다. AVR-Pii::mCherry는 BIC에서 mCherry 시그널로 검출되었으며, NB에서 세포질로 이동하였다(3448 hpi). 감염 이후, AVR-Pii는 인근 세포로 이동하였다. 그러나, 이의 발현은 HY 및 Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체에서는 관찰되지 않았다. 스케일 바, 10

도 10은 AVR-Pii 및 OsNADP-ME2-3의 인 비보 상호작용을 나타낸다. AVR-Pii::mCherry::NLS 융합 단백질(fusion protein)은 NB 벼 세포질에서 OsNADP-ME2-3와 함께 위치하였으며(3448 hpi), 반면 HY에서는 오버래핑 시그널이 관찰되지 않았다. 스케일 바, 10

도 11은 BiFC를 이용한 양과 표피 세포에서의 AVR-Pii 및 OsNADP-ME2-3의 인 비보 상호작용을 나타낸다. AVR-Pii 및 OsNADP-ME2-3 단백질은 양과 표피 세포에서 상호작용을 나타내었다. 애기장대 Cnx6 및 Cnx7 단백질은 양성 대조군으로 사용하였으며, empty C-terminal half Venus 및 N-terminal half Venus 벡터는 음성 대조군으로 사용하였다. Cnx6-VN, pEXP-VYNE(R)-Cnx6; Cnx7-VC, pEXP-VYCE(R)-Cnx7; VC, pDEST-VYCE; VN, pDEST-VYNE 스케일 바, 10

도 12는 RT-PCR 및 정량적 RT-PCR (qPCR)을 이용한, HY 및 Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체의 OsNADP-ME2-3 전사체 분석결과이다. 11개의 다른 Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체 및 야생형(HY)의 전사체 분석은 RT-PCR (a) 및 실시간-PCR (qPCR) (b)로 수행하였다. 액틴 및 유비퀴틴 프라이머는 내부 대조군으로 사용하였다.

도 13은 콜론화된 균사(hyphae)에 의한 단일 감염으로부터 벼 도열병의 진행을 나타낸다. 콜론화된 균사(Colonizing hyphae, CH)는 M. oryzae INA168 (48 hpi)에 의한 HY, NB 및 Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체 피 세포에서 검출되었다. CH는 96 hpi까지 양립불가능한 HY 피에 도달하기 전에는 1-3개 이상의 세포에는 도달하지 못했다. 그러나 M. oryzae INA168은 Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체 피(sheath)의 감염된 세포에서 인근 세포로의 균사 확장에 있어 중간 레벨을 나타내었다. 스케일 바, 10

도 14는 M. oryzae 접종 후, HY 피 세포의 표면 상에 있는 죽은 어프레소리알(appressorial) 및 균사 잔해(debris)를 나타낸다. 산화된-타입의 죽은 균사 및 어프레소리알의 잔해는 M. oryzae INA168 접종 후 부적합(incompatible) HY 피 세포의 표면 상에서만 관찰되었다(3448 hpi). AP, appressorium.

도 15는 M. oryzae 감염과정 동안 과산화수소 생성을 측정된 것이다. mock-처리된 NB, HY 및 Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체에서는 과산화수소 축적이 일어나지 않았다(Amples 레드 염색, 2224 hpi).

도 16은 AVR-Pii의 N-말단 GST 융합 단백질 및 OsNADP-ME 2-3의 N-말단 IF2 및 6×His의 융합 단백질의 클로닝, 발현 및 정제. 각각 pET25a 및 pGEX4T-1로 클로닝한 후의 OsNADP-ME2-3 (a) 및 AVR-Pii (c)의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 나타낸다. N-말단 IF2 및 6× His를 제공하는 pET25a와, pGEX4T-1 N-말단 GST 융합 단백질 이후에는 트롬빈 가수분해성 사이트(thrombin proteolytic site)가 존재한다. 이러한 단백질 컨스트럭트의 전체 질량(융합 태그 포함)은 OsNADP-ME 2-3은 약 85.4 kDa, AVR-Pii은 31.8 kDa으로 예상된다.

b, 6 x His::OsNADP-ME 2-3의 발현 및 정제. 0.2 mM IPTG, 15°C 하에서 5시간 동안 단백질을 유도한 후, 니켈 친화성 크로마토그래피(nickel affinity chromatography) 및 트롬빈 분해(thrombin digestion)로서 용해성 세포 용해물을 정제하였다. 화살표는 전체 길이의 단백질을 나타내고, 별표(*)는 절단형(truncated) 단백질을 나타낸다. 단백질을 8% SDS-PAGE에서 이동시킨 후, CBB 염색하였다. d, GST::AVR-Pii의 발현 및 정제. 0.2 mM IPTG, 18°C 하에서 16시간 동안 단백질을 유도한 후, 상층액을 GST 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 트롬빈 처리하였다. 단백질을 15% SDS-PAGE에서 이동시킨 후, CBB 염색하고, 항-His 항체(1:1000; ABM Inc., G020)를 이용한 이뮤노노블로팅으로 확인하였다. M, 단백질 크기 마커; P, pellet; S, supernatant; T, total protein.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 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.

[0086]

- [0087] 실시예
- [0088] 실험재료 및 실험방법
- [0089] 식물 재료 및 재배 조건
- [0090] 벼 품종은 화영배(Hwayeoungbye), 니폰바레(Nipponbarre, WT) 및 Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체를 사용하였다. Δ Osnadp-me2-3 돌연변이 식물체는 <http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE51>로부터 수득할 수 있다. 또한, 35Sp::GFP::OsNADP-ME2-3 형질전환 식물체는 아크로박테리움-매개 형질전환 방법을 이용하여 HY 및 NB 품종으로부터 생성하였다(52). 형질전환 식물체는 OsNADP-ME2-3-특이 프라이머 및 하이그로마이신 마커 프라이머(표 4)를 이용하여 PCR 증폭하여 확인하였고, 60% 습도 하 챔버에서 16시간 명조건, 8시간 암조건 및 온도 28℃에서 배양하였다. 모든 야생형 벼 종자는 국립식량과학원에서 제공받았다(<http://www.nics.go.kr>).
- [0091] 유형(Strains) 및 배양 조건
- [0092] 균류 중 INA168은 균 유전자원 센터로부터 제공받았다(Seoul National University, Seoul, Korea; <http://genebank.snu.ac.kr>). 모든 균종은 -20℃에 보관하였다. 균종은 일반적으로 벼 겨(bran) 아가 배지에서 배양하였다(겨 20 g, 당(sugar) 20 g 및 아가(agar) 20 g, MilliQ 워터 1000 ml). M. 오리자(M. oryzae) INA168은 포자(spore) 형성을 위해, 25℃에서 1012일 간의 지속적인 명조건 하에서 배양하였다. 하이그로마이신-저항성 mCherry 태깅된(tagged) AVR-Pii 형질전환체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-매개 원형질체(protoplast) 형질전환에 의해 생성되었다(53). 형질전환체는 하이그로마이신 선별가능한 고상 TB3 아가 배지에서 확인하였으며(수크로스 20, 이스트 추출물 0.3 g, 카사미노산 0.3 g, 글루코스 1 g 및 아가 0.8 g, 하이그로마이신 0.2 mg/ml; in 100 ml), OsNADP-ME2-3-특이적 프라이머 및 하이그로마이신 마커 프라이머(표 4)를 이용한 PCR로 재확인하였다. 효모 중 MAV203을 Y2H 스크리닝에 이용하였다. MAV203은 보통 효모 추출물 펩톤 텍스트로스 (YPD) 고상 아가 배지에서 30℃에서 3일 동안 배양하였다(효모 추출물 10 g, 박토 펩톤 20 g, 아가 파우더 20 g, 50% 글루코스 40 ml).
- [0093] 플라스미드 구축 및 분자적 클로닝
- [0094] OsNADP-ME2-3의 4가지 스플라이스 유형(alternative splice form)의 코딩 지역은 벼의 cDNA 라이브러리와 Gateway attB1 및 attB2 사이트를 포함하는 프라이머를 이용하여 증폭하였다(표 4). 상기 프라이머는 벼 지놈 아노테이션 프로젝트(Rice Genome Annotation Project, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>)에서 제공된 정보를 이용하여 디자인하였다. 같은 방법으로, AVR-Pii cDNA는 시그널 펩타이드를 포함 또는 미포함하는 프라이머를 사용하여 M. oryzae INA168 gDNA로부터 증폭되었다(표 4). 삽입 클론(entry clones)을 생성하기 위하여 BP 클로나제(BP clonase, Invitrogen)를 이용하여, OsNADP-ME2-3 및 AVR-Pii의 증폭된 코딩 지역은 pDONRTM201 entry 벡터 내로 클로닝되었다.
- [0095] 엔트리 클론은 Y2H 스크리닝에서 미끼 및 희생자를 만들기 위한 게이트웨이 시스템(AVR Pii::pDEST32; OsNADP-ME2-3::pDEST22)을 이용하여, 게이트웨이 용도 벡터(Gateway destination vector)인 pDEST32 및 pDEST22 내로 재조합하였다. BiFC의 C-말단 Venus (pDEST-VYCE; bait) 및 N-말단 Venus (pDEST-VYNE; prey) 및 N-말단 G3-GFP를 포함하고 있는 pGWB55254는 형질전환 식물체 구축을 위해 사용되었다(55,56).
- [0096] 단백질 발현을 위하여, AVR-Pii 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)을 BamHI 및 NotI 어댑터 사이트를 이용하여 pBlueScript II SK (pBSK)로 클로닝하였으며, N-말단 클루타치온 S-트랜스퍼라아제 (GST)-태깅된 pGEX4T-1 (단백질 발현 벡터)로 옮겨 클로닝하였다. 같은 방법으로, OsNADP-ME2-3 ORF를 NdeI 및 XhoI 어댑터 사이트를 가진 pBSK 내로 클로닝하고 N-말단 IF2 및 6 × His-태깅된 pET25a (단백질 발현 벡터)로 옮겨 클로닝하였다. 양 유전자의 최종 클론은 시퀀싱으로 확인하였다(Macrogen; 도 14의 a 및 c).
- [0097] The AVR-Pia 프로모터 (1.3 kb)는 KpnI 및 XbaI의 어댑터 효소 사이트를 가진 M. oryzae INA168 gDNA로부터 증폭되었으며 pBSK 내로 클로닝되었다. AVR-Pia 프로모터는 최종 벡터인 pCB1004로 클로닝 되어 AVR-Piap::pCB1004를 생성하였다. 이와 유사하게, mCherry 및 NLS와 융합된 mCherry를 AVR-Piap::pCB1004로 클로닝하여 XbaI 및 SacI 어댑터 사이트를 가진 AVR-Piap::mCherry::pCB1004 및 AVR-

Piap::mCherry::NLS::pCB1004를 생성하였다. 또한, 시그널 펩타이드를 가진 AVR-Pii의 0.2-kb ORF를 XbaI 절단 사이트를 이용하여 AVR-Piap::mCherry::pCB1004 및 AVR-Piap::mCherry::NLS::pCB1004 내로 클로닝하였다. AVR-Piap::AVR-Pii::mCherry::pCB1004 및 AVR-Piap::AVR-Pii::mCherry::NLS::pCB1004를 생성하였다. 모든 프라이머에 대한 정보는 표 4에 개시되어 있다.

[0098] 이스트 투-하이브리드 스크리닝(*Yeast two-hybrid screening*)

[0099] 시그널 펩타이드가 없는 *M. oryzae* AVR-이펙터와 벼 cDNA 라이브러리의 Y2H 스크리닝은 종래의 방법으로 수행하였다(55, 57). 바이트(AVR-이펙터) 및 프레이(cDNA 라이브러리)로 형질전환된 Mav203은 X-gal 어세이로 확인하였으며, 또한 트립토판, 류신 및 히스티딘이 없고 55 mM 3-AT (SC-LTH)가 첨가된 배지, 우라실 없는 배지(SC-U), 및 류신 및 트립토판이 없는 표준 선별 배지에서의 성장 패턴을 통하여 확인하였다. 이에 더하여 5-FOA (0.2%)를 함유하는 배지에서 성장하지 않았다(55,57). 강한 (pEXP32/Krev1+pEXP22/RaIGDS-wt), 약한 (pEXP32/Krev1+pEXP22/RaIGDS-m1), 및 결여된 (pEXP32/Krev1+pEXP22/RaIGDS-m2) 대조군들은 Invitrogen (ProQuest Two-Hybrid System)에서 구입하였다. 또한, 위양성(false positive)을 피하기 위하여, 재분석을 준비하였다(55, 57).

[0100] 생분자 형광 상보성(*Bimolecular fluorescence complementation, BiFc*)

[0101] 벼 잎 피(Rice leaf sheath), 양과 조직, DNA, 공동-형질전환(co-transformation) 및 biolistic 충격(bombardment)은 선행기술에 따라 준비하였다(57). 인 비보 상호작용 연구를 위하여, 바이트 단백질 (AVR-Pii::pDEST-VYCE) 및 프레이 단백질 (OsNADP-ME2-3::pDEST-VYNE) 20 을 biolistic bombardment (Bio-Rad, Biolistic /He Particle Delivery System)을 이용하여 양과 및 벼의 표피 세포에 쏘아 부었고(56, 57), 25°C, 암조건에서 1224시간 배양하였으며, 이후 공초점 레이저 현미경(Leica, TCS SP5)으로 세포 이미지를 관찰하였다(20× (양과 세포), 40× (벼 세포), Venus 필터(Ex/Em: 488 nm/505550 nm 파장). 또한, 음성 대조군으로서 각각 20 의 AVR-Pii::pDEST-VYCE 및 pDEST-VYNE; OsNADP-ME2-3::pDEST-VYNE 및 pDEST-VYCE; 및 pDEST-VYCE 및 pDEST-VYNE을 벼 및 양과 표피 세포에 처리하였으며, 상술한 방법과 동일한 조건 하에서 세포 이미지를 측정하였다.

[0102] 인 비트로 GST 폴-다운 어세이

[0103] N-말단 글루타치온 S-트랜스퍼라아제(GST) 태깅된 AVR-Pii 및 N-말단 IF2 및 6× His-태깅된 OsNADP-ME2-3을 *E. coli* Rosetta 중(strain)에서 발현시킨 후, 0.2 mM IPTG 조건 하에서 각각 18°C, 16 시간, 및 15°C, 5 시간 동안 단백질 발현을 유도하였다. GST::AVR-Pii는 글루타치온-세파로스 4B (Amersham Biosciences)를 이용하여 정제하였으며, 6× His-OsNADP-ME2-3는 니켈 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다(도 14의 b 및 d). GST 폴-다운 어세이는 종래 기술과 동일하게 수행하였다(57). 대략적으로, 정제된 GST::AVR-Pii 5 을 글루타치온-세파로스 4B (GST 비드) 상에 결합시킨 후, 6× His::OsNADP-ME2-3을 5 을 첨가하였다. 정제된 GST 5 의 음성 대조군도 유사한 과정으로 준비하였다. 4°C에서 4-12시간 동안 배양한 후, PBS를 이용하여 비결합성 단백질을 세척하여 제거하였다. 비결합성 단백질을 수거하여, 8% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(SDS-PAGE)을 수행하였으며, 코마시 블루 염색하여 관찰하였다. 또한, 결합성 OsNADP-ME2-3은 항-His tagged 항체(1:1000; ABM Inc., G020)를 이용하여 웨스턴 블로팅으로 검출하였다.

[0104] 정량적 실시간 PCR (*qPCR*)

[0105] ΔOsnadp-me2-3 돌연변이체에서 OsNADP-ME2-3의 전사 레벨을 측정하기 위하여, qPCR (Stratagene Mx3000P)을 실시하였다. 트라이졸을 사용하여 벼 조직에서 전체 RNA를 추출하여 분광기로 정량하였다. cDNA 합성 키트 (Invitrogen)를 이용하여 반응 혼합물 20 에서 첫 번째-가닥 cDNA를 합성하였다. 또한, 준비된 cDNA 1 를 주형으로 하여 역전사(RT)-PCR 및 qPCR을 수행하였다. qPCR은 Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green PCR Master Mix (Stratagene)를 이용하여 수행하였다. 액틴 및 유비퀴틴은 대조군으로 사용하였다. 프라이머 리스트는 표 4에 나타내었다.

[0106] 병원성 분석(Pathogenicity assay)

[0107] 스프레이 접종 방법을 사용하기 위하여, 배양 플레이트에서 0.025% 트윈 20 (Sigma-Aldrich, P2287)을 함유한 MilliQ 워터를 이용하여, *M. oryzae* INA168 포자를 10-12일 동안 수확하였다. 포자 농도는 4×10^5 포자/ml로 조정하였다. 수확한 포자 부유액을 2주 배양한(2-week-old) 벼 묘목(seedling)(HY, NB, 및 Δ Osnapd-me2-3 돌연변이체)에 분사하였다. 접종한 묘목은 암조건, 25-28°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 묘목을 정상 조건(16 시간/8 시간 암/명) 하로 옮겼다(58). 질병 표현형은 4 dpi에서 관찰하였다.

[0108] 인 비보 세포 이미징(In vivo live cell imaging)

[0109] 여러 가지 벼 HY, NB, 및 Δ Osnapd-me2-3 및 35S::GFP::OsNADP-ME2-3를 벼 챔버에서 3-4주간 배양하였다. 최소한의 변형을 위하여 피 접종 방법을 사용하였다(59). 각 벼 품종의 middle-aged 잎 피를 약 7 cm 길이로 절단하여, *M. oryzae* INA168 4×10^5 포자/ml 농도로 접종시켰다. 파이펫을 이용하여 포자를 벼 피의 빈 공간(상술한 midvein)으로 주입하였다. 접종한 피는 25°C 습윤 박스에서 24시간, 48시간, 및 96 시간 동안 배양하였다. 이후, 모든 초록색 짙을 제거하여 외피를 정돈하였고, 남아있는 middle thin 표피 층을 슬라이드에 고정시켜 현미경으로 분석하였다.

[0110] DAB 염색을 위하여, 접종하여 정돈한 피에 1 mg/ml DAB (Sigma-Aldrich, D8001) 용액을 상온에서 8시간동안 처리하였다. 이어, 에탄올:아세트산에서 1시간동안 탈염색하였다. 탈염색 이후, 피를 슬라이드에 고정시켜 현미경으로 관찰하였다. DPI 처리를 위하여, 0.2 및 0.4 DPI (Sigma, D2926)를 포함한 포자 부유액 및 DMSO를 벼의 표피에 접종시켰다(60). 세포 이미지는 34-48 hpi에서 캡처하였다. Amplex 레드 염색을 위하여, 포자 접종된 피를 50 mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 7.4) 하 0.25 unit/ml HRP (horseradish peroxidase; Sigma-Aldrich, P8250)가 포함된 2 Amplex 레드 용액(Invitrogen)에 배양하였다(22). 이미지는 22-24 hpi에서 수득하였다.

[0111] 인 비보 상호작용 이미징을 위하여, AVR 형질전환체 AVR-Pii::mCherry 및 AVR-Pii::mCherry::NLS를 지속적인 명조건 하에서 10일-12일 동안 배양하였다. 포자를 4×10^5 포자/ml 농도로 조정하여 HY, NB, 및 Δ Osnapd-me2-3 돌연변이체에 접종하였고, 35S::GFP::OsNADP-ME2-3는 HY 및 NB 품종에 접종하였다.

[0112] 모든 현미경 이미지는 RFP 필터(Ex/Em 553/592/574/650 nm)를 이용한 DAB 및 DPI 처리를 위하여 bright field 하 40 $\times$ oil 렌즈를 사용하여 촬영하였다. Amplex 레드 염색 및 mCherry (Ex/Em 587/610 nm), 공초점 현미경 (Leica, TCS SP5)을 이용하는 GFP (Ex/Em 488/507 nm) 필터.

[0113]

[0114] 원형질체 형질전환(Protoplast transformation)

[0115] 원형질체 형질전환은 변형을 최소화한 방법으로 수행하였다(53). 9-12 rpm шей커에서 액체 배양 하에서 키운 *M. oryzae* INA168 mycelia에 5 mg/ml 용해 효소(Sigma-Aldrich, L1412)를 3-4시간 동안 처리하였다. 각각 10 마이크로그램의 AVR-Pii::mCherry::NLS::pCB1004 및 AVR-Pii::mCherry::pCB1004를 수확한 원형질체(1×10^7 protoplast/ml)로 형질전환 시켰다. 양성 형질전환체는 하이그로마이신을 포함하는 TB3 아가 배지를 사용하여 검출하였으며, OsNADP-ME2-3 특이적 프라이머 및 하이그로마이신 마커 프라이머(표 4)를 이용한 PCR로 확인하였다.

[0116] NADP-ME 활성 분석

[0117] NADP-ME 활성은 340 nm에서 피루브산(TCI, P0579) 생성을 모니터링함으로써 분광학적으로 분석하였다. 반응 조건은 종래 기술을 참조하였다(61, 62). 반응은 트롬빈-처리된 순수 OsNADP-ME2-3를 첨가함으로써 개시되었다. 표준 혼합물은 67 mM TrisHCl (pH 7.4), 4 mM 말산 (TCI, M0022), 0.3 mM NADP⁺ (Sigma, N5755), 5 mM MnCl₂ (Duksan Pure Chemicals, 13446-34-9), 및 20 nM OsNADP-ME2-3 단백질을 함유한다. 한편, 반응을 20분 동안 관찰하였다. 효소 활성은 표준 방정식을 이용하여

<http://web.mnstate.edu/provost/MDHAssayProtocol.pdf>에 따라 계산하였다. 억제 분석은 20 nM, 40 nM, 및 80 nM의 트롬빈-처리된 순수 AVR-Pii를 표준 반응 혼합물에 첨가함으로써 수행하였다.

[0118] 실험결과 및 논의

[0119] 식물의 R-단백질과 이들의 유사한 병원균 AVR 이펙터의 상보적인 쌍(pairs)은 유전 분석에 따른 불친화성 (incompatibility)의 필수적인 조건이다. 그러나, AVR-이펙터 및 R-단백질이 어떻게 과민반응 (hypersensitive response, HR)을 유도하는지는 불분명하다. AVR-이펙터의 대부분은 수용체-리간드 모델(27)을 따르지 않으며, 이로T birth guard 가설(28) 및 decoy 가설(29)을 발전시켰다. 따라서, 본 발명자들은 상술한 3가지의 모델을 충족시키는 직접적 또는 간접적 상호작용을 통하여 벼 숙주 타겟을 동정하기 위하여, *M. oryzae* AVR-이펙터의 대규모 이스트 투-하이브리드(Y2H) 스크리닝을 수행하였다. AVR-Pia를 제외한(14,30,31) 상기 이펙터들은 BIC를 통하여 동일한 발현 패턴을 나타냄으로써 벼 세포내로 이동하기 때문에(도 7a 내지 도 7d), 시그널-펩타이드-제거된 *M. oryzae*의 4가지 AVR-이펙터(AVR-Pizt, AVR-Pii, AVR-Pikm, and AVR-Pia)를 Y2H에 이용하였다. 그럼에도 불구하고, AVR-Pia 및 Pia는 벼에서 급속한 세포 사멸을 유도하였으며, AVR-Pia가 분비되고 벼 세포에서 기능함을 확인하였다(18,32). consensus target 대신, 4가지 AVR-이펙터 모두 기능적인 관련성이 없는 서로 다른 타겟 단백질과 상호작용하였다(데이터 미공개). 그러나 *M. oryzae* 감염 후 대사체학(3) 및 전사체학(4) 분석에 따른 최근 연구결과에 기반하여, 본 발명자들은 4가지 AVR-Pii 상호작용 단백질 중에서 consensus AVR-이펙터 타겟 후보의 하나로서 벼 NADP-malic enzyme 2 (OsNADP-ME2)를 동정하였다(도 1a 및 표 1). Y2H 스크리닝에 기반한 AVR-Pii bait를 이용하여 13가지 다른 크기의 OsNADP-ME2 cDNAs를 스크리닝하였고(도 1b), 벼 세포에서 OsNADP-ME2 및 AVR-Pii간의 인 비보 상호작용을 관찰할 수 있었다. NADP-ME2는 2가 금속 이온의 존재 하에서 말산의 피루브산으로의 산화적 디카르복실레이션 동안 NADPH를 생성하였다(33). 벼에서, NADP-MEs를 코딩하는 4가지 유전자가 동정되었다. 상기 4개의 유전자 중에서 3개는 세포질 아이소폼(OsCytME1, OsCytME2, and OsCytME3) 이고, 1개는 색소체(plastidic) 아이소폼(OsChlME)이다(34). 본 발명에서는 세포질 아이소폼인 OsCytME2에 대하여 연구하였다. 본 발명자들은 OsNADP-ME2 유전자가 5가지의 alternatively spliced mRNAs를 생성함을 규명하였다(도 8). OsNADP-ME2-1 및 OsNADP-ME2-3은 단지 C-말단에 있어서만 차이가 있었다. 한편, AVR-Pii는 오직 OsNADP-ME2-1 및 OsNADP-ME2-3와 상호작용하였다(도 1c). 그러나, 클론과 상호작용하는 것으로 밝혀진 모든 것은 OsNADP-ME2-3에 속하며, 이는 단지 OsNADP-ME2-3만이 AVR-Pii-유발된 gene-for-gene 상호작용과 관련된 특징적인 기능을 가지는 것을 의미한다. OsNADP-ME2-3 및 AVR-Pii간의 상호작용-특이성은 다른 3개의 AVR-이펙터에 대한 각각의 상호작용을 스크리닝함으로써 재확인하였으며(도 1d), 이는 각각의 AVR-이펙터는 고유한 타겟 단백질과 특이적으로 상호작용함을 의미한다.

표 1

[0120] 벼 cDNA 라이브러리에서 Y2H 스크리닝에 기반한 프레이(pre)로서의 AVR-Pii 상호작용자 리스트

바이트 (Bait)	프레이 (Prey)					
	MSU locus	이름	빈도	AA 크기	단백질 위치	Genome annotation project
AVR-Pii	Os01g52500	OsNADP-ME	22	496	세포질	NADP-의존적 말릭 효소
	Os02g30230	OsExo70F2	6	689	세포질	단백질을 포함하는 exo70 exocyst 복합체 서브유닛 도메인
	Os04g31330	OsExo70F3	1	688	핵	단백질을 포함하는 exo70 exocyst 복합체 서브유닛 도메인
	Os04g31330	OsExo70F4	2	510	핵	단백질을 포함하는 exo70 exocyst 복합체 서브유닛 도메인

[0121] * Os01g52500: 말레이트 산화환원효소, 유사 말레이트 산화환원 효소 (NADP-dependent malic enzyme) GB:P34105 (*Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa*)

[0122] * Os02g30230: Pfam 도메인 PF03081: Exo70 exocyst 복합체 서브유닛을 포함하는 Exocyst 서브유닛 EX070 패밀 리 단백질

- [0123] * Os04g31330: Pfam 도메인 PF03081: Exo70 exocyst 복합체 서브유닛을 포함하는 Exocyst 서브유닛 EX070 패밀리 단백질
- [0124] * Os04g31330: Pfam 도메인 PF03081: Exo70 exocyst 복합체 서브유닛을 포함하는 68418.m06240 exocyst 서브유닛
- [0125] Gene-for-gene 상호작용의 전제 과정으로서, *M. oryzae* 감염과정 동안 mCherry-태깅된 ACR-Pii 단백질과 ACR-Pia 프로모터가 있는 벼 피에서, AVR-Pii의 BIC-매개 분비를 생세포(live cells) 이미징을 이용하여 확인하였다(도 2a 및 도 9). EIHM 주위에 위치한 이동(Translocated) AVR-Pii(도 2a 및 도 9)는 다른 타겟 세포 기관이 검출되지 않는 이유를 설명해 준다(2, 14, 31). 그러나, AVR-Pii는 부적합(incompatible) 상호작용에서 검출되지 않았다(도 2c 및 도 10). OsNADP-ME2-3 및 AVR-Pii간의 상호작용은 planta BIFC 및 인 비트로 GST 폴-다운 어세이를 이용하여 확인하였다(도 2b, 2d 및 도 11). 이와 유사하게, 적합한 상호작용이 있는 감염부위에서, GFP::OsNADP-ME2-3 시그널은 AVR-Pii::mCherry와 같은 위치에서 관찰되었다(co-localized)(도 2c 및 도 10). 이러한 결과는 Parker et al. (2009)(3)의 데이터와 일치하며, *M. oryzae* 접종에 따른 침투 부위에서 OsNADP-MEs의 활성이 나타난다. 감염 부위에서의 이러한 단백질-단백질 상호작용은 OsNADP-ME2-3 활성을 억제할 수 있으며, NADPH 생성을 현저히 감소시켰다. 실제, 접종 24시간된 품종에서 ROS 축적의 감소가 나타났으나(hpi), *M. oryzae* 접종에 대한 저항성 품종에서는 ROS 농도의 변화가 나타나지 않았다.(35). 이러한 현상은 *M. oryzae*가 BIC 형성 동안 OsNADP-ME2-3 활성을 억제하기 위하여 감염부위에서 AVR-Pii를 분비한다는 본 발명에서의 연구 결과를 설명해준다(도 2a, 2c, 도 9 및 도 10). 이러한 단백질-단백질 상호작용-유발된 OsNADP-ME2-3 억제는 NADPH 생성 및 ROS 생성을 감소시킬 수 있다. 이러한 메커니즘은 치명적인 병원균에 의해 ROS 생성의 2차반응(second wave)이 억제됨을 뒷받침해준다. 따라서, 2차 ROS 반응은 병원균의 차단 및 식물 저항성 반응에 있어 중요한 역할을 할 것이다(36).
- [0126] HY (Hwayongbye) 벼 품종에서 OsNADP-ME2 유전자를 결실시켰으나(Δ Osnap-me2-3), 야생형(WT)과 비교하여 성장 및 수확량에 있어서 어떠한 표현형에도 영향을 미치지 않았다(데이터 미공개). 이는 종전 애기장대 NADP-ME의 결실 돌연변이에서의 결과에서 예측할 수 있다(37). Δ Osnap-me2-3 돌연변이체에서, T-DNA는 OsNADP-ME2 지노믹 DNA의 5'-UTR에서 관찰할 수 있다(도 3a). T3 자손의 유전자형(genotype)은 프라이머(RB+RP) 및(S4+RP)로 분석하여 트랜스진 및 호모/헤테로 선별을 각각 확인하였다(도 3a). Δ Osnap-me2-3 돌연변이체에서 OsNADP-ME2-3 전사 억제는 또한 정량적 실시간 PCR (qPCR)을 통하여 재확인하였다(도 6a 및 6b). HY는 병원성 분석에서 *M. oryzae* race INA168에 대하여 부적합한(incompatible) 상호작용을 나타내었다(도 3b); 그러나, OsNADP-ME2 유전자의 결실은 Δ Osnap-me2-3 돌연변이체에서 감응성(susceptibility)을 증가시켰다(도 3b 및 3c). 대규모 미시적 관찰은 Δ Osnap-me2-3 돌연변이체의 벼 세포에서 저항성-소실 표현형을 보여주었다(도 3c, 3d 및 표 2). 이러한 결과는 HR-매개 벼 질병 저항성은 부분적으로 OsNADP-ME2-3 단일 효소의 녹아웃(knockout)에 의해 파괴될 수 있음을 보여준다. *M. oryzae* INA168 감염의 현미경 관찰은 48 hpi에서 생 세포 이미징을 이용하여 다양한 표현형을 3가지 주요 타입으로 분류하는데 사용된다(도 3c). 첫 번째 표현형은 콜론화된 활성 균사(colonizing hyphae)에 민감한 표현형이며, CH라 명명한다(도 3c). 흥미롭게도, 모든 CHs는 HY에서 1-3 개의 세포에서 관찰되었으며, 감염된 세포에서 떨어져 확장되었고, NB 및 Δ Osnap-me2-3 돌연변이체에서 다-세포 사멸 패턴을 나타내었다(도 13a 및 13b). 두 번째 표현형은 HR-유사 반응에 의한 죽은 침윤성 균사(dead invasive hyphae)이며, HR+IH로 명명한다(도 3c). 세 번째 표현형은 감염에 따라 갈변(browning) 및 죽은 부착기(appressorium) 구조를 나타내는 감염세포의 급작스러운 어레스트(arrest)를 나타내며, HR+AP라 명명한다(죽은 부착기에 대한 HR 반응; 도 3c). 예상한 바와 같이 적합 품종 NB는 CH 표현형을 우세하게 나타내었다(80.2%; 도 3d 및 표 2). 한편, 예상치 못하게 HR+AP (4%) 및 HR+IH (15.7%)와 같은 부적합(incompatible) 표현형이 적합 NB 품종에서도 약간 나타났다(도 3d 및 표 2). NB와 달리, 부적합 품종 HY에서는 HR+AP (30.6%) 및 HR+IH (46.6%)와 같은 HR-유사 표현형이 우세하게 나타났으며, CH 표현형도 소량 나타났다(22.7%; 도 3d 및 표 2). 이러한 결과들은 부적합 및 적합 상호작용에서 표준 표현형과 다른 약간의 예외가 있음을 의미한다. Δ Osnap-me2-3 (3-3) 및 Δ Osnap-me2-3 (1-2)는 각각 36.1% 및 41.6% CH 표현형을 나타내었으며, 이는 HY (22.7%)보다 높고 NB보다 낮다(도 3d 및 표 2). 또한, HR-유사 표현형은 Δ Osnap-me2-3 돌연변이체에서 감소되었으며, 이는 OsNADP-ME2 유전자 결실에 의해 모든 감응성(susceptibility)이 증가되었음을 의미한다. 최근, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 세포질 NADP-ME2의 결실은 반활물기생(hemibiotrophic) 균류 병원균 *C. 히긴시아눔(higginsianum)*에 대한 감응성을 증가시켰다(38). 이러한 데이터는 NADP-ME의 억제는 식물 질병을 현저히 증가시키므로 식물 NADP-ME가 식물 질병 저항성 메커니즘에서 중요

한 역할을 한다는 본 발명의 결과와 동일한 것이다. 그러나, 숙주 저항 메커니즘은 모두 ROS 생성에 기반하지 않으며, 식물 세포벽 두께증가(thickening), 피토알렉신(phytoalexin) 생성, 캘로스(callose) 퇴적과 같은 추가적인 저항 조절인자가 존재한다. 이는 Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체가 HY 및 NB 간의 중간 레벨의 민감성 반응을 나타내는 주요한 이유이다(도 3b, 3d 및 표 2).

표 2

[0127] NB, HY, 및 Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체 간에 3 가지 다른 감염 표현형의 빈도 비교

	CH	HR+AP	HR+IH
NB	80.2 $\pm$ 8.6	4.0 $\pm$ 3.5	15.7 $\pm$ 7.4
HY	22.7 $\pm$ 1.1	30.6 $\pm$ 1.3	46.6 $\pm$ 6.5
Δ Osnadp-me2-3 (3-3)	36.1 $\pm$ 2.3	26.5 $\pm$ 10.3	37.3 $\pm$ 11.8
Δ Osnadp-me2-3 (1-2)	41.6 $\pm$ 16.6	22.8 $\pm$ 5.8	35.5 $\pm$ 16.2

The data is represented in mean value $\pm$ S.D. CH, Colonizing hyphae; HR, Hypersensitive response; AP, Appressoria; IH, Invasive hyphae.

[0128] 식물 저항-관련 ROS 생성은 *M. oryzae* 감염 후 벼 OsRac1-매개 heteromeric G protein 복합체를 이용하여 연구되어왔다(39). heteromeric G 단백질-OsRac1-NADPH-옥시다아제의 상호작용은 동물 시스템에서와 같이(41) “defensome”을 형성하였다(39, 40). 최근, 벼 도열병 R-단백질 Pit는 NADPH-옥시다아제와 상호작용하는 것으로 나타났다(42). Pit와 유사하게, 파우더형 흰곰팡이(mildew) 저항성 단백질인 RPW8.2는 extrahaustorial membrane (EHM)와 상호작용을 나타내었으며, 과산화수소의 축적을 증가시켰다(43). 이러한 데이터는 defensome과 같은 구조를 형성하는 원형질막 근처의 OsCERK1-유래 ROS-생성 복합체와 함께 R-단백질과 유사 ACR-이펙터 간의 직접적 또는 간접적 상호작용을 나타낸다(40). 따라서, 본 발명의 결과는 감염부위에서의 병원균 AVR-이펙터 기능 및 ROS-지향성 식물 방어 반응을 연구하는데 사용될 수 있다. 또한, 이러한 결과는 EIHM에서 같은 아포플라스틱 ROS 생성 복합체에서의 방어 시스템의 이해와 집중을 증가시켜, 시간이 흐르면서 PAMP-유발된 숙주 인지, AVR-이펙터 이동(translocation), 및 ROS-매개 병원균 비활성을 일으킬 수 있다.

[0129] 본 발명자들은 또한 침윤된 HY 피는 *M. oryzae* race INA168 접종이후 세포 사멸되지 않음을 관찰할 수 있었다. 많은 감염된 세포는 생존가능한 표현형을 나타내었으며, 이는 균류 감염에 대항한 아포플라스틱 ROS 반응을 이용한 빠른 숙주의 반격 때문인 것으로 보인다. *M. oryzae*를 이용한 많은 침투에서 숙주 HR-매개된 세포 사멸의 유발 대신 산화된-타입의 죽은 균사 및 부착기 잔해가 나타났다(도 13a 및 13b). Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체에서는 HY에서 보다 낮은 정도로서 몇몇의 죽은 균류 잔해 및 ROS 축적이 관찰되었으며(도 3c, 3d 및 표 2), 이는 *M. oryzae*가 HY(정상적인 ROS 생성)보다 Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체에서 숙주세포로 더 성공적으로 침입할 수 있음을 의미한다. 세포 사멸의 NADPH 옥시다아제-유래 억제가 애기장대에서 관찰되었다(44). 세포사멸 표현형은 HY의 *M. oryzae* 접종 이후 34-48 hpi에서 관찰되었다. 이러한 결과는 빠른 ROS-assisted 저항 반응은 시간-소비적 HR 세포사멸 반응과는 다르며, 보다 파괴적인 메커니즘이라는 것을 나타낸다(43). 심각하게 손상된 세포 또는 추가적인 균류 IH를 막기 위한 추가적인 수단이 요구되는 세포만이, 전체 세포 사멸의 두 번째 라운드를 채택하여 단일 세포 내 손상을 포함할 수 있다(43). 이러한 숙주 세포사멸/HR을 이용하는 탈공역(uncoupling) ROS-유래 저항이 종래 보고되었다(45).

[0130] 만약 식물 미소(microscopic) EIHM 공간이 ROS로 가득한 경우, 이는 균류 병원균의 침투 균사가 겪는 첫 번째 위험이 될 것이다. 이러한 결과는 정교한 식물 마이크로-ROS 생성 구조가 숙주 침입과정 동안 균류 병원균에 의해 타겟팅된 숙주 메커니즘에 있어 첫 번째로 중요한 이유를 설명해 준다. 또한, 최근 연구에서는 다른 세포 타입에서의 감염, 무생물적 환경, 발단상의 신호(cues) 및 세포예정사(programmed cell death)에 대한 반응을 매개하는 시그널로서의 ROS의 광범위한 역할을 보여주었다(22, 23). 따라서, 인지 단계에 있어서 ROS 생성의 기능 부전(malfunction)은 숙주 저항 반응의 초기 활성화 및 식물 선천성 면역계의 단계적인 유도에 치명적인 손상을 가져온다.

[0131] 본 발명의 데이터는 균류 및 박테리아 병원균에 대한 저항성 양성 조절자인 종래의 OsRac1-매개된 ROS 생성 및 세포 사멸 메커니즘 연구와 일치된다(46). 벼 OsRac1는 직접적으로 NADPH-옥시다아제의 N-말단과 상호작용함으로써 ROS 생성을 조절하고, 원형질 막에서 RACK1A, RAR1, SGT1, HSP90, 및 HSP7047와 면역 복합체를 형성한

다(47). 토바코 NADP-ME와 HSP7048의 상호작용은 OsNADP-ME2가 최근 defensome으로 밝혀진(40) Nakashima 면역 복합체와 상호작용함을 나타낸다(47). 세포질 NADPH는 PM-결합된 NADPH-옥시다아제 효소의 주요 기질로서, defensome 복합체 중 하나이고, 식물은 ROS를 세포 외 공간으로 펌핑할 수 있다. 최근 연구는 EIHMx에서 다량의 ROS가 *M. oryzae* 감염을 무력화시키고(3), 이는 PM-결합된 NADPH-옥시다아제 효소를 통한 NADPH의 소모로써 슈퍼옥사이드 음이온을 생성하는 동물의 파고솜(phagosome)과 매우 유사하다(41). ROS는 PM-결합된 NADPH-옥시다아제 효소에서 NADP-ME2-3-assisted NADPH로서 계속적으로 생성될 수 있다(3). 화합물 3,3'-디아미노벤지딘 (DAB) 염색에서, Δ Osnadp-me2-3에서 NADPH 공급 차단은 *M. oryzae* 접종 후 (48-96) hpi에서의 과산화수소 축적을 검출가능한 레벨로 감소시켰다(도 4a). NADPH 고갈은 감염-유발된 ROS의 축적에 영향을 주어 인근 세포뿐만 아니라 침투된 세포에서도 높은 농도로 관찰되었다(3). 과산화수소의 과축적은 부적합 *M. oryzae* race INA168의 접종 이후 단지 HY에서만 ROS 생성과 함께 관찰되었고, Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체에서는 낮게 관찰되었다(도 4b 및 도 15). HR-매개된 벼 도열병 저항에 있어 ROS의 중요한 역할은, HY에 *M. oryzae* race INA168를 접종한 후 ROS 억제제인 디페닐렌 이오도니움(DPI)에 노출시킴으로써 재확인하였다(도 4c). Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체의 콜로니화(colonization)와 유사하게, *M. oryzae* INA168의 부착기(appressoria)는 DPI-매개된 ROS 억제 후 HY 피 조직을 감염시킬 수 있다(도 4c). 그러나 NB 및 Δ Osnadp-me2-3 돌연변이체는 ROS 억제에 의해 큰 영향을 받지 않았다(도 4c).

표 3

[0132]

AVR-Pii에 의한 OsNADP-ME2-3의 인 비트로 억제

A. 효소 활성 분석 (계속)													
	BAE	0 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	6 min					
OsNADP-ME 2-3 (purified)	-0.3381	7.3007	17.1429	4.1949	3.3268	2.5295	1.4901	1.2522					
GST	-0.4496	-0.6011	-0.0751	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000					
Buffer	-0.1127	-0.1127	-0.0376	-0.0376	0.0376	-0.0376	0.0376	-0.0751					
A. 효소 활성 분석													
	7 min	8 min	9 min	10 min	11 min	12 min	13 min	14 min	15 min				
OsNADP-ME 2-3 (purified)	0.7513	0.4132	0.3131	0.2379	0.0250	-0.1128	-0.0751	-0.1503	-0.2129				
GST	-0.0751	0.0376	0.0376	0.0000	-0.0376	0.0376	0.0000	-0.0376	0.0751				
Buffer	0.0376	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.0751	0.0376	-0.0751	0.0751				
B. 억제 분석 (계속)													
	BAE	0 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	6 min					
OsNADP-ME 2-3 (purified)	0.0000	16.2288	7.6636	3.6064	2.5921	1.8783	1.3524	1.0519					
OsNADP-ME 2-3 + AvrPii (20 nM)	-0.1315	8.9221	3.2307	1.5215	1.1270	0.7889	0.6011	0.3381					
OsNADP-ME 2-3 + AvrPii (40 nM)	0.0094	6.8935	1.4275	0.8453	0.3381	0.3005	0.1221	0.1033					
OsNADP-ME 2-3 + AvrPii (80 nM)	-0.0483	2.6833	1.2719	0.6923	0.3166	0.1878	0.1181	0.0537					
Buffer	-0.3381	-0.3005	0.0000	0.0000	0.0376	0.0376	-0.0376	0.0000					
B. 억제 분석													
	7 min	8 min	9 min	10 min	11 min	12 min	13 min	14 min	15 min	16 min	17 min	18 min	19 min
OsNADP-ME 2-3 (purified)	0.6762	0.4884	0.1878	0.1878	0.1878	0.0000	-0.0376	-0.0751	-0.1127	-0.2254	-0.2254	-0.2630	-0.3005
OsNADP-ME 2-3 + AvrPii (20 nM)	0.3193	0.2254	0.1503	0.0751	0.0564	0.0376	0.0188	0.0000	-0.0188	-0.0376	0.0000	-0.0564	-0.0939
OsNADP-ME 2-3 + AvrPii (40 nM)	0.0376	0.0376	0.0094	0.0000	-0.0094	-0.0094	0.0000	-0.0376	-0.0188	-0.0282	-0.0188	-0.0188	-0.0376
OsNADP-ME 2-3 + AvrPii (80 nM)	0.0483	0.0215	0.0054	0.0161	-0.0054	-0.0054	-0.0054	-0.0054	-0.0161	-0.0107	-0.0161	-0.0054	-0.0161
Buffer	0.0376	0.0000	-0.0376	-0.0376	0.0376	-0.0376	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0376	0.0000	0.0000

[0133]

* BAE, Before Addition of Enzyme

[0134]

Chi et al. (2009)(49)에 따르면, 인 비트로 과산화수소는 낮은 농도에서 *M. oryzae* 성장을 저해시키고, 이는 EIHmx에서의 과산화 수소 농도가 억제 레벨에 도달할 경우 *M. oryzae* IH 성장이 현저히 억제될 수 있음을 의미한다. 그러나, 만약 *M. oryzae*가 AVR-Pii의 상당량을 이동시켜 직접적으로 OsNADP-ME2-3의 활성을 억제함으로써 ROS 생성 및 과산화수소 생성을 억제한다.(도 5c, 5d 및 표 3). 이러한 가설은 인 비트로에서의 AVR-Pii의 첨가 후 직접적인 OsNADP-ME2-3 효소 활성 분석 뿐만 아니라(도 5c, 5d 및 표 3), 인 비보 BiFC, AVR-Pii 및 OsNADP-ME2-3간의 인 비트로 풀-다운 어세이, 및 BIC에서 이들의 co-localization에 의해 뒷받침된다(도 2b, 2d 및 표 4). 본 발명자들은 OsNADP-ME2-3가 강한 효소 활성을 가지고, AVR-Pii가 억제제로서 기능한다는 증거를 제시하여 주는 AVR-Pii에 의한 OsNADP-ME2-3 활성 억제를 확인하였다(도 5a-5d 및 표 3). 이러한 독성 ROS 생성의 AVR-Pii-매개 억제 억제는 *M. oryzae*가 EIHmx에서 생존가능하게 한다. 이러한 신규한 AVR-이펙터-유발된 ROS 억제 (ATRI) 메커니즘은 벼 도열병 균류인 *M. oryzae*가 감염과정 동안 수많은 숙주 단백질 중 특이적인 타겟을 공격한다는 것을 의미한다. Mackey et al. (2003)(50)는 대부분의 병원균 독성 인자는 숙주 기관의 중요부분을 타겟팅한다고 가정하였다. 그러나 예상과 달리, 벼- 및 *M. oryzae*-유래 벼 도열병 균류는 중요한 벼의 세포 장치를 차단함으로써 숙주의 공격을 중화시키는 단순하고 효과적인 방법을 발전시켜 왔다. 벼의 ROS burst-assisted 보호기작이 모든 식물 병원균에 적용될 수 없음에도 불구하고, 종래 연구에서는 ROS 축적이 부적합 상호작용에 있어 HR-매개된 저항이 중요한 역할을 함을 제시하였다(45). 다른 독성 인자를 포함하는 많은 AVR-이펙터는 숙주의 아포플라스틱 ROS-생성 메커니즘을 돕는다. 이는 식물 세포 내로의 AVR-이펙터 이동을 억제하거나 벼 세포질에서 이들의 기능을 억제시키기 위한 몇몇의 R-단백질이 상호 연결되어 있음을 의미한다(43).

표 4

[0135]

프라이머		서열	설명
(OsNADP-ME2-1) Os01g52500.1	Forward	AA AAA GCA GGC TGG TGG AGA GCA	Y2H 스크리닝
	Reverse	AGA AAG CTG GGT TTA CAA TAC AGG	
(OsNADP-ME2-2) Os01g52500.2	Forward	AA AAA GCA GGC TGG ATG CGC GCC	
	Reverse	AGA AAG CTG GGT TCA CCG GTA GTT	
(OsNADP-ME2-3) Os01g52500.3	Forward	AA AAA GCA GGC TGG ATG GAG AGC	
	Reverse	AGA AAG CTG GGT TCA CCG GTA GTT	
(OsNADP-ME2-4) Os01g52500.4	Forward	AA AAA GCA GGC TGG ATG CAT AAC	
	Reverse	AGA AAG CTG GGT TCA CCG GTA GTT	
AVR-Pii w/o SP	Forward	AA AAA GCA GGC TGG CTT CCC ACT CCG	BiFC 클로닝
	Reverse	AGA AAG CTG GGT TTA GTT GCA TTT	
pDONR	Forward	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT	mCherry 구축
	Reverse	GGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG T	
AVR-Pii w SP (pEX33)	Forward	TCT AGA ATG CAA CTT TCC AAA ATT	GST 풀다운
	Reverse	TCT AGA GTT GCA TTT ATG ATT AAA	
AVR-Pia Promoter (pEX22p)	Forward	GGT ACC TTT CGT GAC GGC ACG TCG	단백질 발현 및 서열 확인
	Reverse	TCT AGA ATT TTC GTG TAT GGG GCT	
AVR-Pii w/o SP	Forward	GGT TCC GCG T <u>GGATCC</u> CTT CCC ACT CCG GCC AGC	RT-PCR
	Reverse	AGT CAC GAT <u>GCG GCC GCT</u> TAG TTG CAT TTA TGA TTA	
(OsNADP-ME2-3) Os01g52500.3	Forward	CGC GCG GCA GCC ATA TG G AGA GCA CCA TGA AG	벼 결실 돌연변이체 지도타이핑
	Reverse	GGT GGT GGT <u>GCT CGA GTC</u> ACC GGT AGT TGC GGT A	
	IntP	GGGCTTGGAGATCTTGGC	
(OsNADP-ME2-3) Os01g52500.3	Forward	TAC AGC CCA CTT TAC CGC A ACT	
	Reverse	CGA ACA TAG AAA CAG TAC CGA GAA	
Actin gene	Forward	TCC ATC TTG GCA TCT CTC AG	
	Reverse	GTA CCC GCA TCA GCC ATC TG	
Ubiquitin gene	Forward	GTG GTG GCC AGT AAG TCC TC	
	Reverse	GGA CAC AAT GAT TAG GGA TCA	
(OsNADP-ME2-3) Os01g52500.3	S4	GTA AGT TGG CAA TGC CAA ATT TTG G	
	RP	GGC AAG CCC CTT GTT GTA GCG	
	RB	TTG GGG TTT CTA CAG GAC GTA AC	

GFP-N-Ternimal	Forward	TGG CGA TGG CCC TGT CCT TTT ACC	형질전환 식물체 확인
Hygromycin	Forward	GGT AAA TAG CTG CGC CGA TGG TTT CTA C	
	Reverse	TAC TCT ATT CCT TTG CCC TCG GAC GAG T	

[0136] * SP, signal Peptide; w/o, without; w, with

[0137] 본 발명의 모델에서, *M. oryzae* INA168는 감염과정 동안 NADPH 생성을 억제함으로써 ROS 시스템을 파괴하기 위하여 BIC를 통하여 AVR-Pii를 분비한다(도 6). 그러나, AVR-Pii 이동 또는 이의 효소활성 방해는 부적합 상호작용 동안 ROS-assisted 선천성 면역을 유도할 수 있다(도 6). 본 발명의 모델에서, 숙주 R-단백질 또는 R-단백질 복합체는 AVR-Pii의 예상 억제제 중의 하나이다. 이는 병원균의 공격적 무기(AVR-effectors) 및 식물의 적정 방어 무기(ROS 시스템)이 감염과정 동안 상호연결되어 있으며, 이들의 상호작용은 병우너성 감염을 가능케 한다. 이는 식물의 저항과정 동안, heteromeric G 단백질과 같은 AVR-이펙터 및 숙주의 세포 외 ROS 생성 시스템의 핵심적인 링크를 제공한다. 이러한 벼-*M. oryzae* 상호작용의 ATRI 메커니즘은 균류 AVR-이펙터의 역할에 대한 이해를 도울 것이며, 식물-미생물 상호작용 동안 R-단백질의 기능을 예측하게 한다. 또한 본 발명은 질병 저항성 육종에 있어서 AVR-이펙터 타겟팅-지향성 전략을 이용하는 식물 보호를 위한 새로운 접근 방법을 제시한다.

[0138] **어세션넘버(Accession number)**

[0139] 벼 지놈 프로젝트 웹사이트 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 또는 EMBL/GenBank 데이터 라이브러리 기반: Os-NADP-ME2-1, LOC_Os01g52500.1; Os-NADP-ME2-2, LOC_Os01g52500.2; Os-NADP-ME2-3, LOC_Os01g52500.3; Os-NADP-ME2-4, LOC_Os01g52500.4; Os-Exo70F2, LOC_Os02g30230; Os-Exo70F3, LOC_Os04g31330; Os-Exo70F4, LOC_Os08g41820; AVR-Pii, AB498874; Hygromycin, AEJ60084.1; Actin, LOC_Os03g50885; Ubiquitin, LOC_Os06g46770.

[0140] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0141] **참고문헌**

- [0142] 1. Dean, P. Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol Rev.* 35, 1100-1125 (2011).
- [0143] 2. Khang, C.H. et al. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell to cell movement. *Plant Cell.* 22, 1388-1403 (2010).
- [0144] 3. Parker D. et al. Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Journal.* 59, 723-737 (2009).
- [0145] 4. Wei, T. et al. Transcriptional profiling of rice early response to *Magnaporthe oryzae* identified OsWRKys as important regulators in rice blast resistance. *Plos One.* 8, e59720 (2013).
- [0146] 5. Kleemann, J. et al. Sequential delivery of host induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PloS Pathog.* 8, e1002643 (2012).
- [0147] 6. Doehlemann, G. et al. Pepl, a secreted effector protein of *Ustilago maydis* is required for successful invasion of plant cells. *PloS Pathog.* 5, e1000290 (2009).
- [0148] 7. Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M. & Doehlemann, G. The *Ustilago maydis* effector pepl suppresses plant immunity by inhibition of hostperoxidase activity. *PloS Pathog.* 8,

e1002684 (2012).

- [0149] 8. Djamei, A. et al. Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature*. 478, 395-398 (2011).
- [0150] 9. Plett, J.M. et al. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr Biol*. 21, 1197-1203 (2011).
- [0151] 10. Mentlak, T.A. et al. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell*. 24, 322-335 (2012).
- [0152] 11. Mueller, A.N., Ziemann, S., Treitschke, S., Abmann, D. & Doeblemann, G. Compatibility in the *Ustilago maydis*-Maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLOS Pathogens*. 9, e1003177 (2013).
- [0153] 12. Shabab, M. et al. Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. *Plant Cell*. 20, 1169-1183 (2008).
- [0154] 13. Yi, M. & Valent, B. Communication between filamentous pathogens and plants at the biotrophic interface. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 587-611 (2013).
- [0155] 14. Park, C.H. et al. The *Magnaporthe oryzae* effector Avr Piz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen associated molecular pattern triggered immunity in rice. *Plant Cell*. 24, 4748-4762 (2012).
- [0156] 15. Valent, B. & Khang, C.H. Recent advances in rice blast effector research. *Curr Opin Plant Biol*. 13, 434-441 (2010).
- [0157] 16. Giraldo, M.C. et al. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nature commun.* 4, 1996 (2013).
- [0158] 17. Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. & Valent, B. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19, 4004-4014 (2000).
- [0159] 18. Yoshida, K. et al. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell*. 21, 1573-1591 (2009).
- [0160] 19. Miki, S. et al. Molecular cloning and characterization of the AVR-Pia locus from a Japanese field isolate of *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Pathol.* 10, 361-374 (2009).
- [0161] 20. Torres, M.A. & Dangl, J.L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol*. 8, 397-403 (2005).
- [0162] 21. Pogany, M. et al. Dual Roles of Reactive Oxygen Species and NADPH Oxidase RBOHD in an Arabidopsis-*Alternaria* Pathosystem. *Plant Physiol.* 151, 1459-1475 (2009).
- [0163] 22. Miller, G. et al. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal.* 2, ra45 (2009).
- [0164] 23. Suzuki N., Koussevitzky, S., Mittler, R., & Miller, G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 35, 259-270 (2011).
- [0165] 24. Able, A. J. Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma*. 221, 137-143 (2003).
- [0166] 25. Grant, J.J. & Loake, G.J. Role of reaction oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124, 21-29 (2000).
- [0167] 26. Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E., Harrison, K. & Jones, J.D.G. Rapid, cf-9 and Avr9-dependent production of active oxygen species in tobacco suspension culture. *Mol Plant Microbe Interact.* 11, 1155-1166 (1998).
- [0168] 27. Gabriel, D. W. & Rolfe, B. G. Working models of specific recognition in plant-microbe

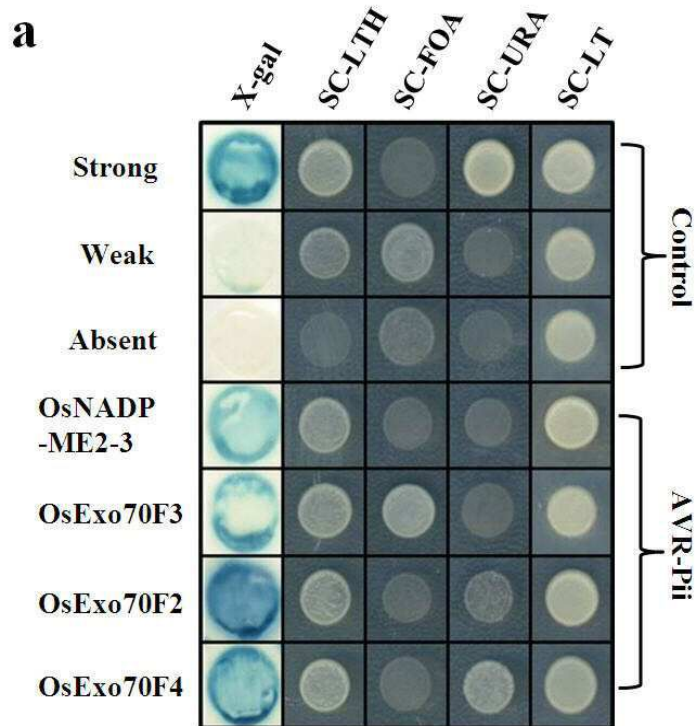
interactions. *Annu Rev Phytopathol.* 28, 365-391 (1990).

- [0169] 28. McHale, L., Tan, X., Koehl, P., & Michelmore, R. W. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol.* 7, 212 (2006).
- [0170] 29. van der Hoorn, R. A. & Kamoun S. From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell.* 20, 2009-2017 (2008).
- [0171] 30. Li, W. et al. The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPiz-t* encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene *Piz-t*. *Mol Plant Microbe Interact.* 22, 411-420 (2009).
- [0172] 31. Sharma, S. et al. Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells. *Plant J.* 74, 701-712 (2013).
- [0173] 32. Liu, W. et al. Recent Progress in Understanding PAMP- and Effector-Triggered Immunity against the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant.* 6, 605-620 (2013).
- [0174] 33. Edwards, G. E. & Andreo, C. S. NADP-malic enzyme from plants. *Phytochemistry.* 3, 1845-1857 (1992).
- [0175] 34. Chi, W., Yang, J., Wu, N. & Zhang, F. Four rice genes encoding NADP malic enzyme exhibit distinct expression profiles. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68, 1865-1874 (2004).
- [0176] 35. Parker, D. et al. Rice blast infection of *Brachypodium distachyon* as a model system to study dynamic host/pathogen interactions. *Nature Protocols.* 3, 435 - 445 (2008).
- [0177] 36. Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. & Lamb, C. H2O2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* 79, 583-593 (1994).
- [0178] 37. Wheeler, M. C. G. et al. A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 39-51 (2005).
- [0179] 38. Voll, L.M. et al. Loss of cytosolic NADP-malic enzyme 2 in *Arabidopsis thaliana* is associated with enhanced susceptibility to *Colletotrichum higginsianum*. *New Phytol.* 195, 189-202 (2012).
- [0180] 39. Torres, M.A., Morales, J., Sanchez-Rodriguez, C., Molina, A., Dangl, J.L. Functional interplay between *Arabidopsis* NADPH oxidases and heterotrimeric G protein. *Mol Plant Microbe Interact.* 26, 686-694 (2013).
- [0181] 40. Akamatsu, A. et al. An OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 module is an essential early component of chitin-induced rice immunity. *Cell Host & Microbe.* 13, 465-476 (2013).
- [0182] 41. Lambeth, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 4, 181-189 (2004).
- [0183] 42. Kawano, Y. et al. Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate immunity. *Cell Host Microbe.* 7, 362-375 (2010).
- [0184] 43. Wang, W., Wen, Y., Berkey, R. & Xiao, S. Specific targeting of the *Arabidopsis* resistance Protein RPWB8.2 to the interfacial membrane encasing the fungal haustorium renders broad-spectrum resistance to powdery mildew. *Plant Cell.* 21, 2898-2913 (2009).
- [0185] 44. Torres, M.A., Jones, J.D. & Dangl, J.L. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet.* 37, 1130-1134 (2005).
- [0186] 45. Marino, D., Dunand, C., Puppo, A. & Pauly, N. A burst of plant NADPH oxidase. *Trends Plant Sci.* 17, 9-15 (2012).
- [0187] 46. Ono, E. et al. Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 759764 (2001).
- [0188] 47. Nakashima, A. et al. RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell.* 20, 2265-2279 (2008).

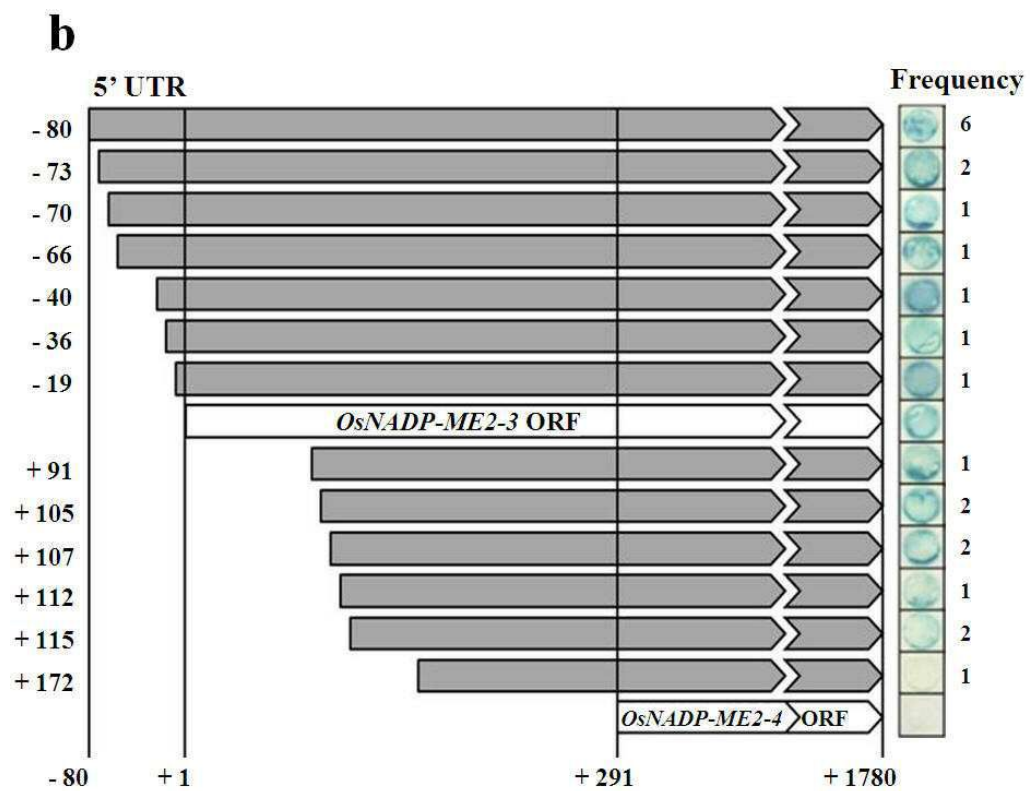
- [0189] 48. Lara, M.V., Drincovich, M. F., Muller, G.L., Maurino, V.G. & Andreo, C.S. NADP-malic enzyme and Hsp70: co-purification of both proteins and modification of NADP-malic enzyme properties by association with Hsp70. *Plant Cell Physiol.* 46, 997-1006 (2005).
- [0190] 49. Chi, MH., Park, SY., Kim, S. & Lee, YH. A novel pathogenicity gene is required in the rice blast fungus to suppress the basal defenses of the host. *PLOS Pathog.* 5, e1000401 (2009).
- [0191] 50. Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R. & Dangl, J.L. Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell.* 112, 379-389 (2003).
- [0192] 51. Jeon, J.S. et al. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J.* 22, 561-570 (2000).
- [0193] 52. Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. & Kumashiro, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6, 271-282 (1994).
- [0194] 53. Jeon, J. et al. A putative MAP kinase kinase kinase, MCK1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact.* 21, 525-534 (2008).
- [0195] 54. Nakagawa T, et al. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng.* 104, 34-41 (2007).
- [0196] 55. Singh, R., Dangol, S. & Jwa, N.S. Yeast two hybrid system for dissecting the rice MAPK interactome. *Methods Mol Biol.* 1171, 195-216 (2014).
- [0197] 56. Singh, R. et al. Protein interactome analysis of 12 mitogen activated kinase kinase kinase in rice using a yeast two hybrid system. *Proteomics.* 14, 105-115 (2014).
- [0198] 57. Singh, R. et al. Rice mitogen activated protein kinase interactome analysis using the yeast two hybrid system. *Plant Physiol.* 160, 477-487 (2012).
- [0199] 58. Kim, J.A. et al. Rice OsACDR1 (*Oryza sativa* accelerated cell death and resistance 1) is a potential positive regulator of fungal disease resistance. *Mol Cells.* 28, 431-439 (2009).
- [0200] 59. Kankanala, P., Czymmek, K. & Valent, B. Role for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell.* 19, 706-724 (2007).
- [0201] 60. Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R. & Dangl, J.L. Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell.* 112, 379-389 (2003).
- [0202] 61. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/malic_enzyme.pdf.
- [0203] 62. <http://web.mnstate.edu/provost/MDHAssayProtocol.pdf>.

도면

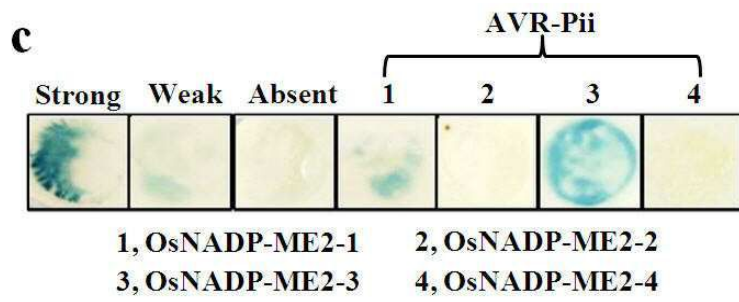
도면1a



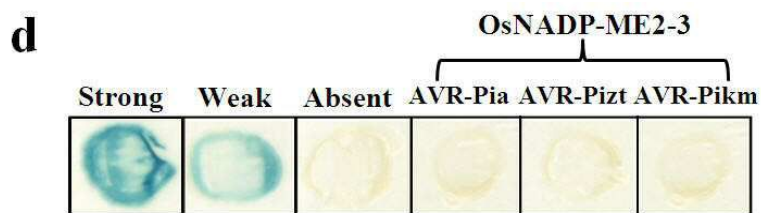
도면1b



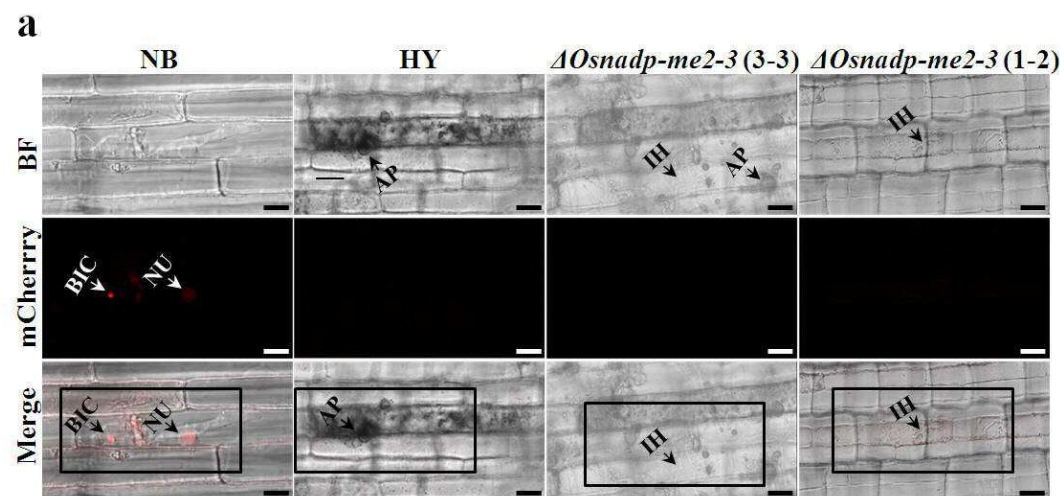
도면1c



도면1d

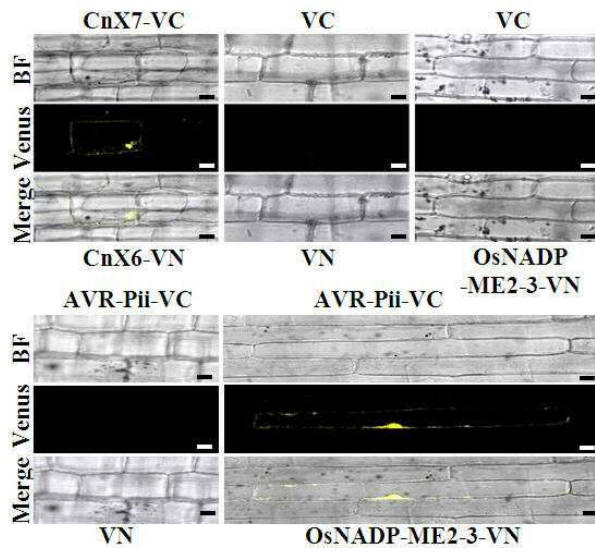


도면2a



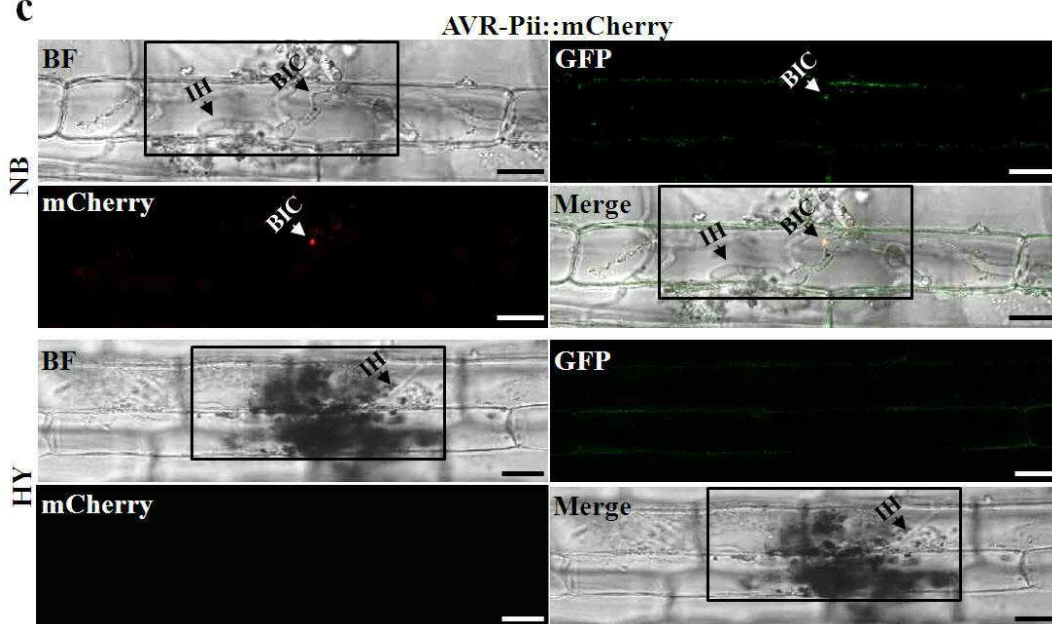
도면2b

b



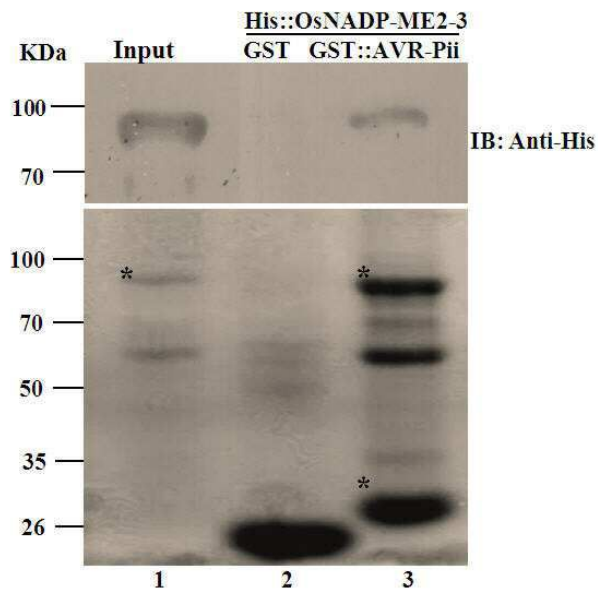
도면2c

c



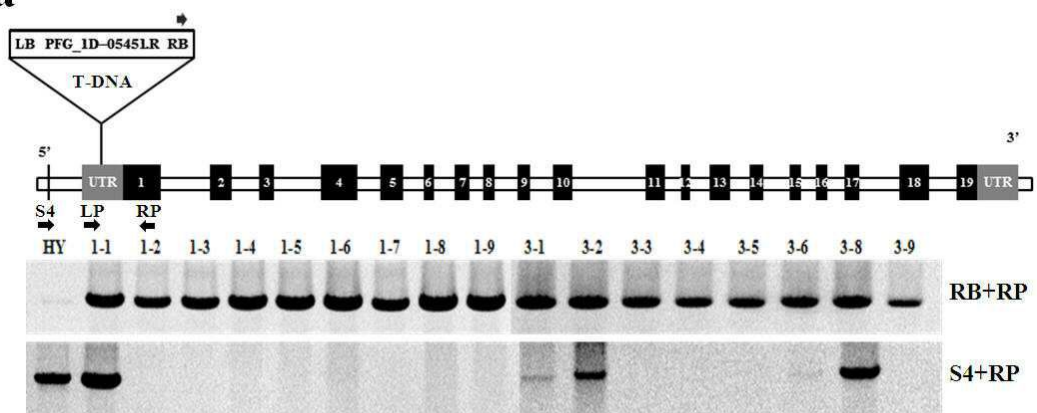
도면2d

d

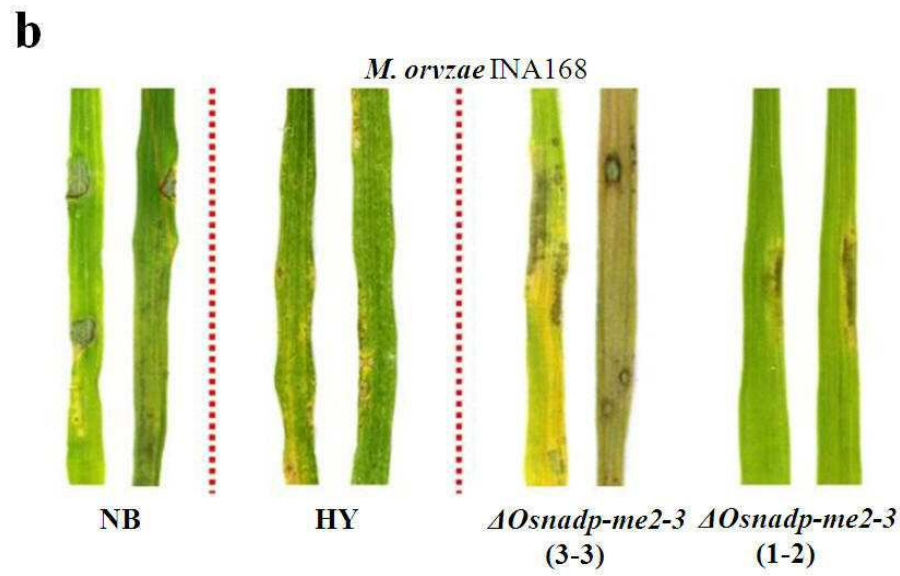


도면3a

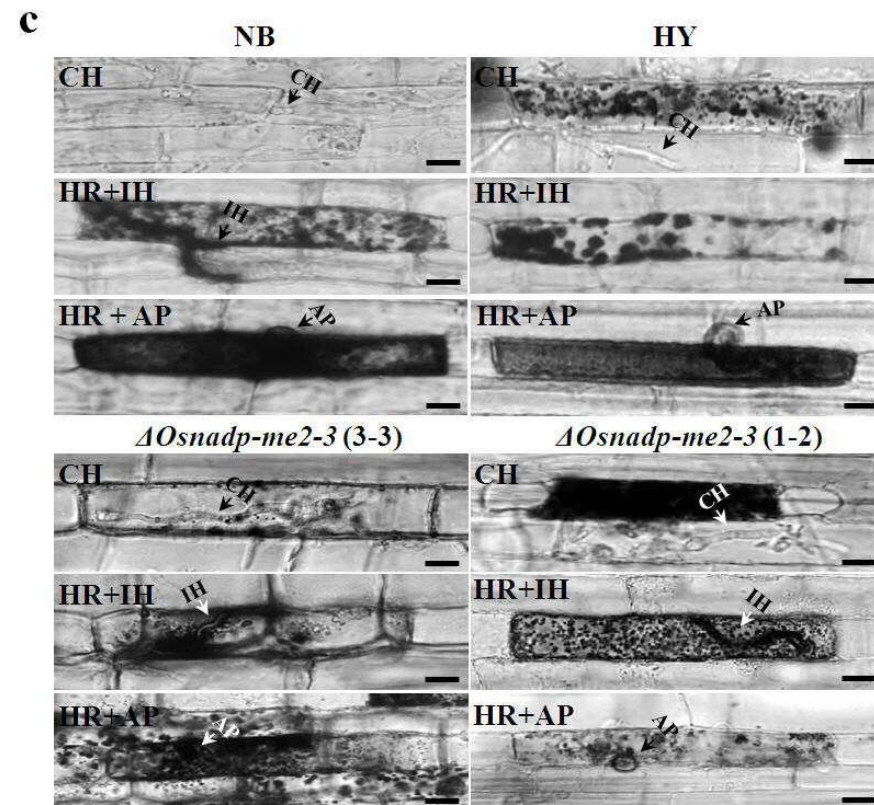
a



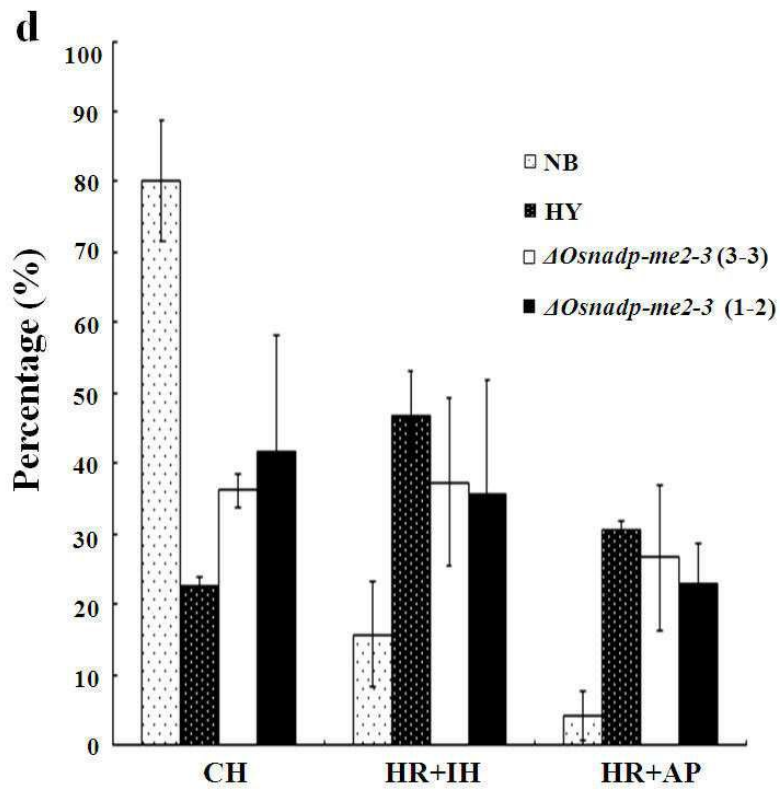
도면3b



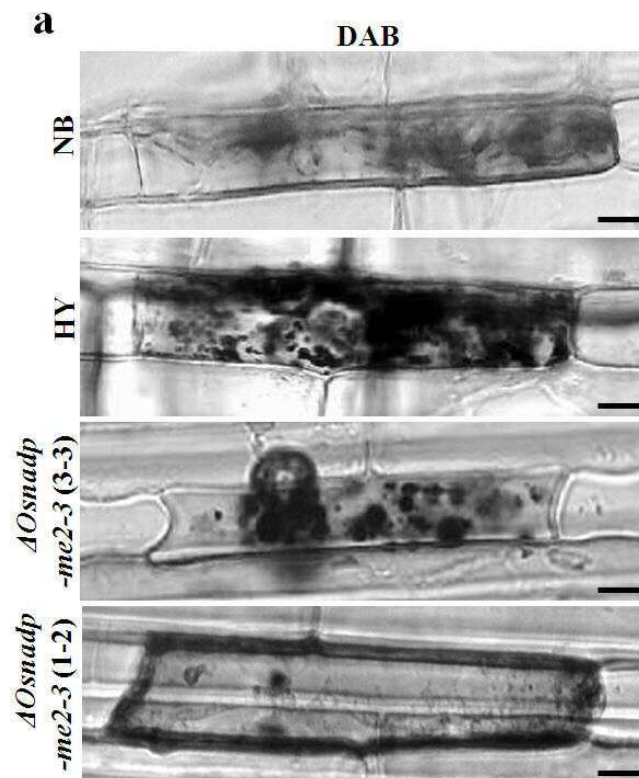
도면3c



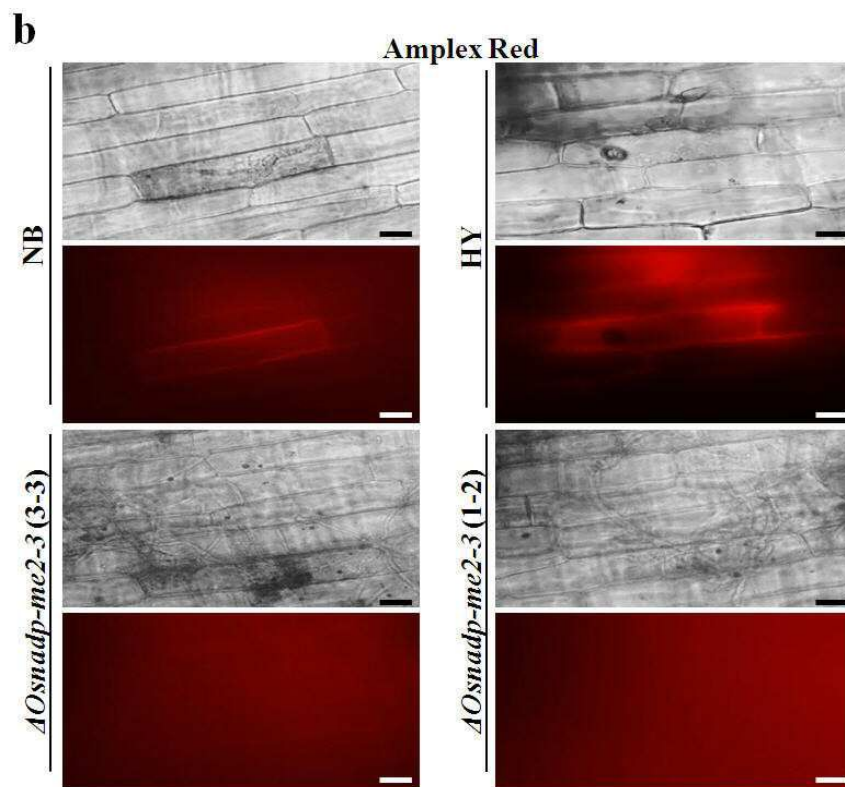
도면3d



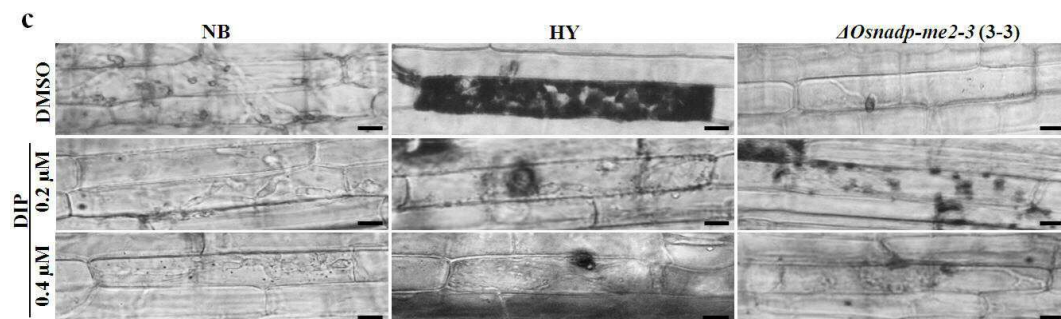
도면4a



도면4b

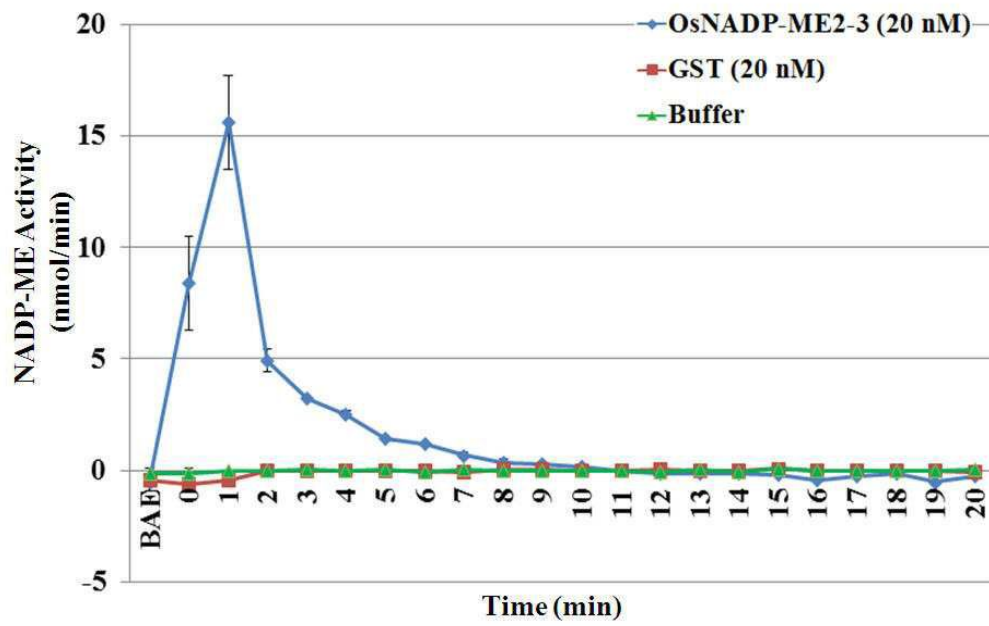


도면4c



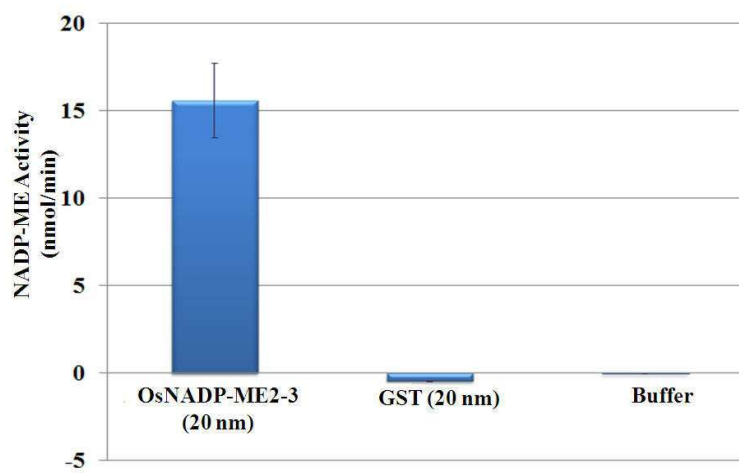
도면5a

a



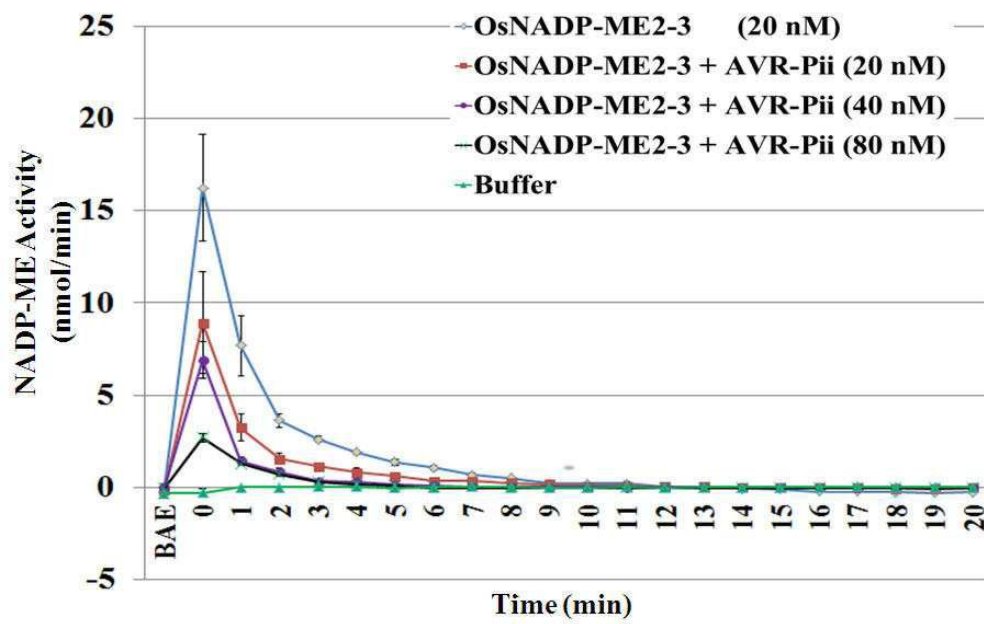
도면5b

b



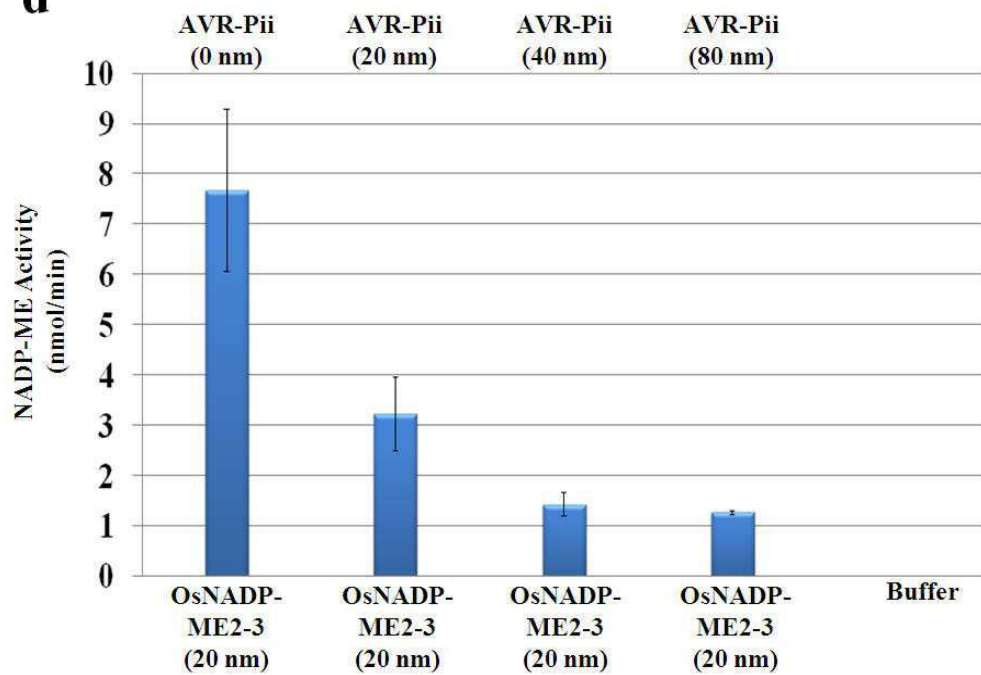
도면5c

c

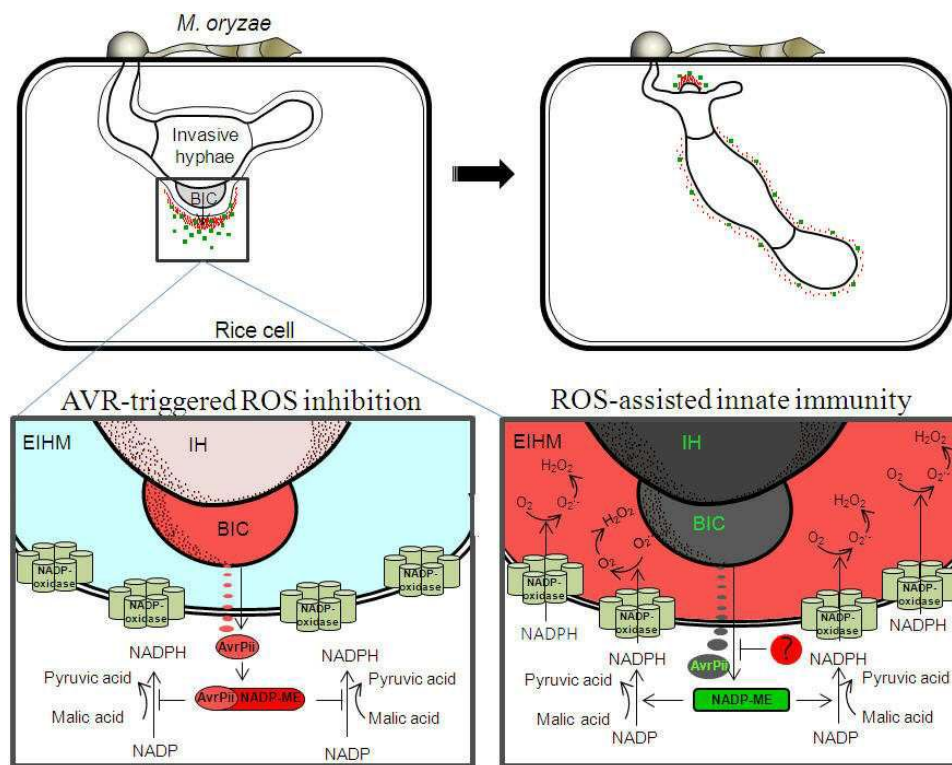


도면5d

d

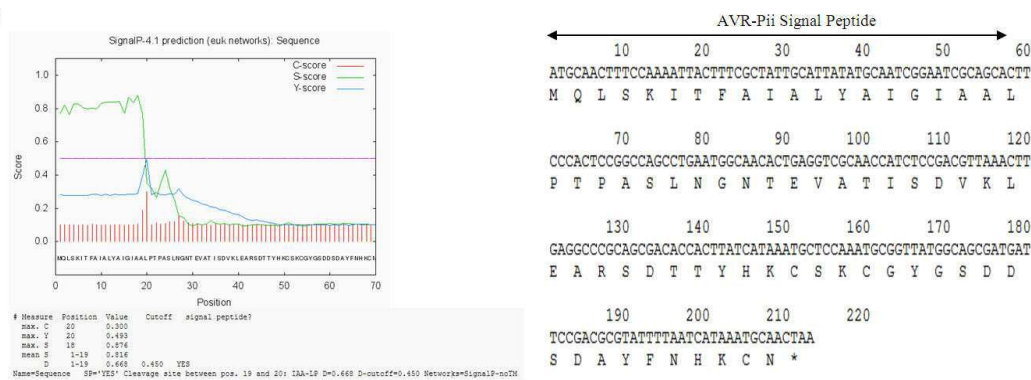


도면6

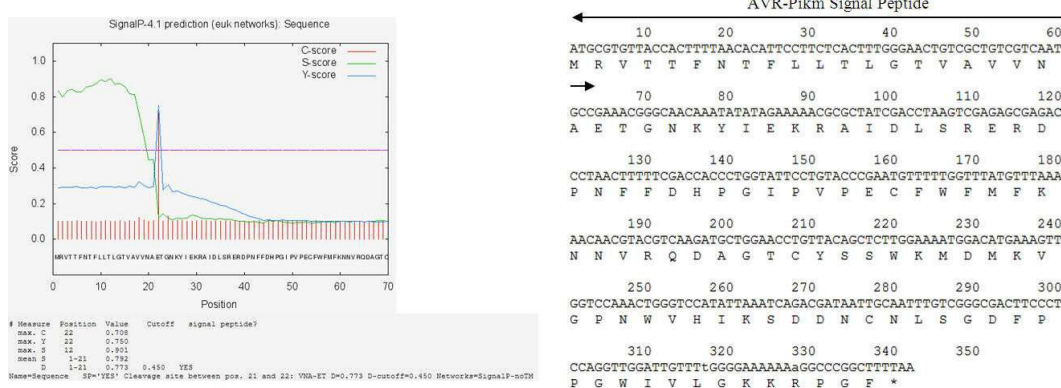


도면7a

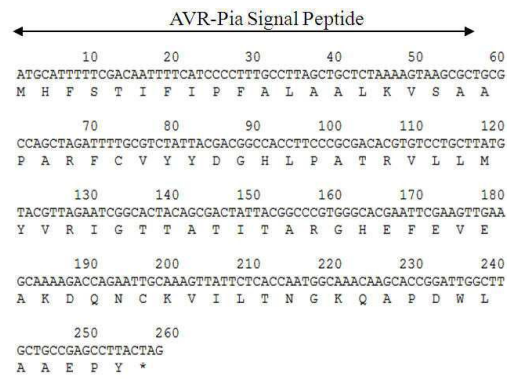
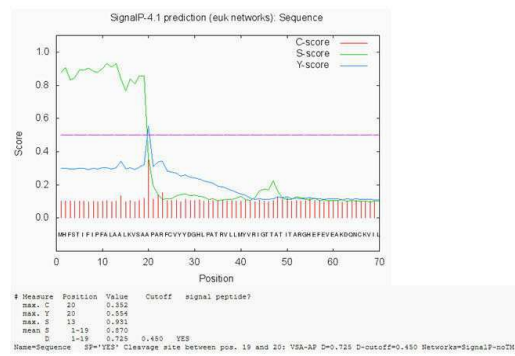
a



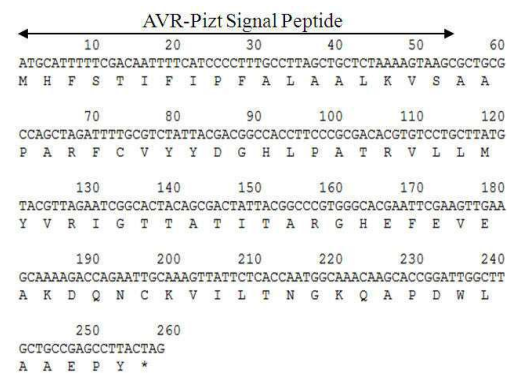
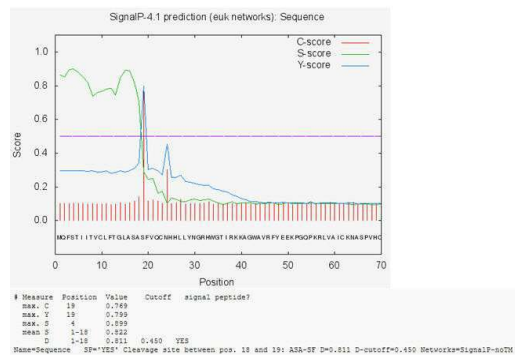
도면7b



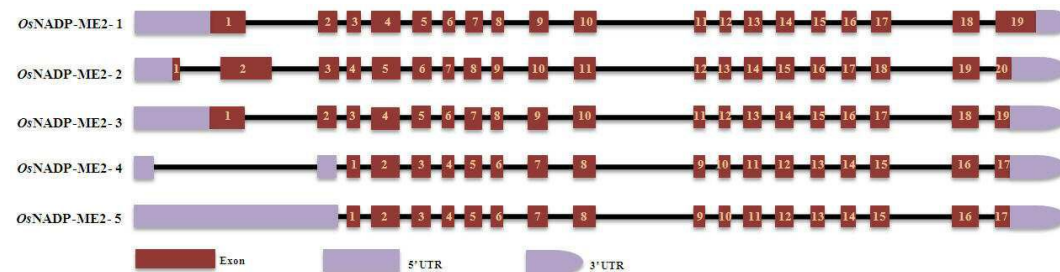
도면7c



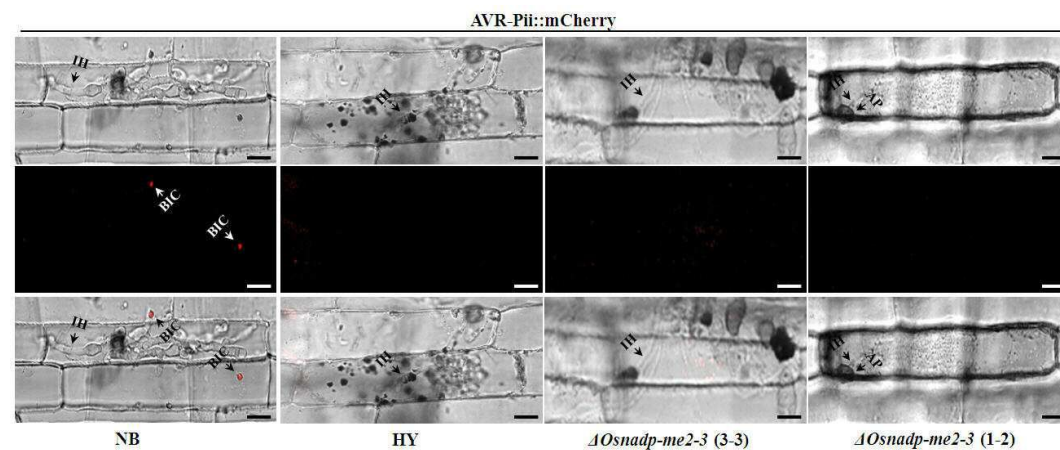
도면7d



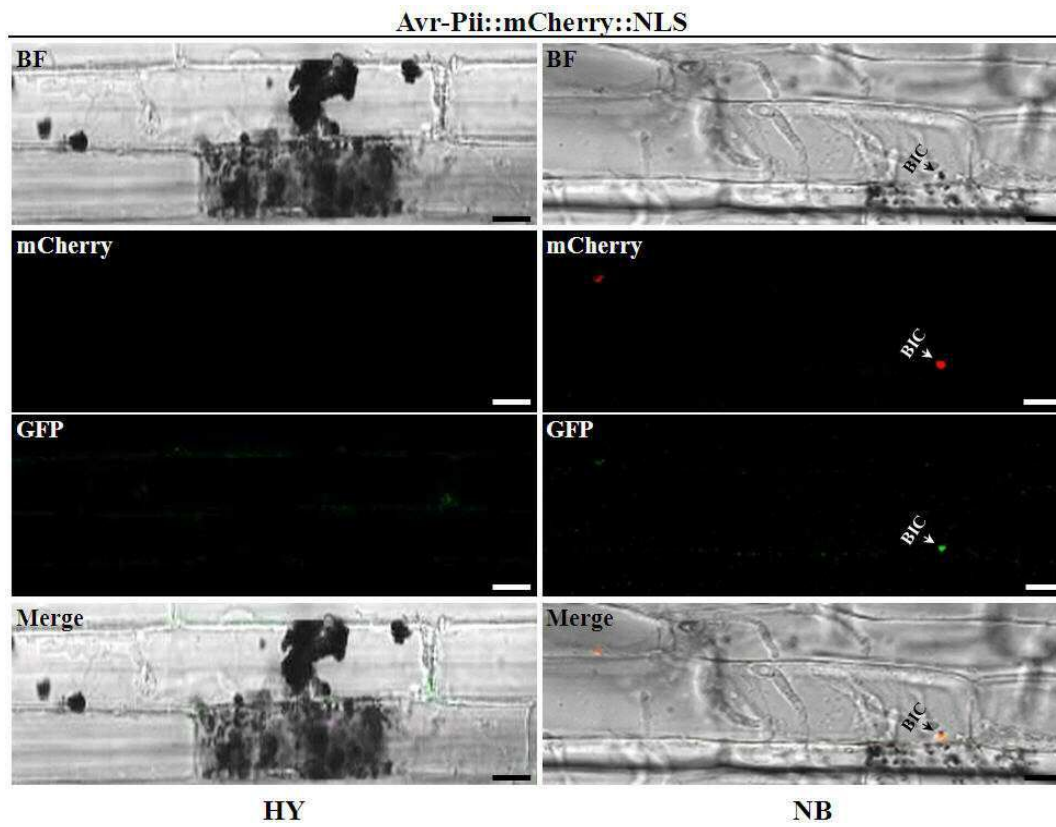
도면8



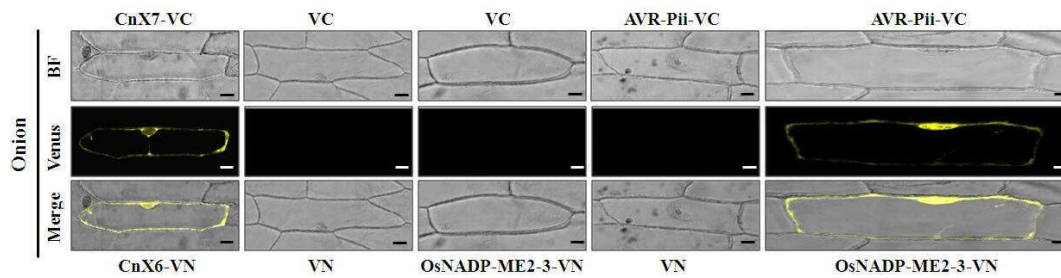
도면9



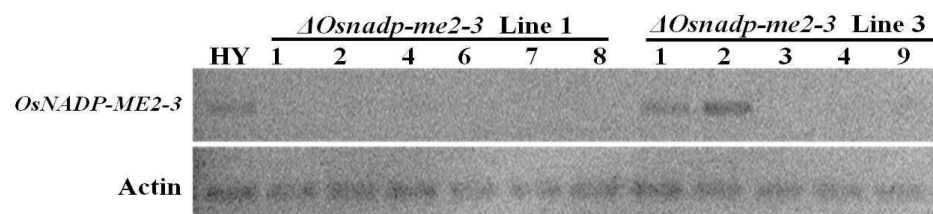
도면10



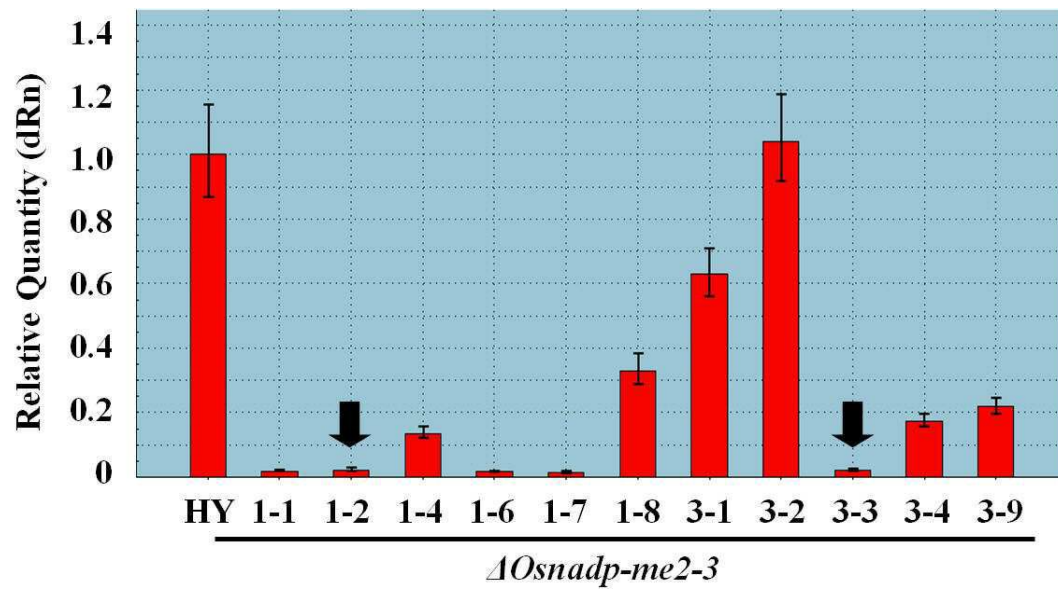
도면11



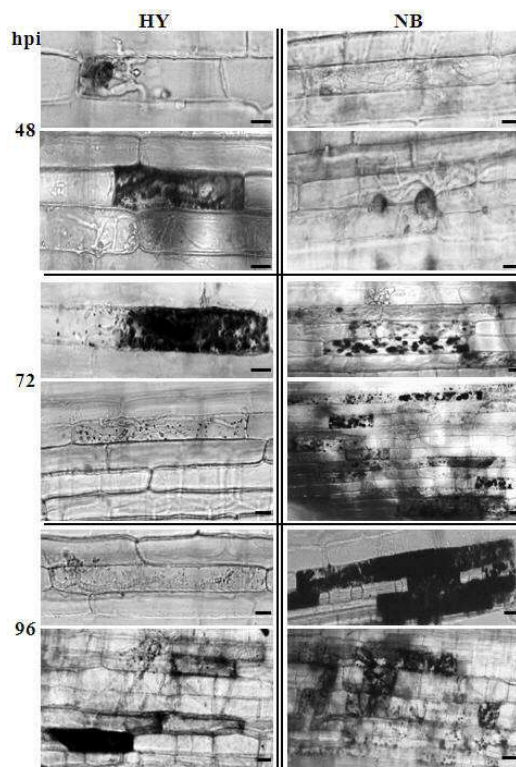
도면12a



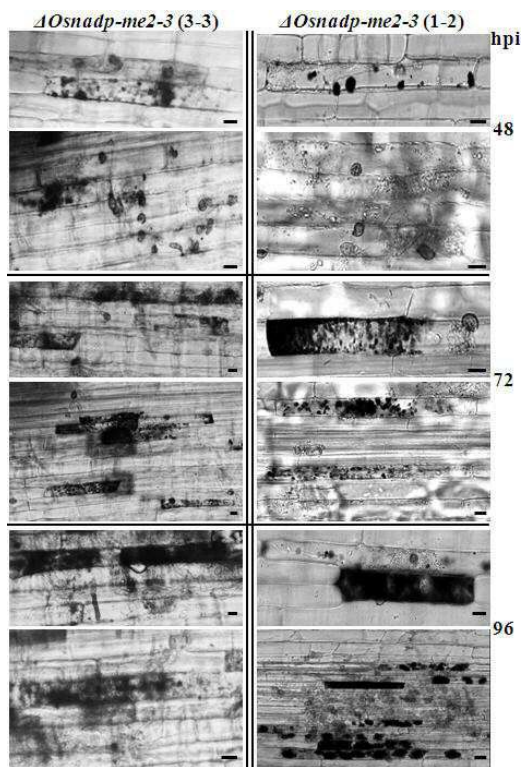
도면12b



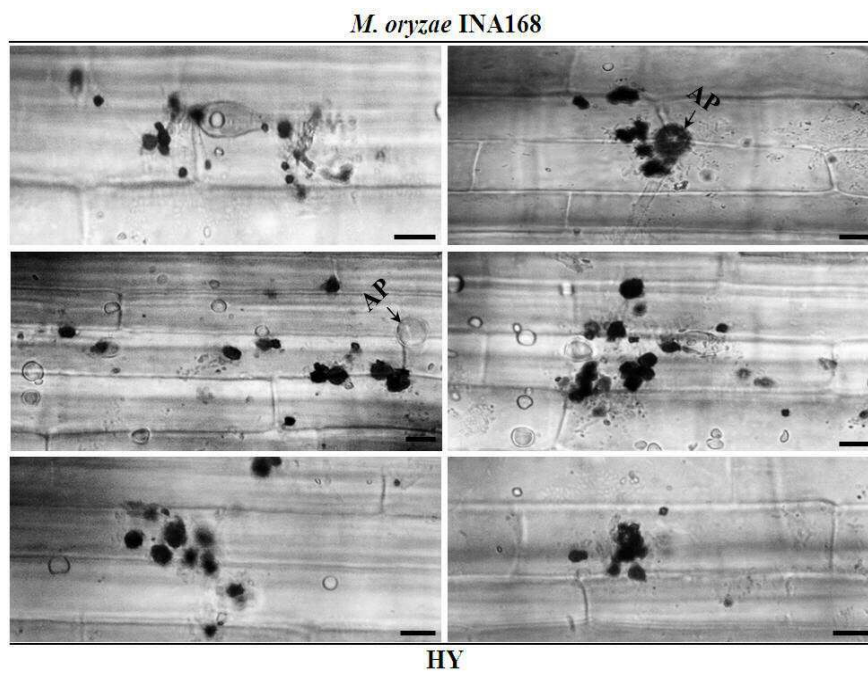
도면13a



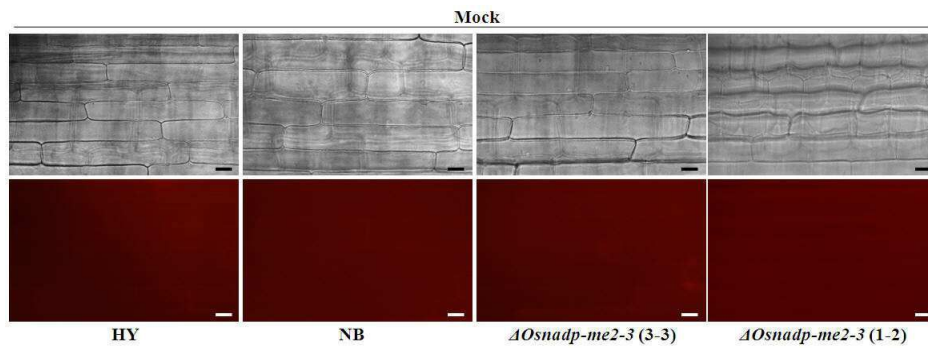
도면13b



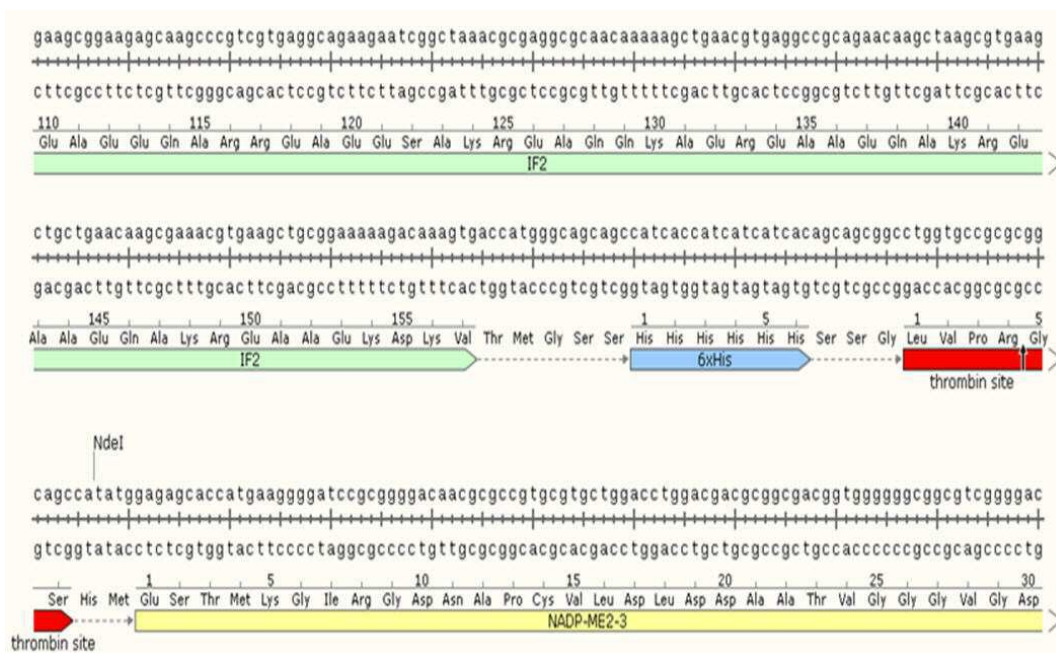
도면14



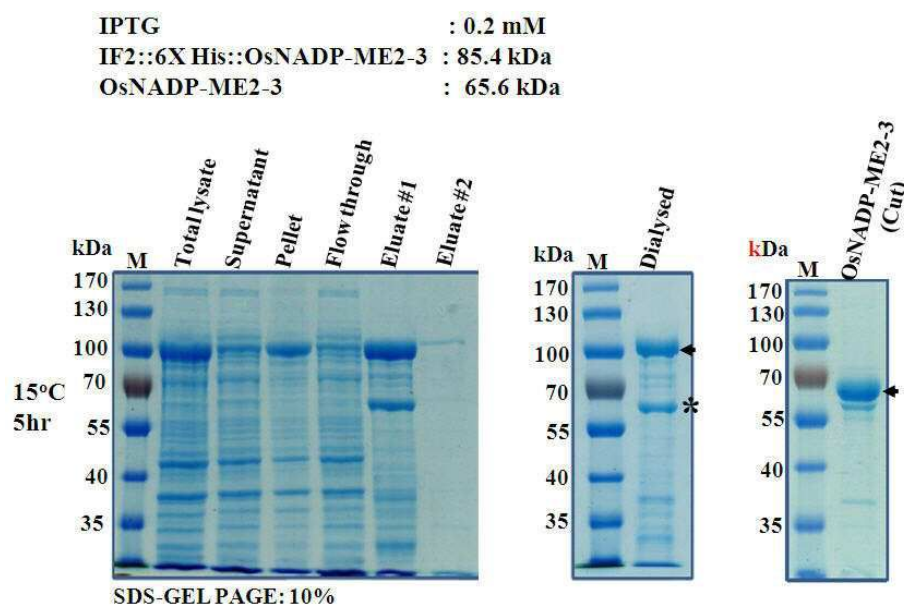
도면15



도면16a



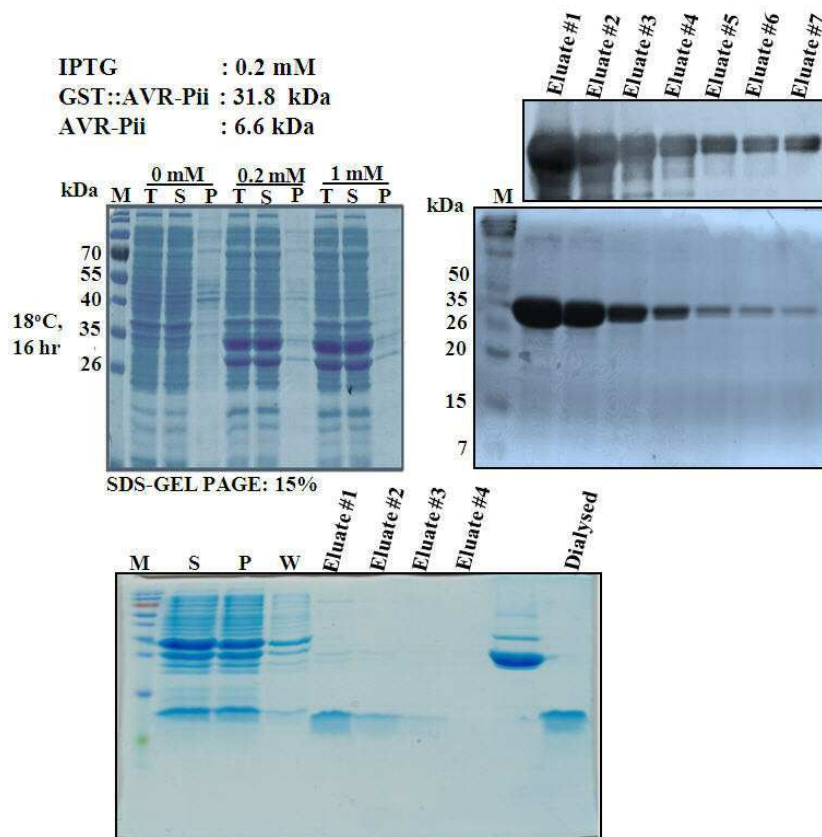
도면16b



도면16c



도면16d



서열 목록

<110> Sejong University Industry Academy Cooperation Foundation

<120> A Method for Screening Compositions for Enhancing the Plant
Disease Resistance

<130> PN140455

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of Avr-Pii

<400> 1

Met Gln Leu Ser Lys Ile Thr Phe Ala Ile Ala Leu Tyr Ala Ile Gly

1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Pro Thr Pro Ala Ser Leu Asn Gly Asn Thr Glu Val

20 25 30

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

35 40 45

His Lys Cys Ser Lys Cys Gly Tyr Gly Ser Asp Asp Ser Asp Ala Tyr

50 55 60

Phe Asn His Lys Cys Asn

65 70

<210> 2

<211> 593

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of OsNADP-ME2

<400> 2

Met Glu Ser Thr Met Lys Gly Ile Arg Gly Asp Asn Ala Pro Cys Val

1 5 10 15

Leu Asp Leu Asp Asp Ala Ala Thr Val Gly Gly Gly Val Gly Asp Thr

20 25 30

Tyr Gly Glu Asp Cys Ala Thr Glu Glu Gln Leu Val Thr Pro Trp Thr

35 40 45

Val Ser Val Ala Ser Gly Tyr Asn Leu Leu Arg Asp Pro Arg Tyr Asn
50 55 60
Lys Gly Leu Ala Phe Asn Glu Arg Glu Arg Glu Thr His Tyr Leu Arg
65 70 75 80
Gly Leu Leu Pro Pro Ala Ile Val Ser Gln Glu Leu Gln Glu Arg Lys
85 90 95
Ile Met His Asn Ile Arg Gln Tyr Gln Leu Pro Leu Gln Lys Tyr Met
100 105 110
Ala Met Met Asp Leu Gln Glu Gly Asn Glu Arg Leu Phe Tyr Lys Leu
115 120 125
Leu Ile Asp Asn Val Glu Glu Leu Leu Pro Val Val Tyr Thr Pro Thr
130 135 140
Val Gly Glu Ala Cys Gln Lys Tyr Gly Ser Ile Phe Ser Arg Pro Gln
145 150 155 160
Gly Leu Tyr Ile Ser Leu Lys Glu Lys Gly Lys Ile Leu Glu Val Leu
165 170 175
Lys Asn Trp Pro Glu Arg Ser Ile Gln Val Ile Val Val Thr Asp Gly
180 185 190
Glu Arg Ile Leu Gly Leu Gly Asp Leu Gly Cys Gln Gly Met Gly Ile
195 200 205
Pro Val Gly Lys Leu Ala Leu Tyr Thr Ala Leu Gly Gly Val Arg Pro
210 215 220
Ser Ala Cys Leu Pro Ile Thr Leu Asp Val Gly Thr Asn Asn Glu Ala
225 230 235 240
Leu Leu Asn Asp Glu Phe Tyr Ile Gly Leu Arg Gln Lys Arg Ala Thr
245 250 255
Ala Gln Glu Tyr Ala Asp Phe Leu His Glu Phe Met Thr Ala Val Lys
260 265 270
Gln Asn Tyr Gly Glu Lys Val Leu Ile Gln Phe Glu Asp Phe Ala Asn
275 280 285
His Asn Ala Phe Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Gly Thr Thr His Leu Val

290 295 300
 Phe Asn Asp Asp Ile Gln Gly Thr Ala Ser Val Val Leu Ser Gly Leu
 305 310 315 320
 Val Ala Ala Leu Lys Leu Val Gly Gly Ser Leu Ser Glu His Ser Tyr
 325 330 335
 Leu Phe Leu Gly Ala Gly Glu Ala Gly Thr Gly Ile Ala Glu Leu Ile
 340 345 350
 Ala Leu Glu Ile Ser Arg Gln Thr Lys Ala Pro Ile Glu Glu Cys Arg
 355 360 365

 Lys Lys Ile Trp Leu Val Asp Ser Lys Gly Leu Ile Val Ser Ser Arg
 370 375 380
 Lys Glu Thr Leu Gln His Phe Lys Lys Pro Trp Ala His Glu His Glu
 385 390 395 400
 Pro Val Gly Asn Leu Leu Asp Ala Val Lys Thr Ile Lys Pro Thr Val
 405 410 415
 Leu Ile Gly Thr Ser Gly Lys Gly Gln Thr Phe Thr Gln Glu Val Val
 420 425 430
 Glu Ala Ile Ser Ser Phe Asn Glu Arg Pro Val Ile Phe Ala Leu Ser

 435 440 445
 Asn Pro Thr Ser Gln Ser Glu Cys Thr Ala Glu Gln Ala Tyr Thr Trp
 450 455 460
 Ser Lys Gly Arg Ala Val Phe Ala Ser Gly Ser Pro Phe Asp Pro Val
 465 470 475 480
 Glu Tyr Asp Gly Lys Ile Tyr Val Pro Gly Gln Ala Asn Asn Ala Tyr
 485 490 495
 Ile Phe Pro Gly Phe Gly Leu Gly Val Val Met Ser Gly Ala Ile Arg
 500 505 510

 Val His Asp Asp Met Leu Leu Ala Ala Ser Glu Ala Leu Ala Gln Gln
 515 520 525
 Val Thr Gln Glu Asn Phe Asp Lys Gly Leu Thr Tyr Pro Pro Phe Ser
 530 535 540
 Asn Ile Arg Lys Ile Ser Ala His Ile Ala Ala Asn Val Ala Ala Lys

545	550	555	560
Ala Tyr Glu Leu Gly Leu Ala Ser Arg Arg Pro Arg Pro Lys Asp Leu			
	565	570	575
Val Lys Tyr Ala Glu Ser Cys Met Tyr Ser Pro Leu Tyr Arg Asn Tyr			
	580	585	590
Arg			