(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월05일
(11) 등록번호 10-1825596
(24) 등록일자 2018년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8261 (2013.01)
C12N 15/8279 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0163515
(22) 출원일자 2016년12월02일
심사청구일자 2016년12월02일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020090114715 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
염선인
경상남도 진주시 내동로348번길 8, 107동 305호 (가좌동, 주공그린빌아파트)
강원희
경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교
이준성
경상남도 창원시 의창구 대산면 진남로76번길 96
(74) 대리인
최규환

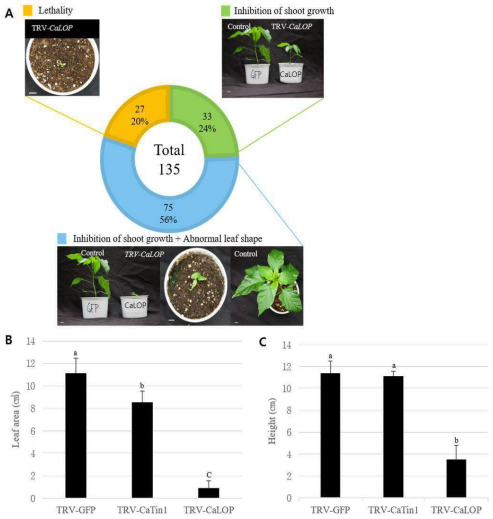
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **식물체의 생장, 발달 및 병 저항성을 조절하는 고추 유래의 CaLOP 유전자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명에서는 TMV-P0, TMV-P2, PepMoV 및 고추역병 원인균을 식물체에 각각 접종하였을 때, 병원균을 접종하지 않은 대조군에 대비하여 *CaLOP* 유전자가 강하게 발현되는 것을 확인하였고, 또한 바이러스 기반 유전자 침묵 기법(Virus-induced Gene Silencing, VIGS)을 이용하여 고추 유래의 *CaLOP* 유전자 침묵을 유도하였을 때, 식물체가 고사하거나 초장 및 엽면적이 감소되는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 식물의 생장, 발달 및 병 저항성을 조절하는 고추 유래의 *CaLOP* 유전자를 이용하여 식물의 생장 및 발달이 촉진되고 병 저항성이 강한 식물체를 얻음으로써, 경제 작물 등의 생산량과 품질 향상 및 생산 효율 증대에 크게 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
C12N 9/0069 (2013.01)
C12Y 113/11012 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ011100
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농생물게놈활용연구사업단
연구사업명 차세대바이오그린21_농생물게놈활용연구사업
연구과제명 고추 유전체 기반의 생물적 스트레스 저항성 유전자 대량 발굴 및 활용
기 여 율 1/2
주관기관 경상대학교
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A6A1A03031413
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중점연구소지원(기초과학)
연구과제명 농생명상업 기후변화 대응기술개발
기 여 율 1/2
주관기관 경상대학교
연구기간 2015.09.01 ~ 2018.08.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 고추 유래의 CaLOP(*Capsicum annuum* lipoxygenase homology protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 *CaLOP* 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 생장 및 발달을 조절하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 *CaLOP* 유전자 발현을 저해시켜 야생형 식물체에 비해 식물체의 생장 및 발달을 감소시키는 것을 특징으로 하는 식물체의 생장 및 발달을 조절하는 방법.

청구항 4

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 고추 유래의 CaLOP(*Capsicum annuum* lipoxygenase homology protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 식물체의 생장 및 발달이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 *CaLOP* 유전자 발현을 저해시켜 야생형 식물체에 비해 식물체의 생장 및 발달을 감소시키는 것을 특징으로 하는 식물체의 생장 및 발달이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항의 방법에 의해 제조된 식물체의 생장 및 발달이 조절된 형질전환 식물체.

청구항 7

제6항의 식물체의 형질전환된 종자.

청구항 8

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 고추 유래의 CaLOP(*Capsicum annuum* lipoxygenase homology protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 생장 및 발달 조절용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성을 조절하는 고추 유래의 *CaLOP* 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물은 생장과 발달을 조절함으로써 여러 환경 변화에 대처 및 적응하는 체계를 갖추고 있다. 종자의 발아에서부터 개화에 이르는 전체 생활환경에 걸쳐 환경 자극과 식물의 발달 프로그램은 끊임없는 상호작용을 통해 식물의 생존 적합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 그러한 환경 자극에 따른 식물의 발달 조절은 주로 외부환경과 식물의 내재적 발달 프로그램과의 상호 작용을 통해 일어나는 것으로 알려져 있다. 그리고 식물은 각종 병원

균의 침입과 외부의 자극에 대하여 면역반응을 작동시켜 스스로를 보호하도록 진화해 왔다. 그러나 이러한 저항성 반응에도 불구하고, 식물이 외부의 자극이나, 병에 대하여 위협받게 되면, 작물의 생산 및 품질의 저하를 가져와 경제적으로 큰 피해를 일으키게 된다. 이러한 피해를 최소화하기 위하여 고추를 비롯한 다양한 경제작물의 병 저항성 품종의 육종에 대한 육성 프로그램들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 병 저항성에 대한 이해 및 실제적 응용을 위해 식물에서의 저항성 기작에 대한 연구를 고추식물을 모델로서 수행하고 있다.

[0003] 고추(*Capsicum annuum*)는 가지과에 속하는 작물로서 남미가 원산지이며, 전 세계적으로 재배되고 향신료 및 붉은색 색소의 재료로서 이용되는 작물이다. 하지만, 고추는 바이러스, 역병, 탄저병 등의 다양한 병원균들에 의해 매년 전체 수확량의 10~30% 손실이 발생하게 된다. 이에 안정적인 생산성 증대와 병 저항성 품종 개발은 고추 육종의 중요 목표이다. 최근에는 고추 전체 염기서열 분석이 완료되어 고추의 병 저항성 인자 규명에 대한 연구가 가속화되고 있다. 하지만, 경제 및 산업적 중요성과 다른 작물들에 비해 고추의 안정적인 생육과 발달에 대한 연구는 아직 초기 단계이다.

[0004] 한편, 중국등록특허 제103667265호는 토마토 유래 *LOX* 유전자의 식물체 병 저항성을 조절하는 방법을 개시하고 있으나, 본 발명의 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성을 조절하는 고추 유래의 *CaLOP* 유전자 및 이의 용도에 대해 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 TMV-P0(tobacco mosaic virus-P0), TMV-P2, PepMoV(pepper mottle virus) 및 고추역병 원인균(*Phytophthora capsici*)을 고추 식물체에 각각 접종하였을 때, 병원균을 접종하지 않은 대조군에 대비하여 *CaLOP*(*Capsicum annuum* lipoxgenase homology protein) 유전자가 강하게 발현되며, 바이러스 기반 유전자 침묵 기법(Virus-induced Gene Silencing, VIGS)을 이용하여 *CaLOP* 유전자가 침묵된 고추 식물체를 제조하여 표현형을 분석하였을 때 고사하거나 초장 및 엽면적이 감소되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 고추 유래의 CaLOP(*Capsicum annuum* lipoxygenase homology protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 *CaLOP* 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 고추 유래의 CaLOP(*Capsicum annuum* lipoxygenase homology protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 고추 유래의 CaLOP(*Capsicum annuum* lipoxygenase homology protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에서는 TMV-P0, TMV-P2, PepMoV 및 고추역병 원인균을 식물체에 각각 접종하였을 때, 병원균을 접종하지 않은 대조군에 대비하여 *CaLOP* 유전자가 강하게 발현되는 것을 확인하였고, 또한 바이러스 기반 유전자 침묵 기법(Virus-induced Gene Silencing, VIGS)을 이용하여 고추 유래의 *CaLOP* 유전자 침묵을 유도하였을 때, 식물체가 고사하거나 초장 및 엽면적이 감소되는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 식물의 생장, 발달 및 병 저항성을 조절하는 고추 유래의 *CaLOP* 유전자를 이용하여 식물의 생장 및 발달이 촉진되고 병 저항성이 강한 식물체를 얻음으로써, 경제 작물 등의 생산량과 품질 향상 및 생산 효율 증대에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 고추 유래 *CaLOP* 유전자의 염기서열 및 이의 상동성 유전자들의 염기서열 비교분석(A)과 *CaLOP* 유전자의 도메인 구조(B)를 나타낸 것이다. *CaTin1* 및 *CaTin1-2*는 고추 유래의 유전자; *Sotub03g021410*

및 *Sotub03g021420*는 감자 유래의 유전자; *Niben101Scf05326g00010.1* 및 *Niben101Scf05326g00012.1*는 담배 유래의 유전자; *Solyc03g096540* 및 *Solyc03g096550*는 토마토 유래의 유전자; *Os02g51710*는 벼 유래의 유전자; 및 *AT2G22170*는 애기장대 유래의 유전자이다.

도 2는 본 발명의 고추 유래 *CaLOP* 유전자와 이의 상동성 유전자들 사이의 유연관계를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 고추 유래 *CaLOP* 유전자 및 이의 상동성 유전자인 *CaTin1*에 대한 고추 식물체 조직별 발현 양상을 나타낸 것이다. PL은 과피(Placenta); PR은 태좌(Pericarp); MG는 과실의 녹색기; B는 과실의 변색기; 및 DPA(day post anthesis)는 개화 후를 의미한다.

도 4는 TMV-P0(tobacco mosaic virus-P0)(A), TMV-P2(tobacco mosaic virus-P2)(B), PepMoV(pepper mottle virus)(C) 및 고추역병 원인균(*Phytophthora capsici*)(D)을 고추 식물체에 각각 접종하였을 때, 본 발명의 *CaLOP* 유전자 및 이의 동종상동성 유전자인 *CaTin1*의 발현 양상을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 *CaLOP* 유전자 및 이의 동종상동성 유전자인 *CaTin1*의 침묵 유도를 위해 사용된 TRV-CaLOP(A) 및 TRV-CaTin1(B)의 벡터 구조를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 *CaLOP* 유전자가 침묵된 고추 식물체의 사진(A)과 RT-PCR 분석 결과(B)를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 *CaLOP* 유전자가 침묵된 고추 식물체 표현형의 분석 결과(A)와 *CaLOP* 유전자 및 *CaTin1* 유전자가 침묵된 고추 식물체의 엽면적(B) 및 초장(C) 측정결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고추 유래의 CaLOP(*Capsicum annuum* lipoxygenase homology protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 *CaLOP* 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 CaLOP 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으며, *CaLOP* 유전자는 서열번호 1의 염기 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 *CaLOP* 유전자 발현을 저해시켜 야생형 식물체에 비해 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성을 감소시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 또한, 상기 식물체의 생장 및 발달 감소는 야생형 식물체에 비해 엽면적 및 초장이 감소되거나 고사되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0017] 본 발명에서, 상기 *CaLOP* 유전자 서열은 재조합 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 재조합 벡터는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스 벡터, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소 (translation control element)를 가지는 것이다.

[0018] *CaLOP* 유전자 각각의 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수

있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0020] 본 발명의 재조합 발현 벡터에서, 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터, 히스톤 프로모터 또는 Clp 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 상부의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "항시성 (constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이며, 본 발명에서는 항시성 프로모터의 사용이 바람직할 수 있다. 따라서, 항시성 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0021] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제 (NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 터미네이터 영역이 식물 세포에서의 유전자 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0022] 재조합 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), G418, 블레오마이신(Bleomycin)과 같은 항생제 내성 유전자, aadA 유전자 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 유전자총-매개 형질전환 방법(bombardment), 아그로박테리움-매개 형질전환법, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법 및 DEAE-덱스트란 처리법 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 고추 유래의 CaLOP(*Capsicum annuum* lipoxygenase homology protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

[0025] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0026] 상기 식물세포를 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같다.

[0027] 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0029] 상기 식물체는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물 또는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배

추, 양배추, 갓무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물이며, 더욱 바람직하게는 고추 식물체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 고추 유래의 CaLOP(*Capsicum annuum* lipoxygenase homology protein) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성 조절용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 CaLOP 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 *CaLOP* 유전자 또는 상기 *CaLOP* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물에 형질전환함으로써 식물체의 생장, 발달 및 병 저항성을 조절할 수 있는 것이다.

[0031] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0032] **재료 및 방법**

[0033] **1. 식물 재료, 바이러스 기반 유전자 침묵 기법 및 식물의 표현형 분석**

[0034] 고추는 23℃의 생장상(chamber)에서 16시간 광 및 8시간 암 조건으로 키웠으며, 떡잎의 상태일 때 TRV(tobacco rattle virus)-based VIGS(virus-induced gene silencing) 방법을 변형하여 수행하였다. pTRV1과 함께 *CaTin1* 및 *CaLOP* 유전자가 각각 클로닝된 2종류의 pTRV2 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 삽입하여 사용하였다. 상기 *CaTin1* 및 *CaLOP* 유전자가 각각 삽입된 아그로박테리움 투메파시엔스를 리팜피신 50mg/ml 및 카나마이신 50mg/ml를 포함하는 YEP(Yeast extract peptone) 액체배지에서 2일 동안 30℃에서 진탕 배양하였으며, 배양 후 아그로박테리움 투메파시엔스 배양액을 원심분리하여 세포를 침전시켜 침투 버퍼(10mM MES 및 10mM $MgCl_2$, pH 5.5)에 풀어준 후, 배양액의 흡광도를 0.5(Optical density, O.D.=0.5)로 정량을 하여 200μM의 아세토시린곤(Acetosyringone)을 넣어 상온에서 3~5시간 동안 배양한 후에 TRV1 벡터와 각각의 유전자가 클로닝된 TRV2 벡터가 삽입된 아그로박테리움을 1:1 비율로 혼합하였다. 이후 고추의 떡잎 뒷면에 배양액을 1ml의 주사기로 접종한 후 24시간 동안 16℃의 생장상에서 키운 후 23℃의 생장상(chamber)에서 16시간 광 및 8시간 암 조건으로 생육하였다. 표현형 분석은 접종 후 5주차의 식물에서 진행하였으며, 식물체의 초장(height) 및 엽면적(leaf area)을 측정하였으며, 엽면적은 각각의 식물체의 3번째 본엽을 채취하여 측정하였다. 통계분석은 SPSS 프로그램(PASW statistics 18, Chicago, USA)을 사용하여 분산분석(ANOVA)을 하였다. 분산분석 간에 평균의 비교는 터키(Tukey)의 다중비교법을 이용하였다.

[0035] **2. 유전자 서열 및 구조와 진화분석**

[0036] 본 발명에 사용된 *CaTin1* 및 *CaLOP* 유전자의 전체 서열은 고추 게놈 사이트(http://genome.pepper.snu.ac.kr/)를 기반으로 검증 및 확보하였으며, 상기 두 유전자의 구조 분석은 스마트(http://smart.embl-heidelberg.de/)를 이용하였다. 다른 작물 유전체에서 이종상동성 유전자(Orthologous gene)들은 SOL(sol genomic network, https://solgenomics.net/)의 데이터베이스를 이용하여 토마토(Tomato Genome protein sequences (ITAG release 2.40)), 감자(Potato ITAG Release 1 predicted proteins (ST1.0)) 및 담배(*N.benthamiana* Genome v1.0.1 predicted proteins)의 서열을 확보하였고, 벼는 RGAP(rice genome annotation project, Gene in MSU RGAP Release 7-protein sequences, http://rice.plantbiology.msu.edu/), 애기장대는 TAIR(Arabidopsis information resource, TAIR10 Proteins (protein), https://www.arabidopsis.org)의 데이터베이스를 이용하여 유전자의 서열을 확보하였다. 유전자 서열분석(MSA, Multiple Sequences Alignment)은 EBI(http://www.ebi.ac.uk/)의 T-coffee 프로그램을 사용하였으며, 진화 계통수 분석은 MEGA7(http://www.megasoftware.net/) 프로그램을 사용하였다. 통계방법은 근연접합법(Neighbor-joining)을 사용하였으며, 계통발생 실험은 부트스트랩법(Bootstrap method)으로 100번 반복하여 수행하였다. 치환모델은 JTT(Jones-Taylor-Thornton) 모델을 사용하였으며, 부분 간의 비율은 Uniform rates를 사용하였다. 공백과 잘못된 데이터의 처리는 부분 삭제(Partial deletion)하였고 95% 이하로 겹치는 것은 제거하였다.

[0037] **3. RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction)**

[0038] 총 RNA의 추출은 VIGS(virus-induced gene silencing) 수행 후 5주차의 식물체를 대상으로 3~4번째 본엽에서 추출하였으며, 트리졸(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. cDNA의 합성은 M-MLV 역전사 효소(Promega, Madison, USA)를 사용하였으며, 제조회사의 지침에 따라 수행하였다. 유전자들의 발현을 분석하기 위해 *CaTin1*_C_F(서열번호 3, GGCAGTGGTTACGACTACTT), *CaTin1*_C_R(서열번호 4, CATGATAGGACTGAGGATCG), *CaLOP*_N_F(서열번호 5, ACTGCCATGGGAGTAGCTCAGGT) 및 *CaLOP*_F_C_R(서열번호 6, GCCTACACAAATGATGAGATAACGT) 프라이머를 사용하였다.

[0039] **4. 발현패턴 분석**

[0040] 고추 유전자의 조직별 RNA 염기서열 정보는 김 등의 논문(Kim et al., 2014, Nat Genet, 46, 270-278)에서 확보하였고, CM334 품종에서 총 16단계의 정보 중에 잎(Leaf), 줄기(Stem), 뿌리(Root), 과피(Placenta, PL) 및 태좌(Pericarp, PR)의 정보와 과실의 숙도를 나타내는 녹색기(Mature green, MG) 및 변색기(Breaker, B)의 정보를 확보하였으며, 과피와 태좌는 각각 6일, 16일 및 25일, 녹색기 및 변색기 이후 5일 및 10일에 정보를 확보하여 사용하였으며, $\log_2$ RPKM의 값으로 변환하여 사용하였다. TMV-P0(tobacco mosaic virus-P0), TMV-P2, PepMoV(pepper mottle virus) 및 고추역병 원인균(*Phytophthora capsici*)을 접종한 CM334 품종의 RNA 염기서열 정보는 강 등의 논문(Kang et al., 2016, Sci Rep, 6, 33332)에서 확보하였으며, 병원균을 접종하지 않은 음성 대조군 값으로 정규화(normalization)한 후에 $\log_2$ RPKM(reads per kilobase million)의 값으로 변환하여 사용하였다. 히트맵(Heat map)은 RNA 염기서열 정보를 히트-맵 알 패키지(http://bioconductor.org/)를 이용하여 작성하였다.

[0041] **실시예 1. *CaLOP* 유전자의 동정 및 구조분석**

[0042] *CaLOP* 유전자의 전체 서열을 이용하여 단백질 수준에서의 유전자 비교분석을 수행하였다. 그 결과, *CaLOP* 유전자는 *CaTin*1 유전자와의 96%의 커버율(Query cover)을 가지고 있으며, 62%의 유사성을 가지고 있는 것을 확인하였다. *CaLOP* 유전자는 기존에 보고된 *CaTin1-2* 유전자와 84%의 커버율을 가지고 99%의 유사성을 가지고 있는 것을 확인하였다. 이를 통해, 상기 두 유전자는 상동성은 높으나 다른 유전자라는 것을 확인할 수 있었다(도 1A). 또한, *CaLOP* 유전자의 서열을 스마트를 이용하여 구조분석을 한 결과, 뉴클레오타이드 서열의 53번째에서 130번째 뉴클레오타이드 서열까지 SP(signal peptide)가 존재하였으며, 151번째에서 532번째 구간까지 PLAT/LH2(Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin/Lipoxygenase homology)가 존재하였다. 이들의 CDS 구간만을 이용하여 분석하였을 때, 1번째에서 26번째 구간까지 SP가 존재하였고, 33번째에서 160번째까지 PLAT/LH2 구조가 존재하였다(도 1B). *CaLOP* 유전자의 구조에서 PLAT/LH2 구조를 가지고 있는 것으로 보아 *CaLOP* 유전자는 잠재적인 리폭시게나아제(lipoxigenase)의 역할을 하는 단백질로 예측되었다. 따라서 *CaLOP* 유전자를 고추의 리폭시게나아제 유사성 단백질이라 하여 *CaLOP*(*Capsicum annuum* lipoxgenase homology protein)로 명명하였다. 또한, *CaLOP* 유전자의 생육과 발달에 관련된 기능분석을 위해, 동종상동성(Paralog)의 *CaTin1-2* 유전자도 본 발명의 분석에 함께 사용하였다.

[0043] 또한, *CaLOP* 및 *CaTin1* 유전자를 이용하여 블라스트(Blast)를 수행하였다. 그 결과, 감자(*Solanum tuberosum*; *Sotub03g021410*, *Sotub03g021420*), 담배(*Nicotiana sylbestris*; *Niben101Scf05326g00010.1*, *Niben101Scf05326g00012.1*), 토마토(*Solanum lycopersicum*; *Solyc03g096540*, *Solyc03g096550*), 벼(*Oryza sativa Japonica* Group; *Os02g51710*) 및 애기장대(*Arabidopsis thaliana*; *AT2G22170*)에서 유사한 유전자들을 확인하였다. 벼와 애기장대의 경우, 상기 *CaLOP* 및 *CaTin1* 유전자와 상동성이 높은 유전자인 *Os02g51710* 및 *AT2G22170*가 각각 하나씩 확인되었으며, 이들 유전자들을 *CaLOP* 유전자 동일하게 모두 SP 및 PLAT/LH2 도메인 구조를 가지고 있었으며, 단백질 서열의 상동성이 높은 것을 확인하였다. 계통도 분석(Phylogenetic analysis)을 통해 진화분석을 수행한 결과, 도 2에 개시한 바와 같이 총 3개의 그룹으로 볼 수 있었으며, 가지과 내에서는 *CaLOP* 유전자와 *CaTin1* 유전자를 중심으로 2개의 그룹으로 나뉘었다. *CaLOP* 유전자와 *CaTin1-2*, *Sotub03g021420*, *Solyc03g096540* 및 *Niben101Scf05326g00010.1* 유전자가 한 그룹으로 묶였으며, *CaTin1* 유전자와 *Sotub03g021410*, *Solyc03g096550* 및 *Niben101Scf05326g00012.1* 유전자가 다른 한 그룹으로 그룹핑되었다. 또한, 벼와 애기장대에서 확인된 *Os02g51710*와 *AT2G22170* 유전자는 가지과와 다른 그룹을 형성하는 것을 확인할

수 있었다(도 2).

[0044] **실시예 2. *CaLOP* 유전자의 발현패턴 분석**

[0045] 본 실시예 2에서는 본 발명의 *CaLOP* 유전자와 비교대조군인 *CaTin1* 유전자의 식물체 조직별 발현패턴을 분석하였다. 그 결과, 도 3에 개시한 바와 같이 상기 두 유전자는 비슷한 발현 패턴을 보였으며, 뿌리에서 가장 높게 발현이 나타났으며, 개화 후 6일, 16일 및 25일의 과피(PL_6DPA, PL_16DPA 및 PL_25DPA)에서 발현이 높게 나타났다. 반면에, 과실의 녹색기를 포함한 변색기(PL_MG, PL_B, PL_B5, PR_MG, PR_B 및 PR_B5)의 과정에서 발현이 낮게 나타나는 것을 확인하였다(도 3).

[0046] 본 발명에서 사용된 TMV-P0(tobacco mosaic virus-P0)는 저항성 반응을 나타내고, TMV-P2는 감수성 반응을 나타낸다. CM334 품종에 대해 TMV-P0를 접종한 후의 발현패턴을 확인한 결과, TMV-P0 바이러스 접종 후 4시간째 이후로부터 *CaLOP* 및 *CaTin1* 유전자 모두 발현이 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 4A). 또한, TMV-P2 바이러스 접종 후 0.5시간째에 *CaLOP* 유전자의 발현이 나타나기 시작했으며, 두 유전자 모두 바이러스 접종 후 4시간째에 발현이 가장 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었으나, 24시간 이후부터 두 유전자 모두 발현이 약해지는 것을 확인할 수 있었다(도 4B).

[0047] 또한, PepMoV(pepper mottle virus)에 대한 발현 패턴에서, 바이러스 접종 후 4시간째에 *CaLOP* 및 *CaTin1* 유전자 모두 발현이 강하게 나타났다가 24시간 이후부터 약해지는 것을 확인할 수 있었으며, 다시 48시간 이후로 발현이 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 4C). 고추역병 원인균(*Phytophthora capsici*)에 대한 유전자의 발현을 분석결과, 고추역병 원인균 접종 후 4시간 이후부터 *CaLOP* 및 *CaTin1* 유전자 모두 발현 정도가 증가하였지만 *CaTin1* 유전자의 경우, 고추역병 접종 48시간 이후에는 발현 정도가 크게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 반면에, *CaLOP* 유전의 경우 48시간 이후에도 발현량이 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 4D).

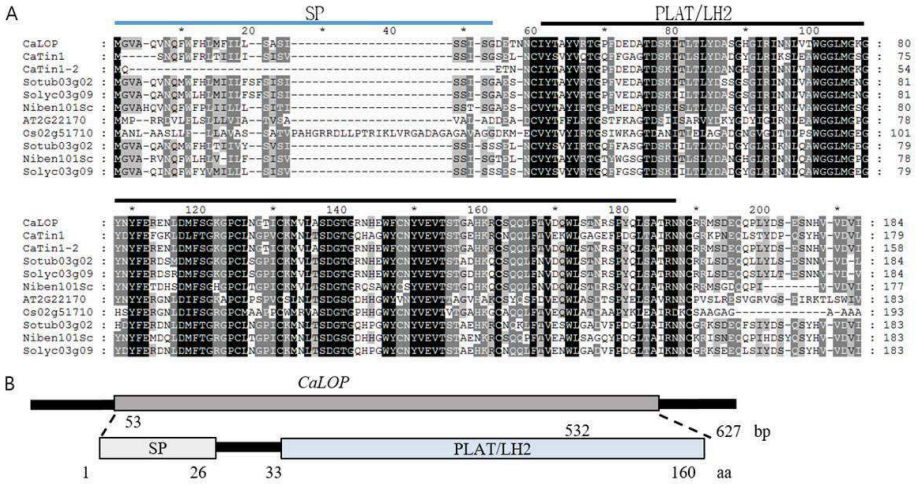
[0048] **실시예 3. *CaLOP* 유전자의 침묵에 의한 식물체의 표현형 분석**

[0049] 본 실시예 3에서는 *CaLOP* 유전자의 기능을 분석하기 위해, VIGS를 통해 *CaTin1* 및 *CaLOP* 유전자 침묵을 유도하여 대조군(TRV-GFP)과 비교 분석하였다. VIGS에 사용된 벡터에 삽입된 유전자 침묵구간은 유전자들의 N-말단(N-terminal) 구간을 사용하였으며(도 5), VIGS(virus-induced gene silencing) 후 5주째에, 대조군(TRV-GFP)과 *CaTin1* 유전자가 침묵된 식물체(TRV-CaTin1)의 표현형을 비교하였을 때, 표현형의 차이는 보이지 않았지만 *CaLOP* 유전자가 침묵된 식물체(TRV-CaLOP)의 경우, 초기 생육 단계에서 고사, 초장의 단축, 잎의 변형과 함께 초장이 줄어드는 3가지의 표현형이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 초장을 비교하였을 때, *CaLOP* 유전자가 침묵된 식물체는 대조군(TRV-GFP)과 비교하여 초장이 평균 7.8㎝가 줄어든 것을 확인할 수 있었다(도 6A). 이후 RT-PCR 분석을 통해, 상기 *CaTin1* 및 *CaLOP* 유전자의 발현 양상을 확인한 결과, *CaTin1* 유전자가 침묵된 식물체와 *CaLOP* 유전자가 침묵된 식물체에서 각각의 유전자의 발현이 줄어든 것을 통해 유전자 침묵현상이 일어난 것을 확인할 수 있었으며(도 6B), 반복 실험을 통해, *CaLOP* 유전자의 발현 억제를 통해 식물체의 생육 및 발달의 변화 양상을 확인할 수 있었다.

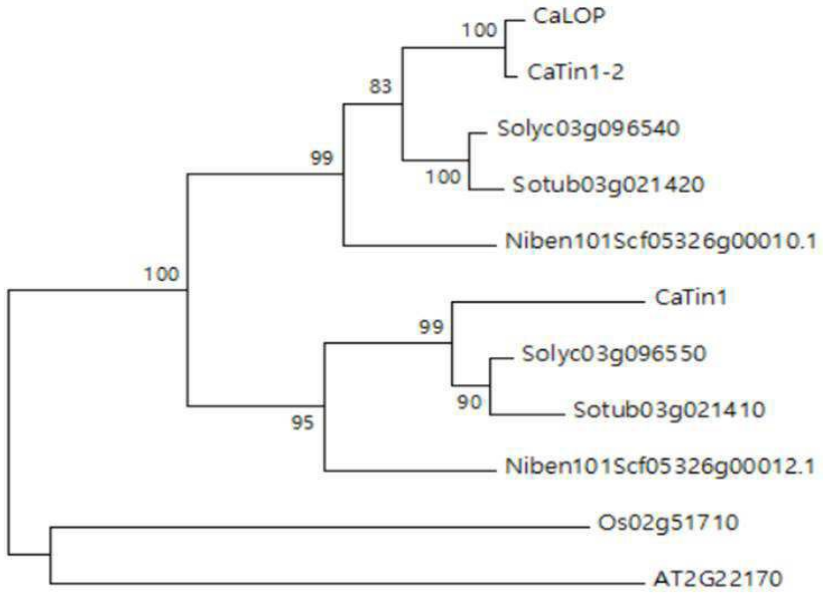
[0050] 또한, *CaLOP* 유전자가 침묵된 식물체 전체 135개체 중에서 27개체(20%)의 식물체는 *CaLOP* 유전자 발현이 억제되면서 초기 생육 단계에서 고사하였고, 33개체(24%)의 식물체는 대조군(TRV-GFP)과 비교하였을 때 초장이 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 나머지 75개체(56%)에서는 대조군(TRV-GFP)에 대비하여 초장이 유의하게 감소되고 잎의 모양이 변형되는 것을 확인할 수 있었다(도 7A). 식물체의 엽면적을 측정한 결과, VIGS 5주차 식물체의 엽면적에서 대조군(TRV-GFP)은 평균 11.1㎠, *CaTin1* 유전자가 침묵된 식물체에서는 8.5㎠, *CaLOP* 유전자가 침묵된 식물체에서는 0.9㎠으로, 대조군보다 *CaTin1* 유전자가 침묵된 식물체는 2.6㎠, *CaLOP* 유전자가 침묵된 식물체에서는 10.2㎠가 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 7B). 또한, 초장을 측정한 결과, 대조군(TRV-GFP)은 평균 11.3㎝이며, *CaTin1* 유전자가 침묵된 식물체의 초장은 11.1㎝로 확인되어 대조군과 비교하였을 때 유의한 차이를 보이지 않은 반면, *CaLOP* 유전자가 침묵된 식물체에서는 평균 3.5㎝로 대조군과 비교하였을 때 초장이 평균 7.8㎝ 더 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 7C). 이러한 결과들을 통해 *CaLOP* 유전자는 *CaTin1* 유전자와 달리 식물의 생육과 발달에 핵심적인 기능을 수행한다는 것을 확인할 수 있다.

도면

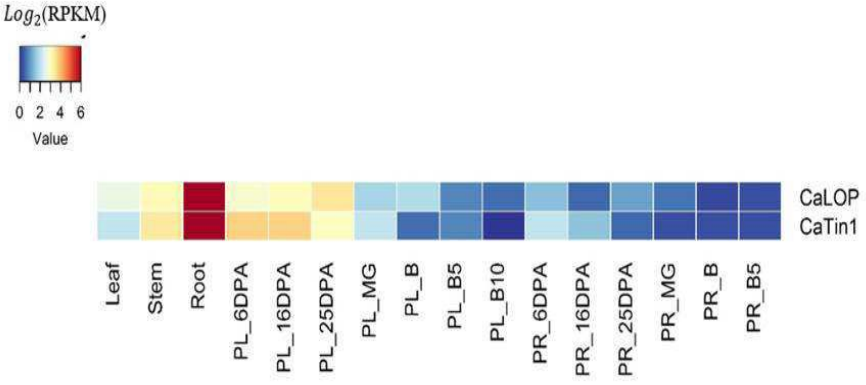
도면1



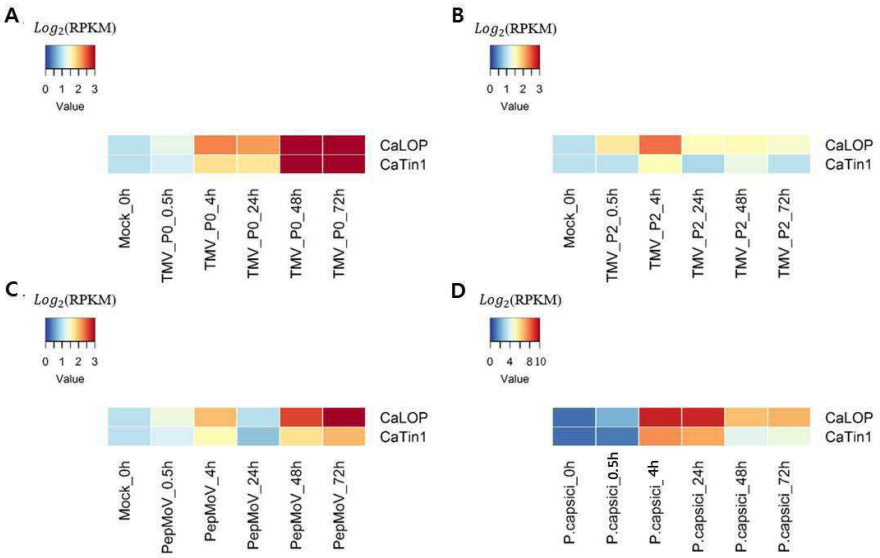
도면2



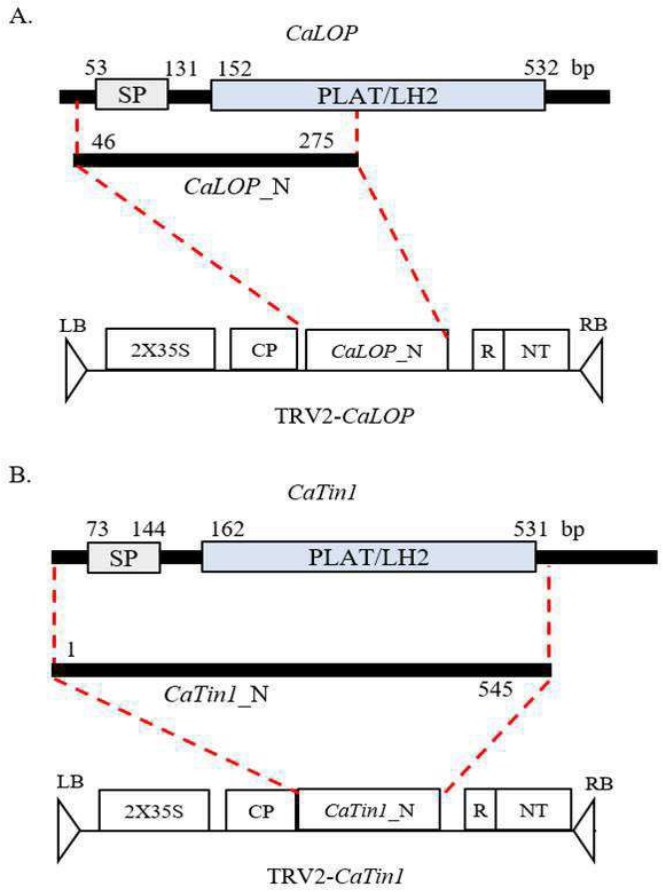
도면3



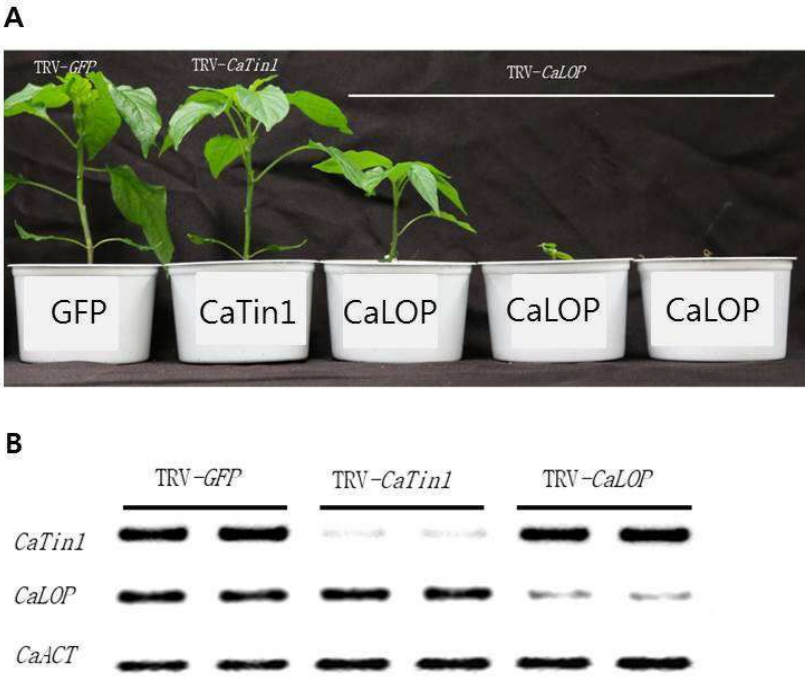
도면4


A
Log2(RPKM)
0 1 2 3
Value
CaLOP
CaTin1
Mock_0h
TMV_P0_0.5h
TMV_P0_4h
TMV_P0_24h
TMV_P0_48h
TMV_P0_72h
B
Log2(RPKM)
0 1 2 3
Value
CaLOP
CaTin1
Mock_0h
TMV_P2_0.5h
TMV_P2_4h
TMV_P2_24h
TMV_P2_48h
TMV_P2_72h
C
Log2(RPKM)
0 1 2 3
Value
CaLOP
CaTin1
Mock_0h
PepMoV_0.5h
PepMoV_4h
PepMoV_24h
PepMoV_48h
PepMoV_72h
D
Log2(RPKM)
0 4 8 10
Value
CaLOP
CaTin1
P.capsici_0h
P.capsici_0.5h
P.capsici_4h
P.capsici_24h
P.capsici_48h
P.capsici_72h

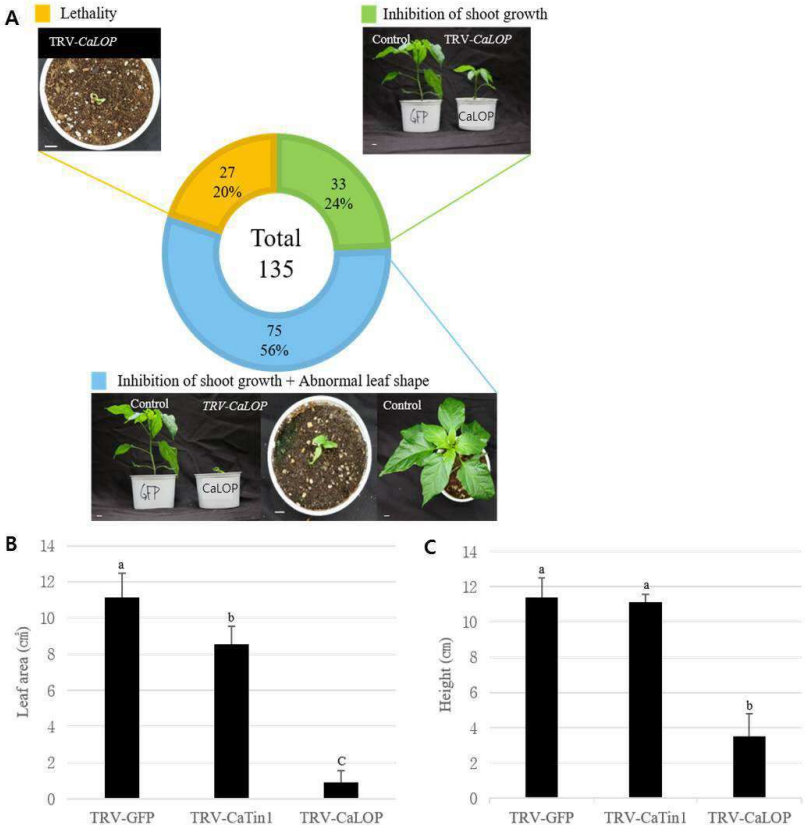
도면5


A.
CaLOP
53
131
152
532 bp
SP
PLAT/LH2
46
275
CaLOP_N
LB
2X35S
CP
CaLOP_N
R
NT
RB
TRV2-CaLOP
B.
CaTin1
73
144
162
531 bp
SP
PLAT/LH2
1
CaTin1_N
545
LB
2X35S
CP
CaTin1_N
R
NT
RB
TRV2-CaTin1

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> CaLOP gene from Capsicum annuum regulating growth, development and disease resistance of plant and uses thereof

<130> PN16411

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 555

<212> DNA

<213> Capsicum annuum

<400> 1

atgggagtag ctcaggttaa ccaattttgg ttccatctca tgttcatcct tctctccgcc 60

tcgatttctt caatttcggg agatgaaaca aataattgta tctacacagc ttatgtccga 120

actgggccat tcgacgagga tgcaactgac tcaaaaatca ccttaactct gtatgatgcg 180

agtggtcatg gaattagaat caacaaccta gtgacttggg gtgggcttat gggcaaaggt 240

tacaactact ttgaaaggga aaacttggat atgttcagtg ggaagggccc ctgtttgaat 300

gggaccatat gcaaaatggt cttggcttct gatggtacag gccgaaacca tgaatggttc 360

tgtaactacg tggaagtcac ttctacagga gcccacaaac gatgcagcca acaactgttc 420

accgtggatc agtggcttag caccaatcgt tcaccgtatc agctctccgc caccaggaac 480

aactgtcggc gtatgtccga tgagcaacag ccccttacg attcagaatc aaatcatgtt 540

gttgatgtta tttga 555

<210> 2

<211> 184

<212> PRT

<213> Capsicum annuum

<400> 2

Met Gly Val Ala Gln Val Asn Gln Phe Trp Phe His Leu Met Phe Ile
1 5 10 15

Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ser Ser Ile Ser Gly Asp Glu Thr Asn Asn
20 25 30

Cys Ile Tyr Thr Ala Tyr Val Arg Thr Gly Pro Phe Asp Glu Asp Ala
35 40 45

Thr Asp Ser Lys Ile Thr Leu Thr Leu Tyr Asp Ala Ser Gly His Gly

50 55 60

Ile Arg Ile Asn Asn Leu Val Thr Trp Gly Gly Leu Met Gly Lys Gly

65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Phe Glu Arg Glu Asn Leu Asp Met Phe Ser Gly Lys Gly

85 90 95

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

100 105 110

Thr Gly Arg Asn His Glu Trp Phe Cys Asn Tyr Val Glu Val Thr Ser

115 120 125

Thr Gly Ala His Lys Arg Cys Ser Gln Gln Leu Phe Thr Val Asp Gln

130 135 140

Trp Leu Ser Thr Asn Arg Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Thr Arg Asn

145 150 155 160

Asn Cys Arg Arg Met Ser Asp Glu Gln Gln Pro Leu Tyr Asp Ser Glu

165 170 175

Ser Asn His Val Val Asp Val Ile

180

<210> 3

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ggcagtggtt acgactactt 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

catgatagga ctgaggatcg 20

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

actgccatgg gagtagctca ggt 23

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gcctacacaa atgatgagat aacgt 25