(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 15/00

(11) 공개번호 특2003-0004305
(43) 공개일자 2003년01월14일

(21) 출원번호 10-2002-7006548
(22) 출원일자 2002년05월22일
번역문 제출일자 2002년05월22일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2000/04454
(86) 국제출원출원일자 2000년11월22일
(87) 국제공개번호 WO 2001/38512
(87) 국제공개일자 2001년05월31일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 리히텐슈타인, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구아바부다, 코스타리카, 도미니카연방, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 에쿠아도르, 필리핀,
AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드, 사이프러스,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비쏘, 적도기네,

(30) 우선권주장
9927609.9 1999년11월22일 영국(GB)
0022960.9 2000년09월19일 영국(GB)
0023668.7 2000년09월27일 영국(GB)

(71) 출원인 플랜트 바이오사이언스 리미티드
영국 노퍽 엔알4 7유에이치 노리지 콜니 레인 노리지 리서치 파크

(72) 발명자 바울콤베데이비드찰스
영국노퍽엔알23에이치와이노리지캐르나르본로드63
보인네트올리비어
영국노퍽엔알23제이와이노리지린콜른스트리트41
함밀톤앤드류존
영국노퍽엔알50피비노리지코스테세이롱델힐즈51

(74) 대리인 김성기

심사청구 : 없음

(54) 전사 후 유전자 사일런싱（ＰＴＧＳ）의 억제제와 함께발현시킴으로써 이식 유전자의 발현을 증가시키는 방법

요약

식물 중의 표적 뉴클레오티드 서열로부터의발현을 증가시키기 위한 다양한 방법, 예를 들어 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 핵산 및 전사 후 유전자 사일런싱(PTGS) 억제제 단백질(바이러스 또는 식물에서 유래한 것이 바람직함)을 암호화하는 제2 핵산을 식물의 조직(예를 들어 잎)으로 일시적으로 도입하는 단계를 포함하는 방법을 기재하고 있으며, 이때 제1 핵산 및 제2 핵산은 단일의 바이너리 벡터 구조내에 포함되거나 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열이 각각 제1 바이너리 벡터 및 제2 바이너리 벡터 구조내에 포함된다. 이후에 단백질을 위하여 식물 조직을 채취할 수 있다. 이 방법은 정상(stable) 이식 유전자 또는 특정 복제 벡터를 사용하여 얻을 수 있는 경우보다 훨씬 더 높은 수준의 유전자 발현을 산출할 수 있다. 또한 특정한 PTGS 억제제 단백질, 즉 감자 바이러스 X(pvx)의 p25 단백질, 아프리카 카사바 모자이크 바이러스(acmv)의 AC2 단백질, 벼 황색 반점 바이러스(rymv)의 P1 단백질, 토마토 버쉬 스턴트 바이러스(tbsv)의 19K 단백질 및 이들의 변종을 기재하고 있다. 이들 억제제는 일시적인 발현 시스템의 증가를 비롯한 임의의 PTRS 환경에서 사용될 수 있다.

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 유전자 사일런싱(silencing), 특히 전사 후 유전자 사일런싱을 억제하여 유전자 발현을 상승시키기 위한 물질 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

식물에 있어서, 전사 후 유전자 사일런싱(PTGS)은 식물 게놈 중에 상동성 있는 서열을 도입한 후 특정 RNA의 정상 상태의 수준이 감소되는 것으로서 명확해졌다. 이 감소는 상응하는 유전자의 전사 수준에는 영향을 미치지 않고 표적 RNA 종의 이용률(turnover) 증가에 의하여 일어난다((1)에서 다시 본다).

PTGS는 다양한 방법으로 개시될 수 있고, 식물의 내생 유전자의 공억제 및 이식 유전자의 발현 감소 현상을 일으키는 것으로 생각된다. 형질 전환된 식물에 있어서, PTGS는 이식 유전자 및 임의의 유사한 내생 유전자의 전사에 대하여 표적화되고 이의 상응하는 유전자 산물이 낮은 수준으로 축적되도록 한다(Vaucheret et al., 1998).

유전자 도입 식물의 PTSG의 가장 흥미로운 특징 중의 하나는 그것이 세포 자율적이지 않다는 것이다. 유전자 사일런싱의 시그널은 원형질 연락사를 통하여 세포사이를, 도관을 통하여 장거리를 이동하여 표적 RNA의 서열 특이적 분해를 지시한다(2, 3). 이 시그널의 성질은 알려져 있지 않으나 이의 작용의 특이성에 기초하여 볼 때, 핵산을 포함하는 것으로 생각된다. 상기 분해 메커니즘의 특이성은 PTGS를 나타내는 조직에 축적되어 있는 표적 RNA에 상응하는 짧은 RNA 종에 의하여 매개될 수도 있다(Hamilton 및 Baulcombe, 1999 - 뉴클레오티드(nt) 수가 21~23개인 RNA가 있는 것으로 되어 있을지라도, 상기 문헌에는 뉴클레오티드 수가 25개인 것으로 기재되어 있다).

PTGS가 작용하는 정확한 메커니즘이 이미 밝혀져야 하지만, 바이러스가 PTGS를 개시함과 함께 PTGS의 표적이 될 수 있다는 각종 발견(4)은 PTGS가 식물이 외래 핵산을 인지하여 제거하는 자연적인 메커니즘이라는 것(5)을 제시한다. PTGS와 바이러스 저항성 간의 상기 제안된 관계를 지지하기 위하여, 유전자가 도입되지 않은 식물 중에서 몇몇의 바이러스가 RNA 매개 방어(RMD)를 유도한다는 것을 나타내었다. 이 유도된 방어는 바이러스 감염에 대한 뉴클레오티드 서열 특이적 저항성을 특징으로 한다는 점에서 PTGS와 유사하다(6). 감염된 세포에 있어서, PTGS는 바이러스 RNA에 대하여 표적화되어 그것의 축적을 일으키거나 또는 감염 과정 중의 후기 단계에서 느려지거나 정지한다(Ratcliff et al., 1999). 모든 예가 그런 것은 아니지만 어떤 경우에 있어서, 이 RMD를 나타내는 식물의 상부 잎들은 그들이 매우 낮은 수준의 바이러스 RNA를 함유하고 증상이 없기 때문에 회복되었다고 한다(7, 8).

바이러스 보호에 있어서 PTGS의 역할은 오이 모자이크 바이러스(CMV)로 감염된 sgs2 돌연변이 아라비돕시스(Arabidopsis) 식물의 표현형에 의하여 설명될 수 있다(Mourrain et al., 2000). 이 식물들은 PTGS에 결함이 있고 상기 바이러스에 과민성이다. 또한, 콜리모바이러스, 네포바이러스, 포텍스바이러스 및 토브라바이러스에 있어서, PTGS는 제2 바이러스의 감염에 대한 교차 보호에 대하여 적어도 부분적으로 원인이 된다는 증거가 있다(Covey et al., 1997; Ratcliff et al., 1997; Ratcliff et al., 1999). 제1의 바이러스는 PTGS를 유도하여 감염된 세포가 초회항원자극되어 뉴클레오티드 특이적 방법으로 제2의 바이러스에 저항하도록 한다. 또한, 숙주의 서열 인자를 운반하는 토바모바이러스, 포텍스바이러스 및 제미니바이러스 벡터로 감염된 식물 중의 내생 유전자의 사일런싱도 PTGS가 항바이러스 방어 메커니즘이라는 것을 나타낸다(Baulcombe, 1999). 바이러스 복제의 개시 후에, PTGS는 바이러스 게놈 중의 서열에 대하여 표적화되고 이에 상응하는 내생 유전자의 발현을 억제한다.

PTGS가 유전자 도입 식물에서 전신으로 수송된다는 발견은 그것이 또한 자연적인 바이러스 감염시 비-세포 자율적인 방식으로 작용한다는 추측을 불러일으켰다(Voinnet et al., 1998; Jorgensen et al., 1998; Carrington, 1999; Lucas 및 Wolf, 1999). 바이러스에 의해 유도된 사일런싱 시그널은 감염의 최전선에 앞서서 세포와 세포를 이동하고 체관부를 통하여 장거리를 통하여 수송될 수 있다. 이 세포간 시그널링의 효과는 비감염세포에서 RNA 서열 특이적 바이러스 저항성을 강하게 하여 결과적으로 식물 전체에 바이러스가 퍼지는 것을 지연시킬 것이다.

전술한 내용에도 불구하고, 식물을 감염시키는 바이러스의 능력은 그들이 RMD를 피하거나 억제하도록 진화했다는 것을 나타낸다.

이러한 착상은 포티바이러스가 다른 바이러스와 상승적인 상호작용을 한다는 분석에 의하여 처음으로 유발되었다(9). 이 상승 작용은 포티바이러스 게놈 중에서 암호화되는 Hc-프로티아제(HcPro)에 의한 숙주 방어 메커니즘의 억제에 기인하였으며(10), 예로서는 담배 엽맥 반점 바이러스(tobacco vein mottling virus, TVMV), 담배 에치 바이러스(tobacco etch virus, TEV) 및 감자 바이러스 Y(potato virus Y, PVY)가 있다. 이후의 계속된 연구는 HcPro가 PTGS의 억제제임을 확인하였고 PTGS와 항바이러스 방어 간의 관련성을 제공하였다(11~13). 생각컨데, 상기 억제는 전술된 RMD에 대하여 작용한다.

오이 모자이크 바이러스(CMV)의 제2의 단백질인 2b 단백질은 또한 N.benthamiana 중에서 PTGS의 억제제로 확인되었다(12). 단백질 2b 및 HcPro는 단백질 서열 수준에서 비슷하지 않으며, 흥미롭게도 그들은 동일한 방법으로 사일런싱 메커니즘을 표적화하지 않는다: HcPro는 조직에서 이미 확립된 사일런싱을 억제하는 반면 2b 단백질은 단지 사일런싱의 개시에만 영향을 미친다(12, 14).

유전자 사일런싱의 억제제는 특히 식물 중에서 원하는 유전자, 구체적으로 이종 유전자의 발현을 향상시키기 위하여 사용될 수 있다(Vance 등의 WO 98/44097 참고). 또한, PTGS가 동물에서도 작용한다는 증거의 증가는 사일런싱 억제가 동물 바이러스에 의해서도 채택되었으며(31) 그러한 억제제는 예를 들어 포유류 중의 유전자 발현과 관련되어 있을 수도 있다는 가능성을 일으킨다.

따라서 유전자 사일런싱의 억제제 또는 이의 공급원의 확인은 본 기술분야에 공헌한다는 것을 알 수 있다.

발명의 상세한 설명

각종 바이러스로부터 얻은 다수의 유전자 사일런싱의 억제제가 확인되었다. PTGS를 억제하는 능력은 GFP 이식 유전자의 PTGS를 나타내는 N.benthamiana 식물을 바이러스, 또는 특정 바이러스의 병원성 결정소를 발현시키는 PVX 벡터로 감염시키므로써 평가되었다.

본 명세서에 기재된 것과 같은 억제제는 특히 의도되지 않은 이들 예에서 사일런싱을 억제하는 데 이용될 수 있다.

별도의 실험에서는 바이러스에 의하여 유도된 시그널의 이동이 바이러스의 이동으로부터 분리될 수 있는 신규의 PVX에 기초한 실험 시스템을 이용하였다. 이것은 항바이러스 시그널 분자가 감염된 세포로부터 몇 센티미터 이상 수송되어 수용체 잎의 엽맥내 및 그 주위에 축적될 수 있었다는 것을 나타내었다. 그러나, PVX의 25kDa 단백질(p25)은 전신의 PTGS 반응을 억제한다. 초기 모델에 있어서, PVX의 p25 단백질은 이동 단백질을 특징으로 하였고 채널을 닫는 촉진제로서 생각되었다(Angell et al., 1996). 아래에 기재되는 연구는 이것에 대한 촉진 작용을 더 제시한다.

p25로의 추가 실험은 PTGS 경로에서 2가지 지류를 나타내었다. 하나의 지류는 바이러스 RNA를 복제함으로써 활성화되고 p25에 의하여 영향을 받지 않는 것으로 보인다. 제2 지류는 바이러스의 복제성 RNA 또는 이식 유전자의 복제기점에 의하여 활성화되고 p25에 의하여 억제될 수 있다. 전신의 시그널은 상기 경로 중 제2의 p25 민감성 지류에서 생성되는 것으로 보이며, 뉴클레오티드 수가 21~23개 정도인 짧은 RNA 종의 전구체인 것같다. 기타의 것들 가운데, 이들 관찰은 p25가 표적 유전자의 전신의 사일런싱을 특이적으로 억제하는데 사용될 수 있다는 것을 나타낸다(즉, 상대적으로 이의 발현을 향상시킴). 이것은 바이러스성 발현 유전자의 억제를 상응하게 약화시키는 일(이것은 식물의 바이러스 질환에 대한 감수성을 증가시킬 수 있음) 없이, 식물 중의 표적 이식 유전자의 발현을 선택적으로 향상시키는데(억제를 약화시킴) 사용된다.

본 발명의 또 하나의 양상에 있어서, 다양한 억제제(신규한 억제제 및 종래 기술의 억제제 모두)는 지속된 발현 기간(일반적으로 약 며칠 동안)에 걸쳐 매우 높은 수준의 단백질을 생성하는 '일시적인' 발현 시스템과 함께 사용되어 왔다. 식물의 바이너리 벡터로부터의 각 경우에 있어서, 구체적인 실험에서는 원하는 단백질의 일시적인 발현과 함께 억제제의 일시적인 발현을 이용하였다. 상기 결과는, 이루어진 발현 수준이 매우 (ⅰ)향상되었고 (ⅱ)지속되었기 때문 뿐만 아니라 PTGS가 이러한 방식으로 사용된 구성으로부터 기인한 상기 발현의 '일시적인' 성질에서 어떤 역할을 수행하였다는 것이 지금까지는 알려져 있지 않았기 때문에 매우 놀라웠다. 실제로, 여기서의 상기 결과는, 억제제의 존재하에 사용되었을 때, 어떤 경우에 있어서 발현은 세포들이 생존하는 한 지속되기 때문에 '일시적인'이라는 용어는 어떤 관점에서 잘못된 명칭이라는 것을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, '일시적인'이라는 용어를 편의상 사용할 것이며, 이는 본 기술 분야의 숙련자는 이 용어에 익숙할 것이기 때문이다. 본 발명의 양호한 양상에 있어서, 이 시스템은 식물 또는 이의 부분에서 단백질을 '안정한'(융합된) 이식 유전자 또는 바이러스 벡터의 이용에 의한 것 보다 높은 농도로, 그리고 편리하게 생성하는 신속한 방법으로 사용될 수 있다. 또한 그것은 추정되는 억제제를 동정하기 위한 민감한 '트랩' 분석법으로 사용될 수 있다. 추정되는 억제제는 식물, 동물 또는 바이러스와 같은 임의의 출처로부터 유래할 수 있다.

본 발명의 다양한 양상에 대한 참고문헌 및 이하 논의되는 바이러스에 대하여 아래의 약자가 사용된다.

담배 엽맥 반점 바이러스(tobacco vein mottling virus) (TVMV)

담배 에치 바이러스(tobacco etch virus) (TEV) [포티바이러스(potyvirus)]

감자 바이러스 Y(potato virus Y) (PVY) [포티바이러스]

오이 모자이크 바이러스(cucumber mosaic virus) (CMV) [쿠쿠모바이러스(cucumovirus)]

담배 모자이크 바이러스(tobacco mosic virus) (TMV) [토바모바이러스(tobamovirus)]

감자 바이러스 X(potato virus X) (PVX) [포텍스바이러스]

토마토 버쉬 스턴트 바이러스(tomato bushy stunt virus) (TBSV) [톰버스바이러스(tombusvirus)]

벼 황색 반점 바이러스(rice yellow mottle virus) (RYMV) [소베모바이러스(sobemovirus)]

아프리카 카사바 모자이크 바이러스(african cassava virus) (ACMV) [제미니바이러스(geminivirus)]

나르시서스 모자이크 바이러스(narcissus mosaic virus) (NMV) [포텍스바이러스(potexvirus)]

난디나 바이러스 X(nandina virus X) (NVX) [포텍스바이러스]

비올라 모자이크 바이러스(viola mosaic virus) (VMV) [포텍스바이러스]

카우피 모자이크 바이러스(cowpea mosaic virus) (CPMV) [코모바이러스(comovirus)]

폭스테일 모자이크 바이러스(foxtail mosaic virus) (FoMV) [포텍스바이러스]

알팔파 모자이크 바이러스(alfalfa mosaic virus) (AMV)

담배 검은 고리 바이러스(tobacco black ring virus) (TBRV) [네포바이러스(nepovirus)]

PTGS 유사 저항 메커니즘의 억제제를 생성하여 GFP의 PTGS를 억제하는 이들 야생 종류 및 재조합 바이러스에는 TMV, TBSV, RYMV, ACMV, NMV, NVX, VMV 및 CPMV가 있다.

후술하는 실시예 중의 제1 PTGS 억제 분석에 있어서, 관련된 바이러스는 특징적인 유형의 사일런싱 억제를 일으켰다. 포티바이러스와 같은 일부 바이러스는 어린 잎 및 노후한 잎 중에서 억제하였다. 기타의 바이러스는 CMV와 같이 어린 잎에만 영향을 미쳤다. 또한 조직 특이성에 다양성이 있어서, ACMV, NMV, NVX, VMV 및 PVX-P1는 모든 조직에 영향을 미치는 반면 TBSV, TMV 및 CPMV는 엽맥 주위 또는 엽맥 내에 있는 조직에서 특이적으로 사일런싱을 억제하였다. 이러한 엽맥 주변에서 작용하는 사일런싱 억제의 표현형은 이전에는 나타나지 않았다. TMV, TBSV 및 CPMV는 단지 엽맥 주위 또는 엽맥 내에서 PTGS를 억제할 수 있지만, 그럼에도 불구하고 이들은 감염된 잎 전체에 높은 농도로 축적될 수 있다는 점이 흥미롭다. 따라서 PTGS의 억제가 병원성을 향상시키고 RMD의 효과를 방해하기 위하여 바이러스에 의하여 채택된 유일한 방법이 아니라는 것이 분명하다.

접목 실험 및/또는 PVX의 이동 장애 형태에 기초한 제2 (전신의) PTGS 억제 분석에 있어서, PTGS의 전신의 시그널링은 단지 25kDa 바이러스 이동 단백질 (p25)이 변형되거나 제거되었을 때 PVX에 대하여 관찰된다.

p25에 대한 신규한 역할 이외에, 적어도 PTGS의 3개의 신규한 바이러스 단백질 억제제가 특이적으로 분리되었다(ACMV AC2, RYMV P1 및 TBSV 19K 단백질). 이들 바이러스는 전술된 포티바이러스와 밀접한 관계가 없다. ACMV는 DNA 제미니바이러스이다(26, 27). RYMV는 소베모바이러스이고, TBSV는 톰버스바이러스이다.

유전자 사일런싱의 바이러스 억제제는 매우 다양한 것으로 보이며, 이들 단백질의 공통적인 구조적 특징이 확인되지 않았다는 것이 흥미롭다. 따라서 억제제의 기능은 RMD의 효능을 방해하는 방법으로서 여러 시간을 독립적으로 진화해온 것으로 보인다.

본 발명의 구체적인 양상에 대하여 더 자세히 논의할 것이다.

정의

" 이종성" 이라는 용어는 이하에서 문제의 유전자/뉴클레오티드 서열을 유전자 조작을 사용하여, 즉 인간의 조정에 의하여 문제의 세포(예를 들어 식물 또는 이의 선조 세포)로 도입하는 것을 가리키는데 널리 사용한다. 이종성 유전자는 대응하는 내생 유전자, 즉 동일한 또는 유사한 기능을 정상적으로 수행하는 유전자를 대신할 수도 있으며, 또는 삽입 유전자가 내생 유전자 또는 기타의 서열에 추가될 수도 있다. 세포에 대하여 이종성인 핵산은 상기 종류, 변종 또는 종들(species)의 세포에서 비자연으로 발생할 수도 있다. 그러므로, 이종성 핵산은 상이한 유형의 식물 세포 또는 식물의 종이나 변종의 환경 내에 위치한 특정 종류의 식물 세포 또는 식물의 종이나 변종의 암호화 서열 또는 이들로부터 유래한 암호화 서열을 포함할 수 있다. 핵산 서열은 그것 또는 상동하는 것이 자연적으로 발견되는 세포 내에 위치할 수도 있으나, 여기서 핵산 서열은 발현의 조절을 위하여 프로모터 서열과 같은 하나 또는 그 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 것과 같이 상기 종류 또는 식물의 종들이나 변종의 세포(들) 내에서 자연적으로 발생하지 않는 핵산에 연결되어 있고/거나 인접해 있다.

" 유전자" 라는 용어는 문맥상 다른 의미를 필요로 하지 않는다면, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로의 번역을 위한 임의의 핵산 암호화 유전자 정보를 말한다.

" 벡터" 는 특히 스스로 전염 또는 이동이 가능하거나 가능하지 않은 이중 가닥 또는 단일 가닥 선형 또는 원형의 임의의 플라스미드, 코스미드, 파지, 바이러스 또는 아그로박테리움 바이너리 벡터를 포함하는 것으로 정의되며, 이들은 세포 게놈에 삽입되어 원핵 또는 진핵 숙주를 형질전환시키거나 크로모좀 외부에 존재할 수 있다(예를 들어 복제 기점을 가지는 자가 복제 플라스미드). 특별히, 방선균 및 관련 종들, 박테리아 및 진핵 생물로부터 선택될 수 있는 2종의 상이한 숙주 유기체(예, 고등 식물, 포유류, 효모 또는 진균 세포)에서 천연적으로 또는 고안에 의하여 복제를 할 수 있는 DNA 운송 수단을 의미하는 셔틀 벡터(shuttle vector)가 포함된다. 본 발명에 따르는 벡터는, 특히 상기 벡터가 게놈 내에서의 재조합을 위하여 핵산을 세포내로 도입하기 위하여 이용되는 경우에는 프로모터 또는 기타의 조절 서열을 포함할 것을 요하지 않다.

" 발현 벡터" 는 핵산이 미생물 또는 식물 세포와 같은 숙주 세포 내에서의 전사를 위하여 적절한 프로모터 또는 기타 조절 인자의 조절하에 있고 이들과 작동가능하게 연결되는 벡터를 말한다. 상기 벡터는 다수의 숙주에서 작용하는 2 작용성 발현 벡터일 수 있다. 게놈 또는 서브게놈 DNA의 경우에 있어서, 이것은 자체의 프로모터 또는 기타의 조절 인자를 포함할 수 있으며 cDNA의 경우에 이것은 숙주 세포에서 발현하기 위하여 적절한 프로모터 또는 기타의 조절 인자의 조절하에 있을 수 있다.

" 프로모터" 는 하류(즉 이중 가닥 DNA의 센스 가닥상의 3' 방향)에 작동가능하게 연결된 DNA의 전사가 개시될 수 있도록 하는 뉴클레오티드의 서열이다.

" 작동가능하게 연결된" 은 프로모터로부터 개시되는 전사를 위하여 적절하게 위치하고 배향된 동일한 핵산 분자의 일부로 결합되는 것을 의미한다.

프로모터에 적용되는 것과 같은 " 유도" 라는 용어는 본 기술 분야의 숙련자에 의하여 잘 이해된다. 본질적으로, 유도 프로모터의 조절하에서의 발현은 " 켜지거나" 또는 적용된 자극에 대한 반응이 증가한다. 자극의 성질은 프로모터마다 다양하다. 몇 개의 유도 프로모터는 적절한 자극의 부재하에서 거의 없거나 검출할 수 없는 발현 수준(또는 발현이 일어나지 않음)을 일으킨다. 기타의 유도 프로모터는 자극의 부재하에서 검출가능한 항상 발현(constitutive expression)을 일으킨다. 자극의 부재하에서 발현 수준이 얼마일지라도, 임의의 유도 프로모터로부터의 발현은 정확한 자극의 존재하에서 증가한다.

억제제의 사용

본 발명의 제1 양상에 있어서, PVX; TMV; TBSV; RYMV; ACMV; NMV; NVX; VMV 및 CPMV에서 선택된 바이러스로부터 얻을 수 있는 유전자의 사일런싱 억제제 단백질의 용도가 기재되어 있다.

본 명세서의 문맥에서 '억제한다'는 용어는 PTGS가 모두 무효로 될 필요성을 의미하지 않는다. 이 억제는 예를 들어 국소화되거나(예를 들어 엽맥내 및 엽맥 주위에 한정됨) 일시적인(예를 들어 존재하는 사일런싱보다는 PTGS의 개시를 억제함) 또는 강도(즉 PTGS가 감소된 수준으로 지속됨)의 점에서 부분적일 수 있다. 본 기술분야의 당업자들이 이 용어를 잘 이해하고 있기 때문에 편의상 본 명세서에서 이 용어를 사용한다.

억제는 또한 PTGS의 전신의 시그널의 특성을 가질 수 있어 PTGS의 확산이 억제될 수 있다. 이것은 p25 또는 이의 변종을 사용하여 달성될 수 있다.

억제제는 ACMV AC2 단백질, PVX p25 단백질, RYMV P1 단백질 또는 TBSV 19k 단백질 또는 이들의 변종으로부터 선택되는 것이 좋다. 그것은 19k 또는 p25 단백질 또는 둘 중 하나의 변종인 것이 더 좋다. 그것은 19k 단백질 또는 이의 변종인 것이 가장 좋다.

특히 P1 단백질은 단자엽 식물 및 쌍자엽 식물 모두에서 작용하는 것으로 밝혀져 왔다. 이것은 P1이 단지 단자엽 식물(예를 들어 밀, 벼 및 보리)에만 영향을 미치는 바이러스와 관련되어 있기 때문에 놀랍다. P1의 다능성은 특히 광범위한 식물 유형에서 발현을 증가시키는데 적절하다.

p25, AC2, P1 및 19K 단백질의 서열은 다음과 같이 기재되어 있다.

p25 서열은 휘스만(Huisman) 등의 문헌[(1988) J Gen Virol, Vol. 69 pp 1789-1798)에 기재되어 있다.

AC2 서열은 스탠리 제이(Stanley J)의 문헌[(1983) Nature, vol. 361 No 5897 pp 260-262]에 기재되어 있다.

P1 서열은 본뉴 씨(Bonneau C) 등의 문헌[(1998) Virology 244, pp 79-86]에 기재되어 있다.

19K 서열은 스콜토프트 에이치(Scholtoft H) 등의 문헌[(1995) Plant Cell 7, pp 1157-1172]에 기재되어 있다.

이들 서열 모두는 특별히 본 명세서에 참고로 포함된다.

억제제가 본 명세서에서 예를 들어 핵산의 구조 내에서 사용되는 경우, 이 구조는 자연적인 억제제(예를 들어 억제제가 바이러스로부터 유도되는 경우 바이러스 단백질)와 관련된 기타 서열 또는 단백질과 유리되어 있거나 실질적으로 유리되어 있을 수 있다.

본 발명은 또한 임의의 이들 서열의 변종을 사용하는 것을 포함한다. 변종 단백질은 전술한 서열의 일부 또는 전부와 동일하거나 상동성을 공유하여 PTGS를 억제하게 되며 이의 활성은 본 명세서에 기재된 방법 또는 참고된 다른 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 이들 방법은 천연 단백질 또는 참고 단백질의 PTGS-억제 효과를 변종의 효과 및 대조구(실시예에서 대조구는 'm'으로 기재됨)와 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

일반적으로, 본 명세서에서 상기 용어가 사용되는 경우 변종은 다음과 같다:

(ⅰ) 관련 억제제와 상동성이 있는 천연 변종으로서, 예를 들어 상이한 바이러스 종으로부터 얻을 수 있거나 상기에서 사용된 것들로 분리되거나, 관련된 바이러스로부터 장래에 분리될 수 있다. 식물 또는 동물로부터 얻은 억제제에 관하여 사용되는 경우 그것은 또한 대립유전자, 파라로그(paralogues), 오르톨로그(orthologues)를 포함한다.

(ⅱ) 인위적으로 생성된 상동성이 있는 변종(유도체)으로서 이는 본 명세서의 관점에서 숙련자에 의하여 예를 들어 지정 부위 돌연변이 또는 무작위 돌연변이에 의하여 또는 직접 합성에 의하여 제조될 수 있다. 변종 폴리펩티드를 암호화하는 변종 핵산은 전술한 억제제 중의 하나를 암호화하는 본래 핵산으로부터 직접 또는 간접적으로(예를 들어 하나 또는 그 이상의 증폭 또는 복제 단계를 거침) 생성된다. 핵산 서열에 대한 변화는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드 첨가, 삽입, 삭제 또는 치환의 방법에 의하여 유도체를 생산하여 암호화된 폴리펩티드에서 하나 이상의 아미노산의 첨가, 삽입, 삭제 또는 치환을 일으킬 수 있다. 원하는 돌연변이는 암호화된 폴리펩티드의 안정성 또는 활성(예를 들어 특이성)을 변화시키기 위한 무작위 돌연변이 또는 지정부위 돌연변이일 수 있다. 변화는 보존적(conservative) 변형 방법, 즉 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌과 같은 소수성 잔기를 다른 것으로 치환하거나, 하나의 극성 잔기를 다른 것으로 치환하는 방법, 예를 들어 아르기닌을 리신으로, 글루탐산을 아스파트산으로, 또는 글루타민을 아스파라진으로 치환하는 방법에 의할 수 있다. 또한 비보전적인 치환을 하는 변종도 포함된다. 펩티드 구조 또는 활성을 결정하는데 중요한 영역에서의 이들 변화는 폴리펩티드에 대하여 이로운 특성, 예를 들어 변화된 안정성 또는 특이성을 부여할 수 있다. 특히 PTGS-억제 활성을 유지하는 억제제의 단편이 포함된다.

변종의 경우에 유사성 또는 상동성은 FASTA 및 FASTP를 사용하여 이루어지는 서열 비교를 통하여 확인되는 것이 좋다(Pearson & Lipman, 1988. Methods in Enzymology 183: 63-98 참고). 디폴트 메트릭스를 사용하여 매개변수를 다음과 같이 정하는 것이 좋다:

Gapopen(하나의 틈에서 제1 잔기에 대한 패널티): 단백질에 대하여 -12 / DNA에 대하여 -16

Papext(하나의 틈에서 추가 잔기에 대한 패널티): 단백질에 대하여 -2 / DNA에 대하여 -4

KTUP 워드 길이: 단백질에 대하여 2 / DNA에 대하여 6

상동성은 뉴클레오티드 서열 및/또는 암호화된 아미노산 서열 수준에서 있을 수 있다. 핵산 및/또는 아미노산 서열은 적어도 약 75% 또는 80%의 일치성을 공유하는 것이 좋으며, 적어도 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 일치성을 공유하는 것이 가장 좋다.

상동성은 또한 프로빙(probing) 방법의 사용에 의하여 측정될 수 있다(Sambrook 등., 1989). 특정한 서열 상동성이 있는 핵산 분자간의 하이브리드를 이루기 위하여 필요한 스트린전시 조건(stringency condition)을 계산하는 하나의 일반적인 공식은 다음과 같다: T_m = 81.5℃ + 16.6Log [Na+] + 0.41 (% G+C) - 0.63 (% 포름아미드) - 600/중복 부위의 염기 수. 위 공식의 예로서 [Na+] = [0.368] 및 50 - % 포름아미드를 사용하여 GC 함량이 42%이고 평균 프로브(probe) 크기가 200개의 염기인 경우, T_m은 57℃이다. DNA 이중 가닥의 T_m은 상동성이 1% 감소할 때마다 1 - 1.5℃까지 감소한다. 따라서, 약 75% 보다 더 큰 서열 일치성을 갖는 표적은 42℃의 하이브리드화 온도를 사용하여 관찰될 것이다.

따라서 본 발명의 이러한 양상은 특히 p25, AC2, P1 또는 19K 단백질, 또는 이들의 임의의 유도체의 사용을 포함한다.

일반적으로, 억제제는 조상 바이러스로부터의 감염 또는 적당한 핵산 구조(예를 들어 cDNA, RNA, 게놈 DNA 등)로부터의 발현에 의한 본 발명의 방법에서 사용될 수 있으며, 이는 이하에서 더 자세히 설명할 것이다. 다른 언급이 없는 한, DNA 서열이 특정되어 있다면 T 대신에 U가 치환된 RNA 등가물의 사용이 포함된다. 본 발명에 따르는 억제제를 암호화하는 핵산은 분리된 형태 및/또는 정제된 형태, 예를 들어 원래 바이러스 종의 기타 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산과 유리된 또는 실질적으로 유리된 형태로 이용될 수 있다. 사용되는 핵산 분자는 전부 또는 부분적으로 합성물일 수 있다. 특히 이들은 자연에서는 함께 발견되지 않는(인접하여 이어지지 않는) 핵산 서열을 연결시키거나 예를 들어 억제제와 발현시키고자 하는 이종 서열을 인공적으로 혼합시켜 재조합될 수 있다.

식물에서의 사용

후술되는 바와 같이, 다양한 양상에서, 본 발명은 본 발명에 의하여 처음으로 확인된 억제제 또는 특정한 경우에 종래 기술분야의 억제제를 암호화하는 핵산을 사용하여 식물에서 일반적으로 사용될 것이다.

식물에서 널리 성공적으로 사용된 종래의 특정한 방법 및 벡터들이 구에리뉴(Guerineau) 및 물리눅스(Mullineaux)의 문헌[(1993)Plant transformation and expression vectors. In: Plant Molecular Biology Labfax(Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148]에 기재되어 있다. 적절한 벡터는 식물 바이러스에서 유래한 벡터를 포함할 수 있다(참고예, EP-A-194809).

식물에서 작용하는 적절한 프로모터에는 콜리플라워 모자이크 바이러스 35S(CaMV 35S)가 있다. 기타의 예는 린드세이 및 존스의 문헌[(1989) " Plant Biotechnology in Agriculture" Pub. OU Press, Milton Keynes, UK]에 기재되어 있다. 발달 및/또는 발현의 조직 특이적 조절 통제를 부여하는 하나 또는 그 이상의 서열 모티프 또는 인자를 포함하는 프로모터가 선택될 수 있다. 식물의 유도 프로모터는 카딕크(Caddick) 등의 문헌[(1998) Nature Biotechnology 16: 177-180]의 에탄올에 의해 유도된 프로모터를 포함한다.

원하는 경우, 선택가능한 유전자 마커가 상기 구성에 포함될 수 있으며, 예로는 항생제 또는 제초제(예를 들어 카나마이신, 히그로마이신, 포스피노트리신, 클로르술푸론, 메토트렉세이트, 젠타마이신, 스펙티노마이신, 이미다졸리논 및 글리포세이트)에 대한 저항성과 같은 선택가능한 표현형을 부여하는 것들이 있다.

또한, 본 발명은 적절한 억제제 및 이종성 서열을 포함하는 이들 구조를 식물 세포내로의 도입하는 단계 및 효율적인 외인적 유도 인자와 같은 적절한 자극의 적용에 의하여 식물 세포 내에서 구조의 발현을 유도하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

핵산은 임의의 적절한 기법을 사용하여 식물 세포 내로 도입될 수 있으며, 적절한 기법의 예로는 아그로박테리움에 의해 운반되는 무력한(disarmed) Ti플라스미드를 사용하여 그의 본래 유전자를 운반하는 능력을 이용하는 기법(EP-A-270355, EP-A-0116718, NAR 12(22) 8711 - 87215 1984), 입자 총 또는 마이크로프로젝타일 총(microprojectile bombardment)(US 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616), 미소주입(mmicroinjection)(WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green et al. (1987) Plant Tissue and Cell Culture, Academic Press), 전기천공(electroporation)(EP 290395, WO 8706614 Gelvin Debeyser), 기타 DNA의 직접 흡수 형태(DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), 리포솜 매개 DNA 흡수(예를 들어, Freeman et al. Plant Cell Physiol. 29: 1353 (1984)), 또는 보텍싱(vortexing) 방법(예를 들어 Kindle, PNAS U.S.A. 87: 1228 (1990d)가 있으며, 식물 세포의 형질 전환을 위한 물리적 방법은 오어드(Oard)의 문헌[1991, Biotech. Adv. 9: 1-11]에 기재되어 있다.

Ti-플라스미드, 특히 바이너리 벡터는 더 자세히 후술된다.

아그로박테리움 형질전환은 쌍떡잎 식물종을 형질전환 시키기 위하여 본 기술분야의 숙련자들에 의해 널리 사용된다. 그러나 대부분의 경제적으로 관련된 단자엽 식물에서는 안정하고 번식력 있는 유전자 이식 식물의 일반적인 생성에서 상당한 성과가 있었다(Hiei et al. (1994) The Plant Journal 6, 271-282 참고). 마이크로프로젝타일 총, 전기 천공 및 DNA 직접 흡수는 아그로박테리움 단독으로는 효과가 없거나 비효율적인 경우에 좋다. 이 외에, 상이한 기법들의 조합은 형질전환 과정의 효율을 높이기 위하여 이용될 수 있으며, 예를 들어 아그로박테리움으로 피복된 미소입자를 갖는 총(EP-A-486234)의 사용 또는 상처를 유도하기 위하여 마이크로프로젝타일 총을 이용한 후 아그로박테리움과 함께 배양하는 방법(EP-A-486233)이 있다.

형질 전환 기법의 구체적인 선택은 특정 식물종을 형질 전환시키는 효율 뿐만 아니라 특정한 방법을 선택하여 본 발명을 실험하는 개인의 경험 및 선호도에 의하여 결정된다. 핵산을 식물 세포 내로 도입하기 위한 구체적인 형질 전환 시스템의 선택은 본 발명에 본질적이거나 본 발명의 제한이 되지 않으며, 또한 식물 재생산을 위한 기법의 선택도 마찬가지라는 것은 숙련자에게 자명할 것이다.

또한 본 발명의 다양한 양상은 후술하는 바와 같은 억제제에 기초한 구조를 식물 조직(예를 들어 식물 세포)으로 도입하는 단계 및 벡터와 식물 세포 게놈 사이에서 재조합을 일으키거나 허용하여 본 발명에 따르는 핵산을 게놈으로 도입하는 단계를 포함하는 식물 세포의 형질 전환 방법을 제공한다.

이것은 일시적인 발현을 일으키기 위하여 수행될 수 있다.

또한, 식물 조직의 형질 전환 이후에 예를 들어 본 기술 분야의 표준으로서 단일의 세포, 유합 조직 또는 잎 디스크(disc)로부터 식물은 재생산될 수 있다. 대부분의 임의의 식물은 식물의 세포, 조직 및 기관으로부터 완전히 재생산될 수 있다. 이용 가능한 기법은 바실(Vasil) 등의 문헌[Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ, Laboratory Procedures and Their Application, Academic Press, 1984] 및 웨이스바크의 문헌[Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989]이 참고된다.

번식 가능한 유전자 이식 식물의 생산은 곡물 벼, 옥수수, 밀, 귀리 및 보리에서 이루어져 왔다(참고: Shimamoto, K. (1994) Current Opinion in Biotechnology 5, 158-162.; Vasil, et al. (1992) Bio/Technology 10, 667-674; Vain et al., 1995, Biotechnology Advances 13 (4): 653-671; Vasil, 1996, Nature Biotechnology 14 page 702).

재생산된 식물 또는 이들의 일부분은 클론, 종자, 셀페드(selfed) 또는 하이브리드 자손 및 후손(예를 들어 F1 및 F2 후손), 커팅(cutting)(예를 들어 식용 부위) 등을 제공하는데 이용될 수 있다.

포유류에서의 사용

억제제는 바이러스 벡터 또는 유전자 요법에서 사용되는 기타의 벡터의 활성을 증가시키기 위하여 사용될 수 있다(참고: evidence of RNA interference in mouse embryos, Wianny F et al (2000) Nature Cell Biology 2 pp70-75). 이들 벡터는 본 기술 분야의 숙련자에게 공지된 임의의 적절한 벡터에 기초할 수 있다. 예로는 유럽 특허 출원 90905 2736.3호(VICAL)의 명세서가 있다. 공지된 바이러스 벡터에는 HSV, 벡시니아(vaccina) 또는 아데노바이러스(adenovirus)가 있다(참고: Principles of Gene Manipulation(1994) 5th Edit. Old and Primrose 5th Edition, Blackwell Scientific Publications). 또한 유전자 요법에서 사용하기 위한 바이러스 벡터는 빌(Vile)의 문헌[(1997) Nature Biotechnology 15: 840-841]에서 논의되고 있다. 비바이러스 유전자 요법의 접근은 세베스티안(Sebestyen) 등의 문헌[(1998) Nature Biotechnology 16: 80-85]에서 논의되고 있다.

다양한 유전자 요법 운반 시스템(HSV VP22 포함함)의 사용은 페르난데즈(Fernandez) 및 베일레이(Baylay)의 문헌[(1998) Nature Biotechnology 16: 418-420] 및 본 명세서의 참고문에서 논의되고 있다.

양호한 형태에 있어서, 상기 억제제는 핵산의 트랜스펙션 또는 리포펙션의 방법과 함께 사용될 수 있다(참고예: Wiggler M, et al. 1977 Cell 11, 223-232; Ruyssaert J M, et al 1994 Biochem Biophys Res Comm 203, 1622-1628; Biochem Biophys Res Comm 236. 126-129).

상이한 PTGS 환경

본 발명은 명확한 PTGS의 원인과 관계없이 PTGS를 억제시키고자 하는 임의의 환경에 적용될 수 있다. 전술된 바와 같이, 전사 후 유전자 사일런싱(PTGS)은 세포 mRNA 및 바이러스 mRNA 모두를 표적화할 수 있는 뉴클레오티드 서열 특이적 방어 메커니즘이다. PTGS는 안정하게 또는 일시적으로 외래(이종성) 또는 내생 DNA로 형질전환된 식물 및 진균에서 일어나며, 도입된 핵산과 서열 유사성을 가지는 RNA 분자의 축적을 감소시킨다(Vaucheret, et al., Plant J. 16, 651-659(1998); C. Cogoni and, G. Macino, Trends Plant Sci. 2, 438-443(1997)).

특이적 PTGS의 예로는 다음과 같은 것이 있다: 유전자의 추가 복제물의 사용에 의한 내생 유전자의 사일런싱(공억제 - 참고예: van der Krol et al., (1990) The Plant Cell 2, 291-299; Napoli et al., (1990) The Plant Cell 2, 279-289; Zhang et al., (1992) The Plant Cell 4, 1575-1588, 및 US-A-5,231,020); 상동성있는 유전자의 삽입에 의한 내생 유전자의 사일런싱; 세포질에서 복제하는 구조의 사용으로부터 발생하는 사일런싱(WO95/34668 (Biosource); Angell & Baulcombe(1997) The EMBO Journal 16, 12:3675-3684); 세포질 내의 상동성 있는 핵산의 일시적인 존재로부터 발생하는 내생 유전자 또는 이식 유전자의 전신의 사일런싱(and Voinnet & Baulcombe (1997) Nature 389: pg 553), 이식 유전자의 '자가 사일런싱'; 바이러스에 의해 유도된 RMD; 이식 유전자에 의해 매개된 상동성 의존 바이러스 저항성 등.

PTGS와 관련된 짧은 RNA 종(25nt 주변이며 약 21-23nt RNA가 더 좋음)을 모니터링함으로써, 또는 mRNA 및/또는 발현된 단백질을 모니터링함으로써(노던 블롯 또는 웨스턴 블롯) PTGS의 존재가 평가될 수 있다.

발현 증가

양호한 실시 상태에 있어서, 상기 억제제는 세포 내, 특히 식물 세포 내의 이종성 또는 내생 핵산의 발현, 특히 번역의 수준을 증가시키기 위하여 사용된다. 예를 들면, 발현은 적어도 약 25-50%, 바람직하게는 약 50-100%, 또는 그 이상까지 증가될 수 있다. PTGS가 특히 심한 특정의 양호한 실시 상태에 있어서, 발현은 적어도 5, 10, 15, 20, 25 또는 50배 증가될 수 있었다.

또한 본 발명은 전술한 본 발명의 억제제를 이용하여 PTGS를 억제하여 세포 중의 이종성 또는 내생 핵산(이종성 또는 내생 폴리펩티드를 생성함)의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

본 발명의 숙련자들은 본 명세서의 정보 및 실시예에 기재된 일시적인 분석법을 이용하여 PTGS 경로의 다양한 억제제가 상승적으로 작용할 수 있음을 평가할 수 있을 것이다. 본 명세서의 억제제의 추가 사용은 이들과 상호작용하는 세포 내 인자들의 분석하여, 통상적인 돌연변이에 의하여 접근할 수 없었던 PTGS의 성분을 동정할 수 있을 것이다.

증가시킬 유전자의 선택

흥미로운 유전자에는 작물의 특성, 곤충 저항성, 질병 저항성, 제초제 저항성, 중성(中性), 곡물의 특성 및 이와 유사한 것을 암호화하는 것들이 있다. 상기 유전자는 오일, 녹말, 탄수화물, 영양물 등의 대사와 관련될 수 있다. 흥미로운 유전

자 또는 특성에는 환경 또는 스트레스 관련 특성, 질병 관련 특성 및 작물의 효율에 영향을 미치는 특성이 있으나, 이에만 한정되는 것은 아니다. 또한 표적 서열에는 단백질, 펩티드, 지방산, 지질, 밀랍, 오일, 전분, 당, 탄수화물, 맛, 냄새, 독성, 카로티노이드, 호르몬, 중합체, 플라보노이드, 저장 단백질, 페놀산, 알칼로이드, 리그닌, 탄닌, 셀룰로즈, 당단백질, 당지질 등의 합성을 담당하는 유전자가 있다.

단자엽 및/또는 쌍자엽 식물에서 표적화된 내생 유전자는 피마자, 해바라기, 대두 및 옥수수와 같은 식물에서는 오일 생산을 담당하는 효소, 감자, 옥수수, 곡물과 같은 식물에서는 전분 합성에 관여하는 효소, 약학적 또는 수의학적 산물과 같은 천연 약제를 합성하거나 그 자체가 천연 약제가 될 수 있는 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 것이 가장 좋다.

이종성 핵산은 특히 박테리아, 진균, 식물 또는 동물의 본래 유전자를 암호화할 수 있다. 폴리펩티드는 식물에서 사용될 수 있으며(식물의 특성, 예를 들어 해충 감수성, 생장력, 조직 분화, 번식력, 영양적 가치 등을 변형시킴) 또한 식물은 다른 곳에서 사용하기 위하여 그것으로부터 정제될 수 있는 폴리펩티드를 생성하기 위한 매개 물질일 수 있다. 이들 단백질에는 레티노블라스토마 단백질, p53, 안지오스타틴 및 렙틴이 있으나, 이에만 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 방법은 포유류의 조절 단백질을 생산하기 위하여 이용될 수 있다. 기타의 흥미로운 서열에는 단백질, 호르몬, 성장 인자, 사이토카인, 혈청 알부민, 헤모글로빈, 콜라겐 등이 있다.

표적 유전자의 발현

일반적으로, 이종성 핵산은 본 기술 분야에서 사용되는 임의의 적절한 과정에 의하여 발현될 수 있다. 예를 들면, 발현-암플리콘(전술됨) 이외에 이들은 하기와 같이 전사되거나 발현될 수 있다:

(ⅰ) 예를 들어 이종성 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 '노출된(naked)' DNA의 일시적인 발현.

(ⅱ) 발현 벡터, 특히 복제 벡터로부터의 발현. 일반적으로, 본 기술 분야의 숙련자들은 재조합 유전자 발현을 위한 벡터를 구성하고 실험계획을 고안하는 것을 잘 할 수 있다. 적절한 조절 서열, 예를 들면 프로모터 서열, 터미네이터 단편, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자 및 기타의 적절한 서열을 함유하는 적절한 벡터는 선택되거나 구성될 수 있다. 더 자세한 이해를 위하여 다음을 참고할 수 있다: Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press or Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. 바이러스 발현 벡터(후술함)가 특히 좋을 수 있다.

(ⅲ) 세포질 내에서 적어도 일시적으로 존재하는 융합(integrating) 벡터(예를 들어 바이너리 벡터)로부터의 발현.

(ⅳ) 유기체, 특히 식물의 게놈 내로 안정하게 혼입된 이식 유전자로부터의 발현.

이들 카테고리는 서로 배제하지 않는 것으로 이해되며, 예를 들어 온전한 벡터는 또한 발현 벡터 등이 될 수도 있다.

이들 발현을 달성하기 위한 방법은 본 명세서의 다른 부분에서 논의된다.

억제제의 사용을 위한 포맷

일반적으로, 억제제는 이종성 또는 내생 핵산의 발현을 다음과 같은 포맷으로 증가시키기 위하여 사용될 수 있다.

(ⅰ) 억제제를 암호화하는 자손 바이러스로부터의 감염에 의한 억제제의 발현,

(ii) 재조합 발현 벡터, 특히 복제 벡터로부터의 발현.

(iii) 유기체 내로 도입된 융합 벡터(예를 들어 바이너리 벡터)로부터의 발현.

(iv) 유기체, 특히 식물의 게놈으로 안전하게 혼입된 이식 유전자로부터의 발현(예를 들어, 유전자 이식 식물에서 항상 발현됨).

바이러스 벡터 및 자손 바이러스에 대하여, 상기 억제제는 자손 바이러스가 본래 감염성이거나 본래 감염성이 아닌 식물에서 PTGS를 억제하기 위하여 사용될 수 있다.

또한, 이들은 '본래의 숙주'가 아닌 식물이나 기타 유기체에서 사용될 수 있다.

특정한 바이러스성 발현 억제제는 하기의 실시예 중의 어떤 것에서 이용되는 PVX에 기초한 발현 벡터와 같이 특히 효율적인 것으로 밝혀졌다. 기타 바이러스 벡터는 미국 특허 5,316,931호 및 5,589,367호(Donsen 등), 타카마츠 등의 문헌[(1990) FEBS Lett 269: 73-76], 하마모토의 문헌[(1993) Bio/Technology 11: 930-932], 구마가그 등의 문헌[(1993) Proc Natl Acad Sci USA 90: 427-430]에서 논의되고 있다.

억제제의 발현은 (적절한) 각각의 경우에 이종성 또는 내생 핵산의 발현보다 먼저, 동시에 또는 후에 일어나고, 단 각각의 경우에 억제제는 PTGS를 억제함으로써 발현을 증가시키는 효과가 있으며, 여기서 그렇지 않으면 PTGS는 억제제의 부재 하에서 더 높은 수준으로 발생한다. " 관련하여" 라는 용어는 모든 이들 가능성을 포함한다.

억제제의 다수의 복제물이 사용될 수 있다. 적어도 하나가 본 발명의 억제제라는 조건하에 상이한 억제제가 함께(예를 들어 앞뒤 일렬로(tandem)) 사용될 수 있다.

억제제는 이들의 활성이 조절될 수 있도록 유도성 프로모터dp 작용가능하게 연결될 수 있다.

발현 증가를 위한 양호한 포맷 및 조합

P25 및 바이러스의 감수성

후술하는 실시예에서 논의하는 바와 같이, 특정한 억제제(예를 들어 PVX p25)는 PTGS 경로의 한 가지 양상에 특이적으로 작용할 수 있다. 이것은 그들이 바이러스에 기초한 구조(상이한 경로를 통하여 PTGS를 개시할 수 있음)를 복제함으로부터 발현되는 유전자보다는 삽입되어 임의로 안정된 이식 유전자의 발현을 증가시키기에 더 적절할 수 있다는 것을 의미한다. 본 명세서의 관점에서, 본 기술 분야의 숙련자는 그들의 필요에 따라 적절한 포맷으로 적절한 억제제를 이용할 수 있을 것이다.

따라서 본 발명의 양호한 양상에 있어서, 식물의 게놈에 혼입된 이종성 또는 내생 핵산의 발현(특히 번역)을 특이적으로 증가시키는 p25(또는 이의 변종)의 용도를 기재하고 있으며, 여기서 상기 식물 중의 바이러스에 의해 유도된 국소적인 유전자 사일런싱은 실제적으로 상기 증가에 의하여 영향을 받지 않는다(따라서 바이러스 저항성은 사일런싱 억제에 의하여 동등하게 절충되지 않는다).

식물 중의 바이러스 저항성 및/또는 바이러스에 의하여 유도된 유전자 사일런싱 증가의 효과는 본 기술분야의 숙련자에 의하여 p25가 존재하지 않는 대조구 식물(또는 식물군)과의 비교에 의하여 쉽게 확인될 수 있다. 접종 이후의 심각한 바이러스 감염은 각각의 경우에 하기 실시예에서 논의되는 것과 유사한 통상의 방법을 사용하여 평가되고 기록될 수 있다. 본 발명의 이러한 양상에 있어서, 식물 중의 바이러스 반응인 약간의 손상이 식물에서 임의의 전신의 사일런싱 시그널을 방해한 결과로 일어날 수 있다. 그러나 전체적인 효과는 억제제가 국부적 및 전신적 사일런싱의 억제를 일으키는 경우보다 덜 심각할 수 있다.

암플리콘

본 발명의 억제제의 조합 및 사일런싱 시스템(Plant Bioscience Limited의 WO99/15682에 기재되어 있음) 또는 좀 더 바람직하게는 '암플리콘' 시스템(Plant Bioscience Limited의 WO98/36083에 기재되어 있음)은 PTGS의 부재하에서도 통상의 (비복제) 이식 유전자로부터 이루어질 수 있는 것들보다 훨씬 더 높은 수준의 발현을 생성하는 데 이용될 수 있다.

WO98/36083에 기재된 바와 같이, '암플리콘'은 바이러스 복제 효소에 작용가능하게 연결된 프로모터, 또는 전사 후 식물 세포의 세포질에서 RNA 분자에 복제하는 능력을 부여하는 식물 바이러스 서열을 포함하는 RNA 분자의 식물세포 내에서의 전사를 위하여 DNA에 작동가능하게 연결되어 있는 프로모터 서열을 포함한다. 전사물은 이들이 바이러스 RNA인 것처럼 복제하고, 흥미로운 유전자('표적 유전자')에 상응하는 표적화 서열을 포함한다. 바이러스 RNA로부터 나오는 기타 서열은 최소의 암플리콘을 산출하기 위하여 생략될 수 있다.

이들은 형질 전환 및/또는 교배에 의하여 동일한 식물의 게놈 내로 안정한 이식 유전자로서 도입될 수 있다. 또한 이들은 일시적인 발현을 위하여 농업 침투에 의하여 도입될 수 있다.

따라서, 암플리콘은 프로모터, 바이러스 게놈의 적어도 일부의 cDNA 및 표적 서열 또는 이의 보완물에 상응하는 서열을 포함하는 이식 유전자 DNA 구조를 포함할 수 있으며, 그것은 발현을 방해하기에 충분한 서열 유사성, 예를 들어 적어도 40%, 50%, 60%, 70% 및 100%이하의 서열 일치성을 공유한다.

본 발명의 환경에서, 표적 서열은 내생 또는 이종성 서열일 수 있으며, 상기 암플리콘은 암플리콘 구조의 일부분이거나 그렇지 않을 수 있는 인핸서와 함께(상기 참고) 사용된다. 따라서 이종성 또는 내생 핵산의 발현을 증가시키기 위한 암플리콘의 사용은 본 발명의 한 가지 실시 상태를 형성한다.

또한, 적절한 경우 상기 억제제와 이종성 핵산이 동일한 구조, 예를 들면 (보통 전체 길이의) 이종성 핵산이 적절한 클로닝 사이트에 삽입되는 암플리콘 구조에 의하여 암호화될 수 있다.

또한, 그들은 서로에 함께 이용될 수 있는 상이한 구조에 존재할 수 있는 것이 좋다. 예를 들면, 암플리콘은 전술한 바와 같이 억제제를 암호화하는 바이너리 벡터로 함께 침투될 수 있다.

특정한 환경(예를 들어 전술한 바와 같이 표적 유전자가 발현-암플리콘으로부터 발현되는 경우)에 있어서, 상기 억제제는 바이러스 유형 구조를 복제하는 PTGS를 방해하는 것으로 선택되는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 환경에서 p25는 덜 바람직하다. p25가 사용되는 경우, 그 자체가 PTGS에 사용될 가능성을 최소화하기 위하여 세포질에서 복제하는 구조로부터 그 자체가 발현되지 않는 것이 바람직할 수 있다.

바이너리 벡터로부터 일시적인 발현의 증가

전술한 바와 같이, 본 발명자들은 PTGS의 억제제가 유기체의 세포내로 도입된(높은 수준이 바람직함), 게놈 내로(예를 들어 전위) 삽입되거나 삽입되지 않은 상태로 존재할 수 있으나 둘 중 어느 경우도 전사된 mRNA를 생산할 수 있는 구조로부터의 발현을 증가시키는데 특히 유리하게 이용될 수 있다는 것을 밝혀내었다. 특정한 메커니즘에 의하여 풍부하게 되기를 바란 것은 아니나, 억제제는 이러한 방식으로 생성된 mRNA의 분해를 억제할 수 있고 이에 의하여 이것을 매우 높은 수준으로 축적하게 할 수 있는 것으로 생각된다. 구조는 강한 프로모터와 함께 비교적 높은 수의 복제물로 도입될 수 있으며(융합된 형태 및 융합되지 않은 형태 모두에서), 구조가 게놈 내로 융합되는 안정한 변형물을 선택할 때 일어날 수 있는 본래의 완화 효과는 없다. 결과로서 생성된 단백질의 수준은 선행 기술의 방법을 사용하여 얻을 수 있는 수준을 훨씬 초과할 수 있으며, 일반적으로 단백질(일반적으로 유기체에 대하여 이종성이 될 것임)은 임의의 숙주 보호

메커니즘에 의하여 파괴될 수 있는 비율을 초과할 수 있다. 억제제의 사용은 세포내에 존재하는 표적 핵산의 복제물로부터 생성되는 mRNA의 수준 및 안정성을 향상시키는 것으로 보인다.

따라서, 본 발명의 한 가지 양상에 있어서, 프로모터에 작용가능하게 결합되어 있는 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하며 유기체의 세포내로 도입되는, 일시적으로 도입된 핵산 구조로부터의 전사에 의하여 생성된 표적 단백질을 암호화하는 mRNA의 분해를 방해하는 PTGS의 용도를 기재하고 있다.

또한, " 도입된 핵산" 은 억제제를 암호화하는 DNA와 함께 도입되는 DNA를 ⅰ) 상기 DNA 서열의 안정한 이식 유전자 발현 및/또는 ⅱ) 상기 DNA 서열을 포함하는 바이너리 벡터를 이용하는 일시적인 발현 시스템과 정상적으로 관련된 mRNA의 수준(억제제의 부재하에)과 정상적으로 관련된 mRNA의 생산 수준과 비교할 때, 상승된 수준의 대응하는 mRNA를 생성할 수 있는 구조의 형태로 제공되는 DNA 서열과 같은 표적을 포함한다.

상기 세포는 살아있는 유기체의 조직내에 존재하는 체세포인 것이 좋다. 상기 구조는 유기체의 다수의 세포내로 동시에 도입되는 것이 좋다.

본 발명의 특정한 실시 상태에 있어서, 본 명세서에 기재된 이들 용도 및 방법은 문제의 종에 적절한 임의의 억제제, 예를 들어 식물로부터의 RGF-CaM 억제제(이것은 칼모듈린과 관련된 단백질인 것으로 여겨짐)를 사용하는 식물 또는 동물인 유기체에서 사용될 수 있다. 문헌[Anandalakshmi R, et al (2000) Science 290 [5 October], 142-144)를 참고하면 이하에서의 논의가 이들과 유사하게 적용하는 것으로 이해될 수 있다. 그러나, 상기 유기체가 식물이고 상기 억제제는 전술된 것, 예를 들어 바이러스인 것이 좋다.

또한 본 발명의 양호한 양상에 있어서, 식물 중의 표적 뉴클레오티드 서열의 발현 증가를 달성하는 방법이 나타나 있으며, 이 방법은 적어도 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 핵산 서열과 적어도 전술한 본 발명의 억제제를 암호화하는 제2 핵산 서열을 식물 물질 내로 일시적으로 도입하는 단계를 포함하며, 이때 제1 핵산 및 제2 핵산은 단일의 바이너리 벡터내에 포함되거나 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열은 각각 제1 바이너리 벡터 및 제2 바이너리 벡터에 포함된다. 제1 핵산 서열은 2가지 또는 그보다 많은 표적 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 제2 핵산 서열은 2가지 또는 그보다 많은 억제제를 암호화할 수 있다.

본 기술 분야의 숙련자들에게 잘 알려져 있는 바와 같이, 바이너리 벡터 시스템은 (a) 원하는 뉴클레오티드 서열을 식물 세포 게놈내로 운반하도록 하는 경계 서열 및 (b) (ⅰ) 식물의 활성 프로모터 및 (ⅱ) 이에 작동가능하게 연결되는 표적 서열 및/또는 적절한 인핸서의 발현 카세트를 일반적으로 포함하게 되는 원하는 뉴클레오티드 서열 그 자체를 포함한다. 원하는 뉴클레오티드 서열은 경계 서열 사이에 위치하고 적절한 조건하에서 식물의 게놈내로 삽입될 수 있다. 바이너리 벡터 시스템은 융합을 일으키기 위하여 일반적으로 기타의 서열(A. tumafaciens로부터 유래함)을 요한다. 일반적으로 이것은 아그로박테리움에 의하여 매개된 일시적인 형질전환을 사용하는 소위 " 농업-침투(agro-infiltration)" 의 사용에 의하여 이루어질 수 있다. 간단히 말하면, 이 기법은 아그로박테리움 튜메파시언스(Agrobacterium tumafaciens)가 이의 DNA 일부(" T-DNA")를 숙주 세포 내로 운반하여 핵 DNA 내로 융합되도록 하는 성질에 기초한다. T-DNA는 뉴클레오티드 길이가 21-23 정도인 좌측과 우측의 경계 서열에 의하여 한정된다. 상기 침투는 예를 들어 주사(잎 내로) 또는 진공(전체 식물)에 의하여 이루어질 수 있다. 본 발명에 있어서, 경계 서열은 일반적으로 농업 침투에 의하여 식물 물질로 도입되는 하나 또는 그 이상의 벡터로 원하는 뉴클레오티드 서열(T-DNA) 주위에 포함될 것이다. 그럼에도 불구하고, 억제 효과는 T 구조가 실제로 게놈 내로 융합되지 않고 존재(비교적 많은 수의 복제물로)하는 경우에도 작동하는 것으로 여겨지고 있다. 바이너리 형질전환 벡터는 후술되는 pBin19에 기초한다(참고: Materials and Methods 및 Frisch, D. A., L. W. Harris-Haller, et al. (1995). " Complete Sequence of the binary vector Bin 19." Plant Molecular Biology 27: 405-409).

본 발명의 또 하나의 양호한 양상에 있어서, 식물 중의 표적 뉴클레오티드 서열의 발현 증가를 달성하는 방법이 나타나 있으며, 이 방법은 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하고 전술한 본 발명의 억제제를 암호화하는 바이너리 벡터인 적어도 하나의 핵산 구조를 식물 물질 내로 도입하는 단계를 포함한다. 상기 표적 유전자는 식물 물질에 대하여 내생적이거나 그렇지 않을 수 있다.

그 외의 실시 상태에 있어서, 상기 방법은 표적 뉴클레오티드를 포함하는 바이너리 벡터인 제1의 핵산 구조를 억제제를 암호화하는 바이너리 벡터인 제2 핵산 구조와 함께 사용한다. 이것은 구조 및 조작의 용이성의 측면에서 그 자체로 유리할 수 있다.

상기 방법은 2종의 바이너리 벡터를 식물(조직)로 예를 들어 농업침투, 주사 또는 진공 침투에 의하여 함께 도입하는 단계를 포함한다.

한 가지 실시 상태에 있어서, 다음의 단계를 포함하는 단백질 생산 방법을 제공한다:

(ⅰ) 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 핵산 및 전술한 본 발명의 이종성 억제제를 암호화하는 제2 핵산을 식물의 조직 내로 도입하는 단계(이때 제1 및 제2 핵산은 임의로 단일의 바이너리 벡터에 포함될 수 있음),

(ⅱ) 일정기간에 걸쳐, 핵산으로부터 억제제 및 표적 단백질의 발현을 일으키거나 허용하는 단계(이때 억제제는 표적 단백질을 암호화하는 mRNA의 분해를 억제함),

(ⅲ) 적어도, 표적 단백질이 발현된 조직을 채취하는 단계,

(ⅳ) 식물로부터 표적 단백질을 임의로 분리하는 단계.

또한, 상기 억제제는 식물의 제1 잎 군내에 접종된 이식 유전자로부터 일시적으로 발현될 수 있으며, 상기 잎들을 채취한 후에 제2 또는 그 이상의 잎 군을 적절한 일시적인 접종 시스템 내에서 이식 유전자로 접종한 후 동일한 또는 상이한 일시적인 억제제를 사용하여 식물에서 재배할 수 있다.

결과로서, 동일한 식물(유전자 이식되거나 유전자 이식되지 않은)은 적절한 잎 군을 각각 채취한 후에 다른 억제제 및/또는 다른 핵산 서열을 사용함으로써 잎 중에서 계속하여 원하는 단백질을 생산하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 다른 억제제 및/또는 동일한 식물의 다른 잎 군 중에서 다른 원하는 단백질을 암호화하는 다른 핵산 서열의 사용을 제공한다.

이식 유전자 또는 표적 유전자 또는 기타의 서열은 식물 물질에 대하여 내생적이거나 그렇지 않을 수 있다.

상기 분리는 전적으로 통상적인 방법에 의할 수 있으며, 부분적인 또는 완전한 정제를 수반하거나 수반하지 않을 수 있다. 또한 상기 단백질은 원 위치에서 사용될 수 있다.

문제의 식물 물질 또는 조직은 식물의 전체 또는 부분이 될 수 있다(예를 들어 잎 또는 몇 개의 잎들). 그것은 일반적으로 '발달한(developed)' 식물(즉 묘목, 재생산을 위한 배형성 또는 배 조직이 아님)에 존재하는 체세포를 포함하게 된다.

시간은 상기 조직이 생존가능할 때까지 또는 그 이상의 기간 또는 이것이 단백질로 포화될 때까지가 될 수 있으며, 일반적으로 약 3일 내지 10일이 좋고, 약 4일 내지 7일이 더 좋다.

각각의 경우에 단일의 서열이 좋지만, 자연적으로 하나 이상의 표적 유전자 및/또는 억제제가 상기 구조 또는 각각의 구조에서 사용될 수 있다. 다수의 바이너리 벡터(각각은 하나 또는 그 이상의 서열, 예를 들어 억제제를 포함함)는 단일의 침투에서 식물 물질내로 높은 밀도로 도입될 수 있다. 이것은 예를 들어 효소와 같은 다수의 서브유닛을 생산하는 데 유용할 수 있다.

하나의 양호한 실시 상태는 일시적으로 조직되는 방식으로 단백질의 조합을 생산하도록 하기 위하여 세포 중의 mRNA의 지속된 존재를 이용하여 한정된 서열에서 유기체 중의 단백질을 생성하는 방법을 제공하며, 이 방법은 다음의 단계를 포함한다:

(ⅰ) 각각 프로모터(임의로 유도성 프로모터)와 작용가능하게 연결된 적어도 하나의 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 2종 또는 그 이상의 핵산 및 전술한 본 발명의 이종성 억제제를 암호화하는 핵산을 식물의 조직 내로 도입하는 단계,

(ⅱ) 억제제 및 제1 표적 단백질을 암호화하는 핵산의 발현을 일으키거나 허용하는 단계,

(iii) 이어서 추가의 표적 단백질을 암호화하는 추가의 핵산의 발현을 일으키거나 허용하는 단계,

(iv) 임의로 (iii)의 단계를 반복하는 단계,

(iv) 적어도, 최종 표적 단백질이 발현된 조직을 채취하는 단계.

바람직한 단백질의 조합은 단백질(예를 들어 효소)이 경로의 초기 단백질의 생성물인 기질에 작용하는 대사 작용 경로 또는 이화 작용 경로를 형성하는 것들이다. 또한, 단백질 중의 하나는 그 자체가 또 다른 경로를 위한 기질이 될 수 있다. 각각의 경우에 있어서, (ⅱ)의 제1 표적 단백질은 (iii)의 다음의 표적 단백질에 대한 기질을 생산하기 위한 것으로 생각될 수 있다. 따라서 마지막으로 채취된 조직은 그 자체가 직접 식물에 작용하지 않는 복잡한 생성물을 함유할 수 있다.

식물 중의 안정한 이식 유전자와 같이 이들 경로의 창설은 매우 복잡하고, 다수의 유전자 이식 식물의 교배를 요할 수 있다. 특정한 단계에서 식물 조직에 다수의 활성을 부여하기 위하여 전술한 바와 같은 억제제에 의하여 증가된 구조 발현을 사용함으로써 이들 문제를 방지할 수 있다.

후술하는 실시예(특히 실시예 9)에 나타난 바와 같이, 이러한 방식으로 도입된 경우 표적 서열/억제제의 일시적인 발현은 일시적인 발현 기간(일반적으로 몇 일이 되며, 사용되는 정확한 방법 및 물질에 의존함) 과정에 걸쳐 매우 높은 수준의 표적 폴리펩티드를 생산할 수 있다. 이러한 방법을 사용함으로써, 억제제가 없는 경우보다 mRNA의 수준 및 폴리펩티드 수준은 더 오랜 기간동안 높은 수준으로 지속될 수 있다. 예를 들면, 억제제의 부재하에서 일시적으로 발현되는 GFP로부터 발생하는 형광은 3 내지 4 dpi동안 지속될 수 있으며, 그 이후에는 5-6dpi로 감소되어 점점 검출할 수 없게 된다. 본 명세서에 기재된 하나 또는 그 이상의 억제제를 사용함으로써, 이들은 15 dpi로 늘어날 수 있다. 본 명세서의 결과는 발현의 일시적인 성질이 주로 PTGS에 기인할 수 있다는 것을 제시한다. 이 효과는 표적 유전자의 PTGS와 관련된 21-23 nt RNA를 모니터함으로써 또는 mRNA 및/또는 발현된 단백질을 모니터함으로써(노던 블롯 또는 웨스턴 블롯)확인되어 왔다.

이것은 일시적인 발현을 이전에는 부적절한 것으로 생각되었던 여러 환경에서 효율적으로 유용한 도구로 만들며, 예로는 불안정한 표적 서열의 의존가능한 발현이 있다.

상기 방법은 특히 높은 수준의 발현이 필요한 적용에서는 좋을 수 있으나, 바이러스 구조(식물의 '감염'을 위하여 필요함) 또는 안정한 유전자 이식 식물의 경우에서 예를 들어 신속한 분석이 중요하거나 문제의 서열이 치사의 표현형을 부여하는 경우에는 바람직하지 않다.

전술한 구조의 조성은 본 발명의 추가의 양상을 형성한다.

신규한 억제제에 대한 분석

전술한 방법은 신규의 억제제를 확인하기 위하여 유사하게 사용될 수 있다. 따라서 본 발명의 한 가지 양상에 있어서,

유전자 사일런싱의 억제제를 확인하기 위한 방법을 나타내고 있으며, 이 방법은 리포터(reporter) 분자를 암호화하고 PTGS의 추정되는 억제제를 암호화하는 바이너리 벡터인 적어도 하나의 핵산 구조를 식물 물질 내로 도입하는 단계를 포함한다. 이 방법은 리포터 서열을 포함하는 바이너리 벡터인 제1 핵산 구조를 추정되는 억제제를 암호화하는 바이너리 벡터인 제2 핵산 구조와 함께 사용한다.

전술한 바와 같이, 본 명세서에 기재된 결과의 관점에서 억제제의 활성은 좀더 널리 효과가 있을 것이며, 또한 리포터 유전자의 발현 수준을 증가시키고 지속시킬 것이 예상된다. 또한, 이것은 직접적인 관찰 및/또는 노던 블롯팅 또는 웨스턴 블롯팅에 의하여 확인될 수 있다.

추정되는 억제제는 식물, 바이러스, 포유류 등과 같은 임의의 공급원으로부터 선택될 수 있다.

상기 리포터는 GUS, GFP, 루시페라아제 등과 같이 본 기술 분야에서 일반적으로 사용되는 마커 유전자와 같은 임의의 검출가능한 단백질일 수 있다. 리포터는 GFP 또는 루시페라아제와 같은 비침입성 마커인 것이 좋다.

본 명세서에서 논의된 모든 참고들은 본 명세서를 보충하는데 필요할 수 있으므로 이들 전부를 본 명세서의 참고로 포함시킨다.

본 발명은 이제 하기의 비제한적인 도면 및 실시예를 참고하여 더 설명될 것이다. 본 발명의 기타 실시 상태는 본 기술 분야의 숙련자에게 이들의 관점에서 발견될 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 실시예 9 및 기타의 실시예에서 사용된 바이러스 및 이식 유전자 구조를 나타낸다. PVX-GFP 및 PVX-GF는 종전에 문헌[Ruiz et al., 1998]에 기재되어 있다. PVX 벡터 내의 삽입물의 발현은 중복된 외피 단백질(CP) 프로모터에 의하여 조절된다. 복제 효소 ORF는 바이러스 RNA의 복제를 위하여 필수적이고, 25, 12 및 8 kDa 단백질 모두는 바이러스 RNA의 세포와 세포간 이동을 위하여 반드시 필요하며, CP는 바이러스 RNA을 단백질막으로 싸는 것 뿐만 아니라 세포간 및 전신의 이동을 위하여 필수적이다. 모든 기타의 바이러스 구조는 35S 프로모터 및 nos 터미네이터에 연결된 PVX-GFP 구조에 기초하였으며 pBin19 바이너리 벡터 플라스미드의 T-DNA 내로 삽입되었다. PVX-GFP-△CP는 CP ORF 전부에 걸친 결실을 운반하고, PVX-GFP-△TGB-△CP 및 PVX-GFP-△rep-△CP는 PVX-GFP-△CP에 기초하고 모든 TGB ORF에 걸친 결실 및 복제효소 ORF에서의 인프레임(in-frame) 결실을 각각 운반한다. PVX-GFP-△12k-△CP 및 PVX-GFP-△25k-△CP 구조는 결실을 각각 12kDa 및 25kDa ORF내로 운반한다. PVX-GFP-△8k-△CP은 8kDa ORF의 번역을 방해하는 격자이동 돌연변이를 운반한다. PVX-GFP-△25k$_{FS}$-△CP는 격자이동 돌연변이를 "FS"에 의하여 나타나는 25kDa ORF로 운반한다(더 자세한 것을 위하여 "실험 방법"을 참고). 35S-GFP 구조는 이미 기재되어 있다. 35S-25k 및 35S-25k-△ATG 구조는 35S 프로모터 및 35S 터미네이터에 결합된 PVX 25kDa ORF에 기초하며 pBin19의 T-DNA 내로 삽입된다. 25kDa ORF의 시작 코돈은 "△ATG"에 의하여 나타난 바와 같이 35S-25k-△ATG에서 제거되었다. LB 및 RB는 각각 pBin19 T-DNA의 좌측과 우측 경계를 나타낸다.

도 2. GFP 사일런싱 시그널의 전신 이동에 대한 TGB 단백질의 효과 - GFP 전신 사일런싱의 동력학. 그래프의 각 점은 UV 조명하에서 측정한 결과 GFP 전신 사일런싱을 나타내는 식물의 백분율을 나타낸다. 평균 수치는 시험된 30주의 개개의 식물로부터 3회의 독립적인 실험에서 얻어졌다. 식물은 전신 사일런싱이 몇몇 잎 엽맥 주변의 작은 영역에 한정된다할 지라도 사일런싱된 것으로 기록되었다(즉 판넬 B2, 21dpi에서). PVX-GFP-_TGB-△CP가 접종된 모든 식물은 21dpi에서 광범위한 전신 사일런싱을 나타내었다.

도 3. p25의 작용 모드를 위한 모델

(A) 이전에 제시된 것과 같이(Dalmay et al., 2000), PTGS 경로의 2개의 SDE1-의존 및 SDE1-비의존 지류. SDE 1-비의존 지류에 있어서, 바이러스 RNA는 이중 가닥 RNA(바이러스 dsRNA)로 복제된다. 이식 유전자의 전사물은 SDE1을 포함한 일련의 단계를 통하여 dsRNA로 처리된다. 그 이후 바이러스 및 이식 유전자 dsRNA 양자 모두는 21-25nt(그러나 21-23nt로 생각됨) RNA로 처리되어 PTGS를 매개하는 서열 특이적 뉴클레아제에 대한 특이성을 얻었다(Zamore et al., 2000). 이 모델에 있어서, SDE1-의존 지류는 바이러스 RNA에 의하여 영향을 받지 않는다는 것이 주목된다.

(B) 국부적 및 전신적 사일런싱에 대한 p25의 효과에 기초한 PTGS의 개량된 모델. 이 모델은 바이러스 RNA가 SDE 1-의존 지류에 관여한다는 것을 인지한다. 이 지류는 전신의 PTGS 시그널의 생성에서 관련되며, PVX에 의해 암호화되는 p25에 의하여 억제된다.

표 I은 " 다양한 식물 바이러스에 의하여 일어나는 GFP mRNA의 PTGS 억제" 를 나타낸다. 전술된 바와 같이(17), GFP mRNA의 PTGS는 아그로박테리움의 침투에 의하여 유전자 이식 N. benthamiana로 유도된다. 전신의 감염 이후에 유전자 사일런싱의 억제는 계속하여 UV 조명하에서 평가되고 RNA 겔 블롯 분석에 의하여 분석되었다. RNA 샘플을 바이러스가 전신으로 퍼지기 전에 나온 노후한 잎과 바이러스 감염 후에 나온 새로운 잎 중에 하나로부터 취하였다. 시험된 식물의 총수 뿐만 아니라 잎 중의 억제 표현형(전체 조직 또는 엽맥 중심에 영향을 미침)이 나타났다. 바이러스는 여름과 겨울 동안의 중복된 독립적인 실험에서 시험되었다.

부록 I은 실시예 11에 사용된 것과 같은 CPDK의 부분 서열을 나타낸다.

부록 II은 실시예 13에 사용된 것과 같은 GFP-RdRp 융합 서열을 나타낸다.

실시예

일반적인 재료 및 방법

식물 재료, 아그로박테리움 침투 및 접목 방법

GFP 이식 유전자(라인 16c)를 운반하는 유전자 이식 N. benthamiana 및 아그로박테리움의 침투 방법은 이전의 문헌에 기재되어 있다(Rer 12, Voinnet et al., 1998). 공침투를 위하여, 동일 부피의 아그로박테리움 배양물(OD_{600} =1) 2개를 침투 전에 혼합하였다. 단일 침투를 위하여, 35S-25k 구조를 함유하는 배양물을 OD_{600} =1까지 희석시켜 식물 세포에 대한 독성을 방지하였다. Rx-GFP 식물은 Rx 위치에 대한 유전자 이식 N. benthamiana의 동질 접합체(Bendahmane et al., 1999)와 라인 16c와의 교배로부터 만들어졌다. 접목은 문헌[Palauqui et al., 1997]에 따라 수행되었다.

실시예 1-8을 위한 PTGS 억제 분석

사일런싱 억제를 위한 시험은 전술된 실험 시스템(12)에 기초하였다. 이 시스템은 자외선(UV)조명하에서 연녹색 형광인 고도로 발현된 GFP 이식 유전자를 운반하는 유전자 이식 Nicotiana benthamiana를 포함한다. 이러한 식물 중의 전신의 사일런싱은 전술한 바와 같이(17) Agrobacterium tumafaciens 종으로 유전자 이식 묘목의 하부 잎을 침투시킴으로써 유도되었다. 침투 후 20일까지, GFP의 사일런싱은 식물의 모든 성장 조직 내로 확대되었으며, 결과적으로 그들은 UV 조명하에서 동일하게 적색을 나타내었다. 이 단계에서, 식물의 생장점 중에 PTGS는 없었으며 사일런싱은 분열조직 내 또는 이 근처에 위치한 사일런싱되지 않은 세포에서 지속적으로 개시됨으로써 유지되었다(17). 이 후에 이러한 사일런싱된 식물을 여러 종의 식물 바이러스로 감염시키고, 전신의 증상이 관찰되었을 때 UV 조명하에서 녹색 형광 영역을 측정하였다. 또한, 감염된 조직에서 GFP mRNA의 수준을 측정하기 위하여 노던(Northern) 분석을 수행하였다.

더 구체적으로, (17)에서 보고된 바와 같이 라인 16c의 묘목 잎들을 작용성 35S-GFP 카세트가 삽입되어 있는 바이너리 Ti 플라스미드 벡터를 운반하는 A. tumefaciens 종으로 침투시켰다. 15~20일 후에, GFP의 PTGS가 전체 식물에서 이루어졌을 때, 전신의 잎은 야생형 또는 재조합 바이러스로 접종되었다. 이 잎은 " 접종된 잎" 으로 불린다. 이어서 테스트되는 바이러스를 사일런싱된 식물로 퍼지도록 하였고, 14 또는 20 DPI에서 2종류의 잎이 수집되었다. " 노후한 잎" 은 바이러스가 전신으로 퍼지기 전에 나온 감염된 잎이고, 반면에 " 새로운 잎" 은 바이러스가 전신으로 이동한 후에 나온 것들이었다.

실시예 9를 위한 PTGS 억제 분석

PTGS의 시스널링에 대한 역할이 전신의 항바이러스 방어라는 것을 나타내기 위하여, 본 발명자들은 바이러스 이동이 사일런싱 시그널의 이동과 연결되지 않는 접목 실험을 고안하였다. 실험에서는 고도로 발현된 녹색 형광 단백질(GFP) 이식 유전자를 운반하는 Nicotiana benthamiana의 라인 16c를 사용하였다.이들 식물은 자외선(UV) 조명하에서 연녹색인 반면, 형질전환되지 않은(NT) 식물은 엽록소 형광 때문에 적색이다.

이식 유전자에 의하여 유도된, GFP의 전신 사일런싱은 35S-GFP T-DNA 구조(35S-GFP, 도 1)를 운반하는 Agrobacterium tumefaciens 종의 국소적인 침투에 의하여 개시되었다.

바이러스에 의하여 유도된 GFP 이식 유전자의 PTGS는 GFP 리포터 유전자(PVX-GF, 도 1)의 5' 말단으로부터 뉴클레오티드 450개를 운반하는 PVX 벡터에 의한 감염에 의하여 개시되었다.

이들 실험에서 근경(rootstock)은 5일 전에 PVX-GF로 접종된 GFP 유전자 이식 식물이었다. 이들 식물은 GFP의 PTGS의 초기 징후를 나타내었다. 어린 가지는 GFP 이식 유전자를 PVX에 대한 극도의 저항성을 부여하는 Rx 유전자와 함께 운반하였다. Rx의 존재는 어린 가지에서 PVX-GF의 복제를 방해할 것이나 사일런싱 시그널의 전신의 이동에는 효과가 없다.

야생형 바이러스

AMV, FoMV, NMV, NVX, VMV 및 TBSV의 분리는 JIC 콜렉션(UK)로부터 얻었다. CPMV는 JIC(UK)의 조지 로모노소프(George Lomonosoff)로부터 얻었다. ACMV는 JIC(UK)의 존 스탠리(John Stanley)로부터 얻었다. TRV-PPK20은 존 볼(John Bol, Leiden University, Netherlands)로부터 얻었다. 기타의 바이러스 및 참고는 다음과 같았다: TMV-U1(18), PVX-UK3(19), PVY ^{N} 및 CMV(12), TBRV-W22(8) 및 RYMV-N(20).

재조합 바이러스.

(ⅰ) 니게리아(Nigeria)(20)로부터 분리한 벼의 황색 반점 바이러스의 P1 단백질 서열을 다음과 같은 5' 인산화된 프라이머를 사용하여 증폭시켰다: 온전한 단백질(P1)에 대한 ATG ACT CGG TTG GAA GTT C3' 및 번역될 수 없는 단백질(mP1)에 대한 ATCACA CGG TTGTAA GGT TC3'. 증폭을 위하여 사용된 인산화된 하류 프라이머는 CAT CCC GTG TCA GTC TG 이었다. 2개의 PCR 단편을 PVX 벡터의 EcoRV 사이트내로 클론화하였다(p2C2S)(19). RYMV PCR 단편의 방향은 p2C2S2 다중 클로닝 사이트(GTA GTT GAG GTA GTT GAC CC)의 3' 말단에서 벡터 서열 중의 안티센스 프라이머 및 전술한 2개의 센스 RYMV 5' 프라이머를 사용하여 콜로니-PCR에 의하여 확인되었다.

(ⅱ) PVX-AC2 및 PVX-mAC2: 참고 (21).

(ⅲ) PVX-HS142 및 PVX-HS160: 참고 (22) - 본 명세서에서 PVX-19k 및 PVX-m19k로 기재됨.

실시예 9에서 사용된 다양한 PVX-GFP 유도체는 PVX 벡터의 전체 길이가 35S 프로모터 및 Nos 터미네이터 사이에 삽입되어 있는 PUC19 계 벡터인 pPVX204에 기초하였다. 본 명세서에서 PVX-GFP로 언급된 구조는 pBin-35-mGFP5로부터 mGFP5 삽입물을 운반하는 pPVX204의 유도체이다(Ruiz et al., 1998). PVX-GF는 PVX-GFP로부터 유래하였다. 전체 외피 단백질 ORF를 Sal I 및 Xho I에 의한 분해 및 이어서 일어나는 재결합에 의하여 PVX-GFP로부터 제거하여 PVX-GFP-△CP를 생성하였다. PVX-GFP-△TGB-△CP는 AvrII 및 Eag I로 PVX-GFP-△CP를 분해하고 복제 효소 ORF의 3' 말단, 전체 TGB 및 GFP5 ORF의 3' 말단을 제거하여 생성되었다. 복제 효소 및 GFP의 기능을 회복하기 위하여, PVX-GFP-△CP로부터 PCR 증폭되고 후술하는 바와 같이 분해된 2개의 DNA 단편을 가지고 3-웨이 결합을 수행하였다. 5'-GCACAGATTTTCCTAGGCACGTTATC 및 3'-GAAAGAAATTGGgccggctcttgaac(밑줄 친 부분은 Eag I 사이트임)로의 증폭은 이 후에 AvrII 및 Eag I에 의하여 분해되는 복제 효소 ORF의 3' 말단에 대응하는 DNA 단편을 생성하였고, 5'-cagaaaccggccgctagcGGGCCATTGCCG(밑줄 친 부분은 Eag I 사이트임) 및 3'-TGTACTGCTTGAGATTTACAGCT로의 증폭은 이 후에 Eag I에 의하여 분해되는 GFP5 ORF의 5' 말단에 대응하는 DNA 단편을 생성하였다. PVX-GFP-△rep-△CP 및 PVX-△rep-GFP-△TGB- CP는 PVX-GFP-△CP 및 PVX-GFP-△TGB-△CP를 각각 BglII로 분해하고 재결합함으로써 생성되어, 복제 효소 ORF 중에 1729-nt의 결실이 생성되었다. 개개의 TGB 돌연변이는 이전에 특징지워진 돌연변이를 PVX-GFP-△CP 환경으로 도입함으로써 생성되었다. PVX-GFP-12k-△CP는 PVX-GFP-12D의 Apa I-BstB I 제한 단편(Verchot et al., 1998)을 Apa I-BstB I에 의하여 분해된 PVX-GFP-△CP로 삽입함으로써 만들어졌다. PVX-GFP-△8k-△CP는 pTXS-8k-GFP의 Apa I-BstB I 제한 단편(Simon snata Cruz에 의하여 제공됨, SCR I, Dundee)을 Apa I-BstB I에 의하여 분해된 PVX-GFP-△CP로 삽입함으로써 만들어졌다. pTXS-△8k-△GFP는 중복되는 12kDa 단백질 ORF의 암호화 능력을 변화시킴이 없이 인프레임 종결 코돈도 도입하는 8kDa 단백질의 시작 코돈(M->T)에서 돌연변이를 갖는다. PVX-GFP-△25k-△CP는 25kDa ORF 중에서 PVX 게놈 중의 뉴클레오티드 4588-4591의 돌연변이에 의하여 삽입된 Apa I 사이트와 4945 위치에 본래 존재하는 Apa I 사이트 사이에서 354-nt의 결실이 있는 pTXS-GFP-△Apa/Apa로부터 생성되었다. 이어서 상기 결실은 AvrII-BstB I 단편으로서 AvrII-BstB I가 분해된 PVX-GFP로 도입되었다. 마지막으로, PVX-GFP-25kFS-△CP 구조는 pTXS-GFP3A로부터의 AvrII-BstB I 제한 단편(Simon Santa Cruz에 의하여 제공됨, SCR I, Dundee)을 AvrII-BstB I로 분해된 PVX-GFP-△CP로 삽입함으로써 생성되었다. pTXS-GFP3A는 PVX 게놈 중의 뉴클레오티드 4945에서 Apa I 분해에 의한 3'의 돌출부위(T4 DNA 폴리머라아제)의 제거로부터 일어난 4bp 결실을 운반한다. 이 돌연변이는 아미노산 154에서 시작하는 25kDa ORF 중에서 격자이동을 일으키며 아미노산 159에서 인프레임 종결 코돈을 도입하여 절단된 단백질(C-말단에서 73 아미노산 결실)을 생산한다. 내생 유전자(PDS 및 Rbcs)의 단편을 운반하는 구조는 전술한 벡터의 모든 유도체이었다. GFP5 중의 독특한 Pml I의 블런트(blunt) 사이트는 대응하는 삽입물을 클론화하기 위하여 사용되었다(도면 설명 참고). 본 명세서에 기재된 모든 구조는 서열화에 의하여 확인되었고 Sac I 단편으로서 pBin19 벡터 플라스미드의 T-DNA로 삽입되었다(Bevan, 1984). 35S-25k 및 35S-25k-ATG 구조는 pJIT61(JIC)의 35S 발현 카세트를 함유하는 pBin19에 기초한다. 25kDa 삽입물은 PFU 폴리머라아제(Promega)를 사용하여 pPVX204로부터 증폭된 PCR 단편이었다. 35S-25k-ATG에 대하여, 시작 코돈은 앞쪽의 프라이머에서 생략되었다. 양 구조는 서열화에 의하여 확인되었다.

일반적인 방법

감염성 재조합 PVX RNA를 생산하기 위한 실험실 내의 전사 반응 및 접종은 전술한 바와 같았다(19). 노던(Northern) 분석은 전술한 바와 같았다(13).

RNA 분리와 고분자량 및 저분자량 RNA의 노던 분석은 전술한 바와 같았다(Dalmay et al., 2000). PVX-GFP 및 PVX-GF의 바이러스 접종물은 전술한 바와 같았다(Ruiz et al., 1998).

GFP의 시각적인 검출은 전술한 바와 같다(12). 상세한 관찰은 형광 모듈과 결합된 입체 현미경을 절개하는 LEICA MZFLIII를 사용하여 얻어졌다. GFP 이미지화를 위한 필터 세트는 레이카(Leica)로부터 얻은 GFP-플러스 형광 세트이었다(여기(勵起) 480nm, 2색성 빔 스플리터(splitter), 505nmLP, 배리어 필터 510nmLP). 입체 현미경과 결합된 LEICAMPS60 장치를 사용하여 사진을 생성하였다.

실시예 1

다양한 식물 바이러스에 의한 유전자 사일런싱의 억제

시험된 바이러스 중 어떤 것은 N. benthamiana에서 유전자 사일런싱을 억제하였다(표 1). 몇몇의 바이러스에서, 억제는 새로 나온 잎(NL) 뿐만 아니라 바이러스가 퍼지기 전에 나왔던 노후한 잎(OL)에서 발생하였다. 이것은 PVY에 대하여 이전에 기재되었던 사일런싱 억제의 양상을 상기시켰다(12). 반대로, 토마토 버쉬 스턴트 바이러스(TBSV)는 이전에 CMV에 대하여 기록된 바와 같이 단지 새로 나온 조직에서만 유전자 사일런싱을 억제하였다(12). 폭스테일 모자이크 바이러스(FoMV), 알팔파 모자이크 바이러스(AMV) 또는 담배 검은 고리 바이러스(TBRV)는 PVX와 같이 완전히 감염성이지만 GFP의 사일런싱에는 효과가 없었다(그러나 후술하는 실시예 9 참고). 이러한 결과에 기초하여 PTGS 억제는 다양한 식물 바이러스의 특성인 것으로 보일 것이다. 그러나, 공간적인 양상 및 억제의 정도는 바이러스간에 매우 다양하기 때문에 상이한 메커니즘이 관여하는 것 같았다.

상기 결과는 바이러스에 의하여 암호화되는 유전자 사일런싱의 억제제는 별개의 작용 모드를 가지며, 숙주의 유전자 사일런싱 장치의 별개의 성분에 대하여 표적화된다는 것을 제시한다. 감염된 잎 전체에서 동일하게 외래 단백질을 발현시키는 것으로 나타난 PVX 벡터로부터 다양한 억제제가 발현되었을 때 유사한 양상이 재생성되기 때문에 이들 차이점은 이들 바이러스의 조직 굴성(屈性)을 반영하는 것 같지 않다(19).

더 적당한 설명은 억제제의 작용 모드 및 표적화된 유전자 사일런싱 메커니즘의 성분에 공동으로 의존한다. 예를 들면, 억제제가 유전자 사일런싱의 유지에 필요한 성분을 분해할 수 있다면, 새로운 잎 및 노후한 잎 양자 모두에서 효과가 있을 것이다. 그러나, 억제제가 사일런싱에 필요한 성분의 합성 또는 활성화를 차단한다면, 억제는 억제제의 존재하에서 바이러스 사일런싱이 확립하게 될 새로 나온 잎에 제한될 것이다. 노후한 잎에 있어서, 성분이 억제제의 부재하에서 형성되었으므로, 결과적으로 바이러스가 식물을 감염시킬 때 영향을 받지 않을 것이다.

실시예 2

제미니바이러스에 의하여 암호화되는 AC2 단백질에 의한 PTGS의 억제

조직을 15 DPI에서 절개한 현미경으로부터 UV 조명하에서 사진을 찍었다. 적색 조직은 UV하에서 엽록소 형광에 상응하며, 따라서 GFP의 유전자 사일런싱을 나타낸다. 때때로 황색으로 보이는 녹색 형광 조직은 GFP의 발현으로부터 생기며, 따라서 유전자 사일런싱의 억제를 나타낸다. 표 1에 나타난 바와 같이, 아프리카 카사바 모자이크 제미니바이러스(ACMV)의 감염은 접종 후 약 3주에 완전히 성장한 조직 및 새로 발생하는 조직 모두에서 GFP 사일런싱의 억제를 일으킨다.

가장 감염되어 사일런싱되지 않은(NS) N.benthamiana 또는 ACMV, PVX-AC2, PVX-mAC2 또는 PVX로 감염된 N.benthamiana 중으로부터 20 DPI에서 추출된 RNA 중에서 노던 분석을 수행하였다. RNA 샘플을 접종된 잎, 바이러스가 전신으로 퍼지기 전에 나온 노후한 잎 또는 바이러스 감염 후에 나온 새로운 잎(NL)으로부터 취하였다. 동일한 양의 각 RNA 샘플(10 μg)을 프로브로 ^{32}P-표지된 GFP cDNA를 사용하여 RNA 겔 블롯팅에 의하여 분석하였다. 리보솜 RNA(rRNA)를 염색하는 에티듐 브로마이드는 상기 샘플의 동등한 로딩(loading)을 나타내었다. 노던 분석은 GFP mRNA 수준이 두 종류의 조직 모두에서 높았으며, 억제는 접종된 잎에서도 낮은 정도이었지만 발생하였다는 것을 나타내었다. 그래서, 이들 결과물은 ACMV 게놈 중에서 암호화된 PTGS의 억제제와 일치하였다. 이 추정되는 억제제를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 AC2 단백질을 발현시키는 PVX 벡터(PVX-AC2)는 야생형 PVX의 증상보다 훨씬 더 심각한 괴저성 증상을 생성하였다는 종전의 발견을 이용하여, AC2가 숙주의 방어 메커니즘을 억제하였다는 것을 제시하였다. Cla I-EcoR V-Sal I의 다중 클로닝 사이트(19)를 사용하여 개개의 서열을 P2C2S PVX 벡터 내로 삽입하여 "PVX-X" (예를 들어 PVX-AC2)를 생성하였다. 상기 삽입물 및 상기 PVX 외피 단백질의 발현은 중복된 외피 단백질 프로모터에 의하여 조절되었다. 본 명세서에서 사용된 모든 병원성 결정소의 돌연변이 변형은 "mX" (예를 들어 PVX-mAC2)라고 언급되었다. 상기 결과로부터, AC2는 RMD의 억제제인 것 같았다.

이 가설의 시험은 GFP에 의하여 사일런싱된 식물을 PVX-AC2로 감염시키는 것이었다. 대조구로서, 단일 점 돌연변이에 의하여 이른(premature) 종결 코돈을 AC2 ORF내로 도입한 PVX-mAC2로 식물을 접종하였다. 접종 후 약 2주째에, PVX-AC2로 감염된 식물은 (21)에 보고된 바와 같이 심각한 증상을 나타내었다. UV 조명하에서, 바이러스 접종 전에 나왔던 잎들을 비롯한 대부분의 감염된 조직들은 녹색 형광이었고 GFP mRNA 수준은 사일런싱되지 않은 GFP 식물 중의 수준과 유사하였다. 반면에, PVX-mAC2는 심각한 증상을 나타내지 않았고 GFP 사일런싱을 억제하지 않았다. 이들 결과로부터, 본 발명자들은 ACMV 게놈에서 암호화되는 AC2 단백질은 N. benthamiana 중에서 PTGS 유지의 억제제라고 결론지었다.

실시예 3

TBSV의 19k 단백질에 의한 사일런싱의 엽맥 특이적 억제

TBSV로 감염된 N. benthamiana는 증상이 완전히 전신으로 퍼진 때인 접종 후 약 3주째에 PTGS의 변형을 나타내었다. 또 다시 20 DPI에서 절개한 현미경으로부터 UV 조명하에서 사진을 찍었다. CMV에 의하여 감염된 식물과 같이, 녹색 형광의 회복은 단지 새로 나온 감염된 잎에서만 발생하였다. 그러나, 사일런싱의 이러한 억제는 CMV로 감염된 경우보다 더 약하여, 녹색 형광은 손바닥 크기의 램프로부터의 UV 조명하에서 거의 검출되지 않았다. 또한, CMV와는 달리, TBSV는 단지 엽맥 내 및 그 주변에서만 PTGS를 억제하였다. GFP의 엽맥 특이적 변형은 분리된 새로 나온 잎을 절개한 현미경하에서 관찰하였을 때 더욱 분명하였다.

PVX-19K 또는 PVX-m19K로 감염된 사일런싱된 (S) N.benthamiana로부터 20 DPI에서 추출된 샘플에서 RNA의 노던 분석을 수행하였다. 노후한 잎 또는 새로 나온 잎으로부터 RNA 샘플을 취하였다. 동일한 양의 각 RNA 샘플(15 μg)을 프로브로 ^{32} P-표지된 GFP cDNA를 사용하여 RNA 겔 블롯팅에 의하여 분석하였다. 사일런싱되지 않은 식물로부터 나온 GFP RNA의 일련의 희석액을 형질전환되지 않은 식물로부터 나온 전체 RNA 내로 " 가장" 접종하였다. GFP RNA를 기준 샘플(1:1)의 반으로(1:2) 또는 5분의 1로(1:5) 희석시켰다. 리보솜 RNA(rRNA)를 염색하는 에티듐 브로마이드는 샘플의 동등한 로딩을 나타낸다. 노던 분석은 GFP RNA가 노후한 잎이나 가장 감염된, 사일런싱되지 않은 식물에서보다 감염된 잎의 새로운 잎에서 더 풍부하다는 것을 나타낸다. 그러나, 새로운 잎 중의 GFP RNA는 가장 접종된 식물 중의 수준의 20%미만이었다.

TBSV의 19K 단백질은 병원성 결정소라는 것이 보고되어 왔다. 예를 들어, 본 명세서에서 PVX-19K로 기재되어 있는 19K 단백질(pHS142)을 발현하는 PVX 벡터는 N. benthamiana에서 심각한 증상을 유도하였다(22). 또한, TBSV 중의 19K 단백질의 불활화는 일반적으로 TBSV에 의하여 식물에서 유도되는 치명적인 꼭대기의 괴저성 증상 표현형에 대한 효과를 약화하였다(22). 종합하여 이들 데이터들은 TBSV 19K 단백질은 유전자 사일런싱 억제제의 성질을 갖는다는 것을 보여준다. 이 가설을 시험하기 위하여, 사일런싱된 GFP 식물은 PVX-19K로 접종되었다. 대조구로서, 식물을 번역될 수 없는 형태의 19K 단백질을 운반하는 pHS160(본 명세서에서는 PVX-m19K로 기재됨)으로도 접종하였다. 접종 후 2주째에 PVX-19K로 감염된 식물은 매우 심각한 증상을 보인 반면, PVX-m19K에 의하여 감염된 식물은 가벼운 모자이크 증상을 나타내었으며, 이는 (22)에 보고되어 있다. 사일런싱의 억제는 PVX-19K에 의하여 감염된 식물 중에서 일어났으나, 단지 새로 나온 조직에서만 명확했으며 엽맥 중에 가장 많이 전달되었다. 그러나, PVX-19K의 증상은 잎의 모든 영역에서 육안으로 볼 수 있었다. PVX-m19K로 감염된 유사한 조직은 동일하게 적색 형광을 유지했다. 새로 나온 감염된 잎으로부터 추출된 RNA의 노던 분석은 단지 낮은 수준의 GFP RNA만이 PVX-19K에 의하여 감염된 조직에서 검출될 수 있었다는 것과 GFP RNA는 PVX-m19K에 의하여 감염된 조직에서 검출된 수준 이하였다는 것을 나타내었다. 종합하여, 이들 결과는 TBSV의 19K 단백질은 새로 나온 잎의 엽맥 조직 근처에서 작용하는 N.benthamiana 중의 PTGS 억제제라는 것을 제시한다.

실시예 4

PTGS의 억제가 엽맥 내 또는 그 주변에 선택적으로 일어나는 기타의 예

토바모바이러스 및 코모바이러스 군의 전형적인 구성원인 담배 모자이크 바이러스(TMV) 및 카우피 모자이크 바이러스(CPMV)의 효과를 각각 20 DPI에서 손바닥 크기의 램프로부터의 UV 조명하에서 찍은 사진으로 전술된 바와 같이 측정하였다. GFP에 의하여 사일런싱된 식물에 상응하는 바이러스의 접종은 새로 나온 조직 및 이미 성장한 사일런싱된 조직 양자 모두에 영향을 미치는 유전자 사일런싱 억제를 일으켜서, PTGS의 유지가 감소되었다(표 1). 그러나, TBSV 및 PVX-19K에 대하여 이미 나타난 바와 같이, 각각의 바이러스의 증상이 잎 전체의 라미나에서 관찰될 지라도(데이터는 제시되지 않음), 라미나의 대부분의 조직은 사일런싱된 상태이고(즉 적색 형광), 억제는 엽맥 내 또는 그 근처에서 가장 명확히 나타났다. 감염된 잎이 완전히 성장하고 완전히 감염된 경우에도 이러한 표현형은 시간이 지남에 따라 변화되지 않았다. 두 바이러스 모두에서, 엽맥 주변의 녹색 형광은 매우 강하였고, 이 효과는 손바닥 크기의 램프로부터의 UV 조명하에서 분명하게 식별할 수 있었다. TMV 및 CPMV로 감염된 사일런싱된 N.benthamiana로부터 20 DPI에서 추출된 물질로 RNA의 노던 분석을 수행하였다. RNA 샘플을 노후한 잎 또는 새로 나온 잎으로부터 취하였다. 동일한 양의 각 RNA 샘플(15 μg)를 프로브로 ^{32}P-표지된 GFP cDNA를 사용하여 RNA 겔 블롯팅에 의하여 분석하였다. 샘플을 동일한 아가로스 겔 상에서 분리하고 실시예에서 사용된 동일한 필터 상에서 블롯팅(blotting)하였으며, 또한 기준으로서 동일한 '가장' GFP RNA의 일련의 희석액의 사용하도록 하였다. 리보솜 RNA(rRNA)를 염색하는 에티듐 브로마이드는 샘플의 동등한 로딩을 나타낸다. 감염된 잎으로부터 추출된 RNA의 노던 분석은 GFP RNA의 축적이 이들 조직에서 회복되었으나, 사일런스되지 않고 감염되지 않은 식물의 유사한 조직으로부터 추출된 풍부한 GFP RNA와 비교할 때는 낮은 수준이었다. 이것은 아마도 엽맥 조직이 라미나의 가장 풍부하게 사일런싱된 조직 내로 희석하게 되기 때문인 것같다. 따라서, 이 분자 분석은 UV 조명하에서 관찰된 사일런싱 억제의 특정한 표현형과 일치하였다.

예를 들어 TBSV의 19K 단백질에 의한 엽맥 중의 사일런싱의 억제는 이 단백질이 단지 엽맥 중에서만 안정하거나 발현된다는 것을 나타내거나, 또는 이것이 도관과 비도관 조직 사이에서 질적으로나 양적으로 상이한 PTGS 메커니즘의 성분에 대하여 표적화된다는 것을 나타낼 수 있었다. 또한, 억제제는 PTGS의 전신의 신호에 대하여 표적화될 수 있었다. 본 발명자들은 이 시그널이 체관부로 수송되며 수용체 잎에서 그것은 주로 엽맥 내 및 그 근처에 위치한다는 것을 나타내었다(17). 엽맥 중의 사일런싱 억제에 대한 이들의 서로 다른 설명 중에서, 본 발명자들은 모든 경우에 있어서 PTGS 억제가 도관 다발 밖의 세포내로 확대되고 정확하게 엽맥 특이적 사일런싱 과정이라기보다는 시그널의 이동을 반영한 것으로 보이기 때문에 엽맥 특이적 성분 또는 억제제의 안전성과 관련된 것은 가능성이 없다. 이 이유 때문에, 본 발명자들은 TMV, CPMV 및 TBSV의 억제제가 사일런싱의 전신의 시그널에 대하여 표적화되며 그래서 전신의 RMD에 대한 바이러스의 적응을 나타낼 수 있다는 것을 제안한다.

TMV, TBSV 및 CPMV는 단지 엽맥 내 또는 그 근처에서만 PTGS를 억제할 수 있으나, 그럼에도 불구하고 그들은 감염된 잎 전체에 높은 농도로 축적될 수 있다. 그래서, 이들 바이러스는 RMD의 효과를 방해하기 위한 제2의 방법을 갖는 것 같다.

실시예 5

벼 황색 반점 바이러스(RYMV)로부터 나온 병원성 결정소는 비숙주인Nicotiana benthamiana종 중에서 PTGS를 억제한다.

RYMV는 매우 좁은 숙주 범위를 나타내는 소베바이러스이다. 이것은 Oryzae, Phalaridae 및 Eragrostidae 류를 포함하는 단자엽 식물 종을 전신적으로 감염시킨다(23). 최근의 연구에서 RYMV의 P1 단백질은 벼 중의 병원성 결정소의 특징을 나타냈다(24). 그것이 RYMV의 비숙주 종에서 유전자 사일런싱을 억제하는지를 시험하기 위하여, P1 ORF를 PVX 벡터로 도입하였고, 이의 결과물인 재조합 바이러스(PVX-P1)로 GFP에 의해 사일런싱된 N.benthamiana를 감염시켰다. 대조구로서, 번역될 수 없는 형태의 P1(PVX-mP1)을 운반하는 PVX 벡터를 접종하였다. 접종 후 약 2주째에, PVX-P1으로 감염된 조직은 심각한 백화 현상 및 백색 괴저를 나타내었다. UV 조명하에서, 바이러스 접종 전에 나온 잎들을 비롯한 이들 조직은 14 DPI에서 녹색 형광을 나타내었으며, 사일런싱의 변형은 노후한 잎에서 뿐만 아니라 새로 나온 조직에서도 일어났다.

가장 감염되어 사일런스되지 않은 N.benthamiana 또는 PVX-P1이나 PVX-mP1으로 감염되어 사일런싱된 N.benthamiana로부터 14 DPI에서 추출된 물질에 대하여 RNA의 노던 분석을 수행하였다. 노후한 잎 또는 새로 나온 잎으로부터 RNA 샘플을 취하였다. 동일한 양의 각 RNA 샘플(15 μg)를 프로브로 ^{32}P-표지된 GFP cDNA를 사용하여 RNA 겔 블롯팅에 의하여 분석하였다. 리보솜 RNA(rRNA)를 염색하는 에티듐 브로마이드는 샘플의 동등한 로딩을 나타낸다. 감염된 어린 조직에 있어서, GFP mRNA 수준은 사일런스되지 않은 GFP 식물 중의 수준과 유사하였다. GFP mRNA는 또한 낮은 수준이었지만 바이러스 접종 전에 나왔던 감염된 잎에서도 검출될 수 있었다. 반면에, 심각한 증상이나 GFP 사일런싱의 변형 어느 것도 PVX-mP1 감염에 의하여 유발되지 않았다. 이 데이터로부터, 본 발명자들은 RYMV의 P1 단백질은 Nicotianana 종에 대하여 감염성이 아닌 바이러스의 게놈 중에서 암호화되지만, N.benthamiana 중에서 PTGS 유지의 억제제라고 결론지었다.

실시예 6

포텍스바이러스 중의 밀접하게 관련된 구성원 간의N.benthamiana중에서 PTGS를 억제하는 능력의 다양성.

VMV, NMV, NVX 또는 PVX 중의 하나로 감염된 사일런싱된 N.benthamiana로부터 20 DPI에서 추출된 물질에서 RNA 노던 분석을 수행하였다. 노후한 잎 또는 새로 나온 잎으로부터 RNA 샘플을 취하였다. 동일한 양의 각 RNA 샘플(15 μg)를 프로브로^{32}P-표지된 GFP cDNA를 사용하여 RNA 겔 블롯팅에 의하여 분석하였다. 샘플을 동일한 아가로스 겔 상에서 분리하여 실시예 3에서 사용되었던 동일한 필터상에서 블롯팅하고, 또한 기준으로서 동일한 '가장' GFP RNA의 일련의 희석액의 사용하도록 하였다. 리보솜 RNA(rRNA)를 염색하는 에티듐 브로마이드는 샘플의 동등한 로딩을 나타내었다.

노던 분석에 기초하여 볼 때, 양자 모두 포텍스바이러스 군의 구성원인 PVX 및 FoMV는 N.benthamiana중에서 GFP의 PTGS에 효과가 없었다(표 1).

반면에, 기타의 포텍스바이러스, 나르시서스 모자이크 바이러스(NMV), 난디나 바이러스 X(NVX) 및 비올라 모자이크 바이러스(VMV)로의 감염은 N.benthamiana중에서 유전자 사일런싱(20 DPI에서 측정됨)의 억제를 일으켰다. 이 억제는 발달 중인 어린 조직에서 뿐만 아니라 접종 전에 성장한 잎에서도 명확하게 나타났으며(즉, 사일런싱의 변형이 새로 나온 조직 뿐만 아니라 노후한 잎에서 모두 일어남), 20 DPI에서 절개한 현미경으로부터 UV 조명하에서 사진을 찍었다. 이 억제는 Hc-pro, 2b 및 AC2에 의한 경우만큼 강력했으며 감염된 조직 중의 GFP mRNA 수준은 가장 접종되어 사일런스되지 않은 식물의 수준과 비슷했다.

이들 관련된 바이러스의 접종물을 국부적인 레젼(lesion)을 갖는 숙주 Chenopodium amaranticolor를 사용하여 정량하고(25), 희석하여 이들을 내부 기준으로 사용된 PVX 접종물과 비교하였다(잎 당 40개의 레젼). 감염 후에, 본 발명자들은 이들 바이러스가 유사한 종류의 증상을 일으킨다는 것을 확인하였다. 따라서, 사일런싱 활성의 억제제에서의 다양성은 감염의 정도라기 보다는 바이러스의 본질적인 특성을 반영하였다. 놀랍게도 다양한 억제제의 활성은 이들 바이러스의 뉴클레오티드 서열 유사성과 관련되지 않았다. 사일런싱을 억제하지 않았던 PVX 및 FoMV만이 상당히 먼 관계이었다. 반면에, 강한 억제제를 생성하는 NVX 및 VMV는 뉴클레오티드 수준에서 PVX와 각각 93% 및 97%의 일치성이 있었으며, 이는 외피 단백질 및 3개의 이동 단백질을 통과하는 영역의 서열 분석에 기초한다(A. Bendhamane and D.C. Baulcombe, in preparation). 또한 억제제를 생성하는 NMV는 PVX와 상당히 먼 관계이다. 따라서, 단일의 바이러스 군 중의 밀접하게 관련된 구성원들 중에서 PTGS를 억제하는 능력은 매우 다양하다.

실시예 7

PTGS의 억제제로서 AC2 및 P1의 사용

야생형 N. benthamiana 및 N. tabaccum을 표준 실험 기법을 사용하여 P1 또는 AC2 단백질의 cDNA가 삽입된 35S-nos 발현 카세트를 함유하는 T-DNA로 형질전환시켰다. 안정한 형질전환체는 Agrobacterium tumefaciens의 잎 디스크 접종에 의하여 생성되고(Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L, Eicbholtz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. (1985). A simple and general method of transferring genes into plants. Science 227, 1229-1231.) 노던 분석에 의하여 측정하였을 때 높은 수준의 발현을 나타내는 것들은 PTGS 억제를 위한 실험용으로 선택된다. PTGS 억제 시험은 P1 또는 AC2에 대한 N. benthamiana 형질전환체의 동질 접합체를 취하여 이들을 GFP 유전자 이식 N. benthamiana과 교배함으로써 수행되었다(Ruiz, M. T., Voinnet, O., and Baulcombe, D. C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gnen silencing. Plant Cell 10, 937-946). 이어서 바이러스에 의하여 유도된 GFP mRNA의 유전자 사일런싱을 활성화하기 위하여 F1 식물을 PVX-GFP로 감염시킨다(상기 Ruiz et al). F1 교배에서 GFP의 VIG의 AC2 및 P1에 의한 억제는 유전자 이식으로 발현되었을 때 양 단백질 모두 PTGS의 작용성 억제제라는 것을 나타낸다. 마찬가지로, 이들 교배에서 GFP의 전신의 사일런싱의 부재는 P1 및 AC2 양자 모두가 이식 유전자에 의하여 유도된 GFP mRNA의 유전자 사일런싱을 방해한다는 것을 나타낸다.

실시예 8

암플리콘에 의하여 매개된 유전자 사일런싱의 억제

전술한 실시예에 기재된 N. tabaccum 형질전환체를 PVX-GUS 암플리콘의 이식 유전자를 함유하는 유전자 이식 N. tabaccum 라인과 교배하였다(Angell, S. M., and Baulcombe, D. C. (1997). Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replication potato virus X RNA. EMBO J. 16, 3675-3684). 상기 암플리콘 라인은 PVX-GUS RNA의 일관된 PTGS을 나타내며, 그 결과로서 GUS 단백질은 생성되지 않는다. 그러나, 암플리콘/P1 또는 암플리콘/Ac2 교배는 높은 수준의 GUS 발현을 나타내며, 이는 잎의 조직화학적인 염색(Jefferson, R. A., Kavanagb, T. A., and Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J.6, 3901-3907.) 및 노던 분석에 의하여 측정된다. 암플리콘의 PTGS는 P1 및 AC2 단백질에 의하여 감소하고, 높은 수준의 GUS 단백질은 PVX 복제의 결과로서 생성된다. 상기 식물은 초기 PVX-GUS 암플리콘 라인과 같이 증상이 없으며, 이는 높은 수준의 PVX 복제가 식물 세포에 의하여 견디어질 수 있다는 것을 나타낸다.

실시예 9

PTGS의 억제제로서 PVX p25

PVX 게놈 중의 인자는 전신의 사일런싱을 억제한다.

GFP 이식 유전자 또는 GFP 및 Rx 이식 유전자 모두를 운반하는 유전자 이식된 어린가지는 근경에서 쐐기 모양의 접목을 하였다. 이후에 GFP 사일런싱의 접목 수송은 전 시간 동안 UV 조명하에서 기록되었다. 접목 후 20일까지, UV 조명하에서 녹색 형광의 손실에 의해서 나타난 바와 같이, GFP의 PTGS는 근경으로 확대되었다. 예상한 대로, PVX-GF는 Rx/GFP 어린가지로 퍼지지 않았다. 그러나, 10개의 접목 시험 중의 어느 것에서도 Rx/GFP 어린가지 중에 GFP의 전신의 사일런싱이 없었다. 어린 가지는 녹색 형광으로 남아있고 GFP mRNA의 수준은 감염되지 않은 GFP 식물에서와 같이 높았다.

Rx가 전신의 사일런싱을 방해할 수 있다면 GFP/Rx 어린 가지 내로 GFP 사일런싱의 전신의 퍼짐이 없을 수 있다. 그러나, 사일런싱이 Agrobacterium 침투에 의하여 줄기에서 유도되는 경우에는 10개의 접목 시험 중에 8에서 GFP/Rx

어린 가지로 퍼졌으며, 이들 어린 가지는 녹색 형광을 잃었고 GFP mRNA는 검출될 수 없었다. 사일런싱에 대한 Rx의 효과를 평가하기 위한 추가의 대조구에서 본 발명자들은 35S-GFP T-DNA를 운반하는 Agrobacterium 세포를 PVX-GF로 감염된 식물에 접목한 GFP/Rx 어린 가지로 직접 침투시켰다. 이들 시험 중 5개 모두에서, GFP 사일런싱이 유도되었고 GFP/Rx 어린가지 전체로 퍼져서 Rx가 PTGS의 개시 또는 전신의 퍼짐에 효과가 없음을 나타내었다. 따라서, PVX-GF에 의하여 감염된 줄기의 전신의 사일런싱 전개의 실패는 PVX 게놈 중에서 암호화되는 인자(생각컨데, 단백질)에 기인하였다.

PVX TGB 단백질은 전신의 사일런싱을 억제한다

PVX에 의하여 암호화되는 단백질이 전신의 사일런싱을 억제하거나 방해할 수 있는지 여부를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 PVX-GFP의 결실 돌연변이로 실험을 수행하였다(표 1). 이들 돌연변이 바이러스는 모두 PVX의 세포와 세포간 및 장거리 이동에 필요한 외피 단백질(CP)에 대하여 결함이 있기 때문에 초기에 감염된 세포들에 한정될 것이다. 예측대로, PVX에 의하여 암호화된 단백질이 전신의 사일런싱을 억제한다면, 이에 상응하는 PVX-GFP 돌연변이에 의하여 개시되는 PTGS는 접종된 세포로부터 떨어져 명확히 나타날 것이다. 반면에, 임의의 기타 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF) 중에 돌연변이를 운반하는 PVX-GFP 구조에 의하여 개시된 사일런싱은 접종된 부위에 한정될 것이다.

본 발명자들은 먼저 PVX-GFP-△CP 및 PVX-GFP-△TGB-△CP의 GFP 이식 유전자의 전신의 사일런싱을 유도하는 능력을 시험하였다(도 1). 이들 구조는 CP ORF 중에 결실이 있는 것을 제외하고는 PVX-GFP 벡터와 유사하다(도 1). CP 돌연변이 이외에, PVX-GFP-△TGB-△CP는 3중의 유전자 블럭(TGB)의 3개의 ORF를 통과하는 결실을 운반한다. 이 TGB는 CP 이외에 PVX의 세포와 세포간 이동에 반드시 필요한 3개의 단백질을 암호화한다(Verchot et al., 1998).

이들 돌연변이의 높은 적정 농도(滴定濃度)의 접종물을 생성하기 위하여, 본 발명자들은 PVX-GFP 구조가 35S 프로모터에 결합되어 있는 pBin19 Ti-플라스미드 벡터(Benvan, 1984)를 사용하였다. 이들 구조를 운반하는 Agrobacterium 배양물을 GFP 유전자 이식 식물의 잎 내에 침투시켰다. T-DNA의 운송은 침투된 부위 내의 높은 비율의 세포가 PVX-GFP의 이동 결함성 돌연변이로 감염되도록 할 것이다.

PVX-GFP-△CP 및 PVX-GFP-△TGB-△CP로 접종(dpi) 후 3일째에, 침투된 영역에서 연녹색 형광으로 명확하게 나타나는 GFP의 강력한 발현이 있었다(데이터는 제시되지 않음). 그러나, 5-6 dpi에서 시작하여, 침투된 영역은 적색 형광이 되었으며, 이는 GFP의 국부적인 PTGS가 이들 양 구조에 의하여 개시되었다는 것을 제시한다. 이들 국부적인 사일런싱은 35S-GFP 구조를 침투시킨 잎에서만큼 신속하게 전개하였다.

PVX-GFP-△TGB-△CP 및 35S-GFP 양자에 의한 전신의 사일런싱은 100%의 GFP 식물에서 개시되었으며, 35S-GFP 구조에 의한 것만큼 빠르고 광범위하게 전개되었다(도 2 그래프). 반면에, PVX-GFP-△CP 구조로 개시된 전신의 사일런싱은 지연되었고(도 2 그래프), 접종된 식물 중의 30%만에서 나타났으며, 이들 식물에서 몇몇 잎의 엽맥에 한정되었다. PVX-GFP-△CP 및 PVX-GFP-△TGB-△CP 사이의 차이점은 TGB ORF와 관련되기 때문에, 이들 결과는 하나 또는 그 이상의 TGB 단백질이 PVX-GFP-△CP에 의하여 감염된 세포가 전신의 사일런싱되는 것을 억제하는 것을 제시했다.

PVX에 의하여 암호화된 25kDa 단백질은 전신의 사일런싱을 억제한다.

TGB ORF가 개별적으로 돌연변이된 PVX-GFP-△CP 유도체를 가지고 유사한 실험을 수행하였다(PVX-GFP-△25k-△CP, PVX-GFP-$25k_{FS}$-△CP, PVX-GFP-△12k-△CP 및 PVX-GFP-△8k-△CP; 도 1).

[표 1]

(3회의 독립적인 실험이 수행되었으며, 21 dpi에서 측정되었다)

이들 돌연변이 모두에서, 침투된 영역은 적색 형광이 되었으며, 이는 GFP의 국부적인 PTGS가 개시되었음을 제시한다. 그러나 광범위한 전신의 사일런싱을 생성한 TGB 돌연변이는 25kDa 단백질(p25)의 ORF 중의 결실(PVX-GFP-△25k-△CP, 도 1) 또는 격자이동 돌연변이(PVX-GFP-25k$_{FS}$-△CP, 도 1)를 운반하는 것이었다.

12kDa 및 8kDa 단백질(각각 PVX-GFP-△12k-△CP 및 PVX-GFP-△8k-△CP, 도 1)의 ORF 중에 돌연변이를 운반하는 바이러스는 작용성 25kDa 단백질을 암호화하며, PVX-GFP-△CP와 같이 전신의 사일런싱의 불량한 유도인자이었다. 이들 구조로 접종된 대부분의 GFP 식물은 GFP의 어떤 전신의 사일런싱도 나타내지 않았다. 그러나, PVX-GFP-△CP에 의한 경우와 같이, 접종된 식물의 약 25%가 GFP의 부분적인 사일런싱을 나타내었다. 21 dpi에서 이 부분적인 사일런싱은 몇몇의 상부 잎 엽맥내 및 그 주변에 제한되었으며 더 이상 전개되지 않았다.

대체로, PVX-GFP TGB 돌연변이에 의하여 유발되는 대조적인 사일런싱 표현형은 p25의 직접적인 효과일 수 있다. 또한, 상기 돌연변이가 복제 또는 접종된 잎 중의 GFP의 PTGS를 유도하는 이들 돌연변이의 능력에 영향을 미친다면 간접적인 영향이 있을 수 있다. 이들 서로 다른 점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 GFP 특이적 프로브를 사용하여 2.5 및 5 dpi에서 침투된 잎 조직으로부터 나온 RNA의 노던 분석을 수행하였다. 전체 RNA를 PVX-GFP-△8k-△CP, PVX-GFP-△12k-△CP, PVX-GFP-△25k-△CP 또는 물로 침투되었던 GFP 식물의 잎으로부터 2.5 및 5 dpi에서 추출하였다. 노던 분석은 GFP cDNA의 중심부위에 상응하는 프로브를 사용하여 고분자량 RNA 부분의 10 μg에 대하여 수행되어 PVX-GFP 및 이식 유전자 GFP RNA의 축적을 검출하였다. 전기 영동된 겔을 염색하는 에티듐 브로마이드는 rRNA의 로딩을 나타내었다.

2.5 dpi에서, PVX-GFP-△12k-△CP, PVX-GFP-△8k-△CP 및 PVX-GFP-△25k-△CP의 추출물은 GFP 프로브로 검출된 4가지 주요한 RNA 종을 함유하였다. 게놈 바이러스 RNA(gRNA)가 가장 적었고, 바이러스 서브게놈(sg)RNA1이 가장 풍부하였다. sgRNA2는 GFP 이식 유전자 mRNA와 함께 이동하였고 이것으로부터 구별될 수 없었다. 2.5 dpi에서, 이들 RNA는 PVX-GFP-△12k-△CP, PVX-GFP-△8k-△CP 및 PVX-GFP-△25k-△CP에 의하여 감염된 조직에서 모두 풍부하였다. 그러나, 5 dpi에서는 3개의 TGB 돌연변이 모두에서 이들 RNA 종의 수준이 현저히 감소하였다. 가장 접종된 조직에서 GFP mRNA는 2.5 및 5 dpi에서 같은 수준이었기 때문에, 이러한 감소는 바이러스에 의존한다. 또한, RNA 풍부성에서의 이러한 변화는 바이러스와 이식 유전자 GFP RNA 종 모두에 대하여 표적화된 PTGS에 기인하는 것 같았다.

TGB 돌연변이에 의하여 유도된 PTGS의 추가의 실험과 같이, 본 발명자들은 5dpi에서 22-25nt 안티센스 GFP RNA에 대하여 평가하였다. 에티듐 브로마이드 염색 및 각 샘플 중의 tRNA 정량으로 표준화된 로딩을 가지고 저분자량 부분의 노던 분석을 수행하였다. 사용된 프로브는 GFP cDNA의 전체 길이에 대응한다. 기타의 시스템에서, 이들 작은 안티센스 RNA의 상대적인 양은 PTGS의 수준과 관련된다(Hamilton and Baulcombe, 1999; Dalmay et al., 2000)). 예상한 바와 같이, 이들 22-25nt GFP RNA는 가장 침투된 잎의 추출물에는 존재하지 않았다. 그러나, PVX-GFP에 의하여 감염된 조직에서 이들 RNA는 존재하며 이들의 수준은 TGB ORF 중의 돌연변이에 의하여 영향을 받지 않는다.

이 데이터는 3가지 TGB 돌연변이 모두가 GFP PTGS의 효율적인 유도 인자였다는 것을 나타낸다.

종합하면, 이들 결과는 모든 TGB 돌연변이가 세포내 PTGS를 유사한 수준으로 복제하고 활성화시켰다는 것을 보여준다. 그러나, 사일런싱의 전신의 퍼짐은 PVX-GFP 구조가 돌연변이를 p25 ORF로 운반했을 때에만 일어났다. 전신의 사일런싱은 p25 ORF 중에 격자이동 돌연변이를 갖는 PVX-GFP 돌연변이에 의하여 개시되었기 때문에 이 블럭은 RNA에 의하여 매개된 효과같지는 않다. 그러므로, 본 발명자들은 p25 단백질는 GFP 이식 유전자의 전신의 PTGS를 억제할 수 있다고 결론지었다.

유전자 이식되지 않은 식물 중의 전신의 사일런싱

전술한 실험은 식물 게놈 중에 그리고 침투된 Agrobacterium의 T-DNA 중에 융합된 GFP 이식 유전자와 관련되어 있기 때문에, 이들은 바이러스에 의하여 감염된 식물 중의 전신의 사일런싱 정도에 대하여 직접적으로 정보를 제공하지 않았다. 임의의 바이러스에 의하여 유도된 효과는 이미 나타난 바와 같이(Voinnet et al., 1998) 이들 이식 유전자에 의하여 증폭되고 재부과되어, 전신의 사일런싱이 유전자 이식되지 않은 식물에서 보다 더 확대되었다. 따라서, 바이러스 감염에 기인한 전신의 시글널링의 좀 더 정확한 이해를 얻기 위하여, 본 발명자들은 유전자 이식되지 않은 식물에서 일련의 실험을 수행하였다. 이들 실험에서 PTGS는 리불로스 비스포스페이트 카르복실라아제의 작은 서브유닛(rbcs)을 암호화하는 내생 유전자에 대하여 표적화되었다. 이전에 나타난 바와 같이, 이 유전자는 PVX에 의하여 유도된 PTGS의 잠재적인 표적이지만, 이식 유전자와는 달리 메커니즘의 개시, 증폭 또는 유지에 관여하지 못한다(Jones et al., 1999). 따라서, rbcs의 전신의 시그널링은 바이러스에 의하여 감염된 세포로부터 시그널이 퍼지는 정도를 나타내는 것 같다. 이들 실험에서의 구조는 rbcs cDNA의 500nt 단편이 GFP ORF내로 삽입된 PVX-GFP-△CP의 유도체이었다(도 1). 이들 유도체는 집합적으로 PVX-rbcs-X로 기재되며, 이때 "X"는 각 개개의 구조에 의하여 운반되는 다양한 돌연변이를 나타낸다. Agrobacterium 침투 과정은 이들 PVX 구조를 유전자 이식되지 않은 식물의 하나 또는 두개의 성장한 잎으로 접종시키기 위하여 사용되었다. 14일 후에, 전신의 새로 나온 잎들을 rbcs의 사일런싱에 대하여 검사하였다. PVX-rbcs-△TGB-△CP 유도체의 접종은 전신의 잎의 엽맥 내 및 그 주변에 황녹색 백화현상으로 명확하게 나타나는 rbsc의 전신의 사일런싱을 일으킨다.

광범위한 GFP 사일런싱과 대조적으로, 지속되는 rbcs 사일런싱은 엽맥 근처에 제한되고 단지 10-16 dpi 내에서 나온 잎들에서만 명백하였다. 이 표현형은 rbcs 유전자의 PTGS와 관련된 재부과-증폭이 결여된 경우와 일치하였고 바이러스에 의하여 유도된 시그널의 직접적인 지표인 것 같다.

[표 2]

GFP 사일런싱에서와 같이, rbcs의 전신의 효과는 25kDa ORF의 돌연변이를 필요로 하였다(PVX-rbcs-△TGB-△CP 및 PVX-rbcs-△25k-△CP에서). 이들 결과로부터, 본 발명자들은 이식 유전자의 부재하에, 바이러스에 의하여 유도된 사일런싱 시그널은 감염된 세포로부터 몇 센티미터를 이동할 수 있으며 주로 엽맥 근체에 국부화된다고 결론지었다. 복제에 결함이 있는 PVX-rbcs-△rep-△CP는 rbcs의 전신의 사일런싱을 유도하지 못하였다. 이 결과는 유전자 이식되지 않은 식물에서 상기 시그널의 생산은 이의 유도를 담당하는 바이러스 게놈의 복제능력에 의존한다는 것을 제시한다. 피토엔 불포화화(不飽和化) 효소 (PDS) 유전자(여기서 피토엔 불포화화 효소 (PDS) cDNA의 중심 영역으로부터 나온 415개의 뉴클레오티드 단편이 상응하는 PVX-GFP 유도체의 GFP ORF 내로 삽입되었다-도 1)에 대하

여 표적화된 PVX-GFP-△CP의 유도체를 가지고 유사한 결과를 얻었다. rbcs에 대한 경우와 같이, 광표백으로서 명확하게 나타나는 PDS의 전신의 사일런싱은 단지 몇몇의 새로 나온 잎의 엽맥 주변에 일시적이고 국부화되어 나타났다. 그것은 또한 PVX 복제에 의존하였다. PDA mRNA는 rbcs mRNA보다 덜 풍부한 여러 단계의 크기이다. 그래서 본 발명자들은 표적 유전자 발현의 수준이 유전자 이식되지 않은 식물 중의 엽맥의 양상 및 전신의 사일런싱의 지속성에 영향을 미친다는 것을 배제할 수 있었다.

p25의 전위 발현 및 전신의 사일런싱

돌연변이 PVX로의 분석은 p25 이외에 기타의 바이러스에 의하여 암호화되는 단백질들이 전신의 사일런싱을 억제하는데 관계가 있다는 것을 배제하지 않았다. 이러한 가능성을 설명하기 위하여, 본 발명자들은 기타의 바이러스에 의하여 암호화된 단백질에 대해 독립적으로 발현된 p25의 존재하에 전신의 사일런싱을 유도하였다. 전신의 사일런싱의 유도는 35S-GFP 구조를 운반하는 아그로박테리움 종의 침투에 의하거나, 기준으로서 PVX-GFP-△25k-△CP 구조를 가지고 하였다(도 1). 이들 종을 35S-25k 구조 또는 35S-25k-△ATG 구조를 함유하고 p25 ORF의 시작 코돈이 제거된 제2의 종과 함께 혼합하였다. 이 실험을 수행하기 위하여, 35S-25k 또는 35S-25k-△ATG 구조를 함유하는 아그로박테리움 종의 배양물을 35S-GFP 또는 PVX-GFP-△25k-△CP 구조를 함유하는 아그로박테리움 종의 배양물과 혼합(동등한 부피)하였다(도 1). 그 이후에 상응하는 현탁 물질을 어린 GFP 유전자 이식 묘목의 하나 또는 두개의 잎 내로 침투시키고, GFP 이식 유전자의 국부적이고 전신의 사일런싱의 개시를 전 시간에 걸쳐 모니터하였다. 값은 식물 10주를 각각 포함하는 독립적인 실험으로부터 얻었다. " 엽맥" 은 전신의 사일런싱이 21 dpi에서 단지 몇몇 잎의 엽맥에서만 명확하게 나타났다는 것을 의미한다.

[표 3]

35S-25k-△ATG와의 구조의 조합은 35S-GFP 구조 단독에 의한 것만큼 신속하고 광범위하게 전신의 사일런싱을 유도하였다. 반면에, GFP의 전신의 사일런싱은 단지 35S-25k 조합으로 침투시킨 몇몇의 식물에서만 일어났다. 또한, 이들 식물에서는, 전신의 사일런싱은 불완전하였고 불완전한 p25 ORF를 가지는 PVX-GFP를 포함하는 실험에서와 같이 몇몇 잎의 엽맥에 제한되었다. 이 결과로부터 본 발명자들은 PVX에 의하여 암호화된 단백질인 p25는 GFP 이식 유전자의 전신의 사일런싱을 방해하기에 충분하다고 결론지었다.

p25의 전위 발현 및 국부적인 사일런싱

전신의 사일런싱에 대한 p25의 효과는 침투된 세포 중에서 시그널 생성의 블럭으로부터 기인한다. 또한, 이 단백질은 세포 내에서 생성된 시그널이 세포 밖으로 이동하는 것을 억제한다. 이들의 서로 다른 것을 조사하기 위하여, PTGS가 개시된 잎에서 RNA 수준 및 GFP 형광의 국부적인 효과를 모니터하였다. 만약 시그널의 이동이 표적화되었다면, 접종된 세포에서의 국부적인 사일런싱은 영향을 받지 않을 것이다. 그러나 시그널 생성에 대한 p25의 효과는 국부적인 사일런싱의 개시에 영향을 미치는 것 같다. 고분자량의 RNA의 노던 블롯을 다음과 같이 수행하였다. 35S-GFP 구조를 35S-25k 구조, 35S-25k-△ATG 구조 또는 물과 조합하여 침투시킨 GFP 식물의 잎으로부터 2.5 및 5 dpi에서 전체 RNA를 추출하였다. 고분자량 RNA 부분의 10 μg에 대하여 전체 길이의 GFP cDNA에 대응하는 프로브를 사용하여 노던 분석을 수행하여 GFP RNA의 축적을 검출하였다. 전기 영동된 겔의 에티듐 브로마이드 염색은 rRNA 로딩을 나타내는데 사용되었다. 5 dpi까지 (35S-25k-△ATG+35S-GFP) 조합으로 또는 35S-GFP 구조 단독으로 침투된 잎에서, 예상대로 국부적인 PTGS의 개시를 나타내는 GFP 형광의 손실이 있었다(데이터는 제시되지 않음). 유사하게, 이들 조직 중의 GFP RNA의 수준은 가장 침투된 조직에서보다 더 낮았으며 GFP 21-23nt 안티센스 RNA는 풍부하였다.

반면에, (35S-25k+35S-GFP) 조합으로의 침투는 침투된 잎에서 녹색 형광을 증가시켰다(데이터는 제시되지 않음). 또한 GFP RNA는 가장 침투된 조직에서보다 이들 조직에서 훨씬 더 풍부하였으며, 이는 아마도 융합된 35S-GFP 이식 유전자 및 전위된 35S-GFP 이식 유전자 모두가 발현되었기 때문이다.

유사하게, GFP 21-23nt 안티센스 RNA는 35S-GFP 또는 (35S-GFP+35S-25k-△ATG)로 침투된 조직에서보다 5배 덜 풍부한 것 이상이었다. 저분자량 RNA의 노던 분석을 수행하여 상기 분석된 5 dpi 샘플에서 21-23nt 안티센스 GFP RNA의 축적을 검출하였다. 로딩은 에티듐 브로마이드 염색 및 각 샘플에서 tRNA의 정량으로 표준화되었다. 사용된 프로브는 전체 길이의 GFP cDNA와 일치하였다.

종합하여, 이들 결과는 p25의 전위, 항상 발현은 침투된 영역 중의 GFP 이식 유전자의 이식 유전자에 의하여 유도된 사일런싱을 억제한다는 것을 나타낸다.

사일런싱의 유도 인자가 복제성 PVX-GFP-△25k-△CP 구조일 때, p25의 효과는 더 복잡해졌다. 고분자량 RNA의 노던 분석을 다음과 같이 수행하였다. PVX-GFP-△25k-△CP 구조를 35S-25k 구조, 35S-25k-△ATG 구조 또는 물과 조합하여 침투시킨 GFP 식물의 잎으로부터 2.5 및 5 dpi에서 전체 RNA를 추출하였다. (PVX-GFP-△25k-CP+35S-25k) 샘플에 있어서, 2.5 dpi에서 모든 고분자량 RNA의 수준은 실제적으로 대조구에서보다 높았다.

이 데이터는 p25가 이러한 초기 시점에서 PTGS의 억제를 일으킨다는 것을 나타낸다. 그러나, 5 dpi까지는 p25가 존재하는 경우에도 표적 RNA는 모두 2.5 dpi에서보다 낮은 수준으로 감소하였다.

이식 유전자로부터 얻은 GFP mRNA는 바이러스 서브게놈 RNA 중의 하나에 의하여 가려졌으나 그것은 가장 침투된 조직에서보다 분명히 덜 풍부했다. 표적 RNA의 수준에서의 감소는 적어도 3개의 독립된 실험에서 관찰되었으며, 이는 2.5 및 5 dpi 사이에서 PVX-GFP-△25k-△CP에 의하여 유발된 국부적 PTGS가 p25의 초기 효과를 극복했다는 것을 나타낸다.

p25가 PVX-GFP-△25k-△CP에 의하여 침투된 조직 중에서 PTGS를 억제하지 못한 것은 21-23nt GFP RNA의 분석에 의하여 확인되었다. 5 dpi에서, 이들 RNA는 35S-25k-△ATG에 의한 경우보다 35S-25k의 존재하에서 2.5배 더 풍부하였으며, 이는 p25가 PVX-GFP-△25k-△CP의 RNA 수준에서의 유사한 차이점과 일치하였다. 따라서, 이들 21-23nt GFP RNA는 주로 바이러스 RNA를 복제하는 것으로부터 생성되는 것 같았다. 이러한 착상과 일치하여, 비복제성 PVX-GFP-△rep-△CP 구조(도 1)를 35S-25k와 함께 침투시킨 조직에서는 단지 낮은 수준의 21-23nt RNA가 있었다.

종합하여, 이들 결과는 유도 인자가 비복제성 이식 유전자 구조(35S-GFP 또는 PVX-GFP-△rep-△CP)인지 또는 복제성 RNA(PVX-GFP-△25k-△CP)인지 여부와 관계없이 전위적으로 발현된 p25는 전신의 사일런싱을 억제하였다는 것을 나타낸다. 반면에, 유도 인자가 비복제성 이식 유전자 구조였다면 국부적인 사일런싱은 단지 p25에 의하여만 억제되었다. 이러한 상황에서, PTGS의 블럭은 21-23nt GFP RNA의 축적 감소와 관련되었으며, 아마도 이들 21-23nt RNA의 전구체의 합성 또는 처리에 대하여 표적화되었을 것이다.

PTGS 경로의 2가지 지류

아라비돕시스 중에서 이식 유전자에 의하여 매개된 PTGS는 뉴클레오티드가 약 21-23개인 짧은 RNA 종의 생산을 포함하고, Sde1에 의하여 암호화된 RdRp 상동성을 요하는 반면, 몇몇의 바이러스에 의하여 유도된 PTGS는 이것도 또한 짧은 RNA를 포함할지라도 Sde1과 독립적인 것으로 보인다(Dalmay et al., 2000). 이들 사실을 설명하기 위하여, 본

발명자들은 식물 중의 PTGS가 초파리에서 RNA 방해를 일으키는 경로의 분지된 변종이라는 것을 제안하였다. 이 경로는 이중 가닥 (ds)RNA를 서열 특이적 뉴크레아제를 위한 가이드 RNA로서 제공하는 짧은 21-23nt RNA로 처리하는 것을 포함한다(Zamore et al., 2000).

본 발명자들의 이전의 제안은 식물의 PTGS 경로 중에 SDE1-의존성 및 SDE1-비의존성 지류가 있다는 것이었다(Dalmay et al., 2000). 두 가지 지류 모두 dsRNA 합성에 의존적이며, 21-23nt RNA의 생성시 또는 그 이전에 합쳐진다. SDE1-비의존성 지류에서 dsRNA는 바이러스의 복제에 의하여 생성된 것이며, 따라서 바이러스에 의하여 암호화되는 RdRp에 의존할 것이다(도 3). 이 모델에 있어서, 상기 경로 중의 Sde1-의존성 지류는 바이러스 RNA에 의하여 영향을 받지 않는다.

이 모델의 관점에서 p25의 효과를 해석하기 위하여, 본 발명자들은 국부적인 PTGS와 전신의 PTGS를 구별한다. 국부적인 PTGS는 35S-GFP 이식 유전자에 의하여 유도되는 경우에는 p25에 의하여 억제되나 유도 인자가 복제성 PVX-GFP-△25k-△CP인 경우에는 그렇지 않았다. 따라서, 이 모델에 따르면(도 3a), p25는 상기 경로 중의 Sde1-의존성 지류의 억제제가 될 것이다. 반면에, 전신의 PTGS는 유도 인자가 35S-GFP 이식 유전자인지 또는 복제성 PVX-GFP-△25k-△CP인지 여부에 관계없이 p25에 의하여 억제되었다. 또한, 바이러스에 의하여 유도된 전신의 사일런싱에 대한 p25의 효과는 상기 경로 중의 Sde1-의존성 지류가 이식 유전자 특이적 과정이고 바이러스 RNA에 의하여 영향을 받지 않는 도 3a에 제시된 모델과 조화되기 어려웠다.

대체로, 이들 데이터는 다수의 p25 표적을 갖는 분리된 경로가 있어서 국부적인 사일런싱 및 전신의 사일런싱을 일으키는 것으로 나타낼 수 있었다. 이는 바이러스에 의하여 유도된 단백질이 이식 유전자에 의하여 유도되지만 복제성 바이러스에 의하여는 유도되지 않는 국부적인 PTGS를 억제할 것을 요하기 때문에 불가능한 것으로 보였으나 본 발명자들은 그 가능성을 배제할 수 없었다. 그 대신에, 본 발명자들은 p25가 국부적인 사일런싱 및 전신의 사일런싱을 위하여 필요한 단일의 표적을 갖는다는 또 다른 설명을 지지한다. 이 설명에 따르면, 전신의 시그널은 상기 경로 중 SDE1-의존성 지류에서 생성될 것이며, 따라서 짧은 RNA의 전구체가 될 것이다.

이 '단일의 표적' 설명은 SDE1-의존성 지류가 바이러스에 의하여 영향을 받지 않는 개량된 종전의 PTGS 모델을 포함한다(도 ea). 개량된 모델에 있어서(도 3b), 바이러스에 의하여 유도된 국부적 PTGS는 이미 설명된 바와 같은 상기 경로 중의 SDE1-비의존성, p25-둔감성 지류를 포함할 것이다. 그러나, SDE1-의존성, p25-민감성 지류는 바이러스에 의하여 유도되는 것으로 인식된다(도 3b). 이러한 변화의 결과로서, 상기 모델은 전신의 시그널 생성이 PVX 복제에 의하여 영향을 받고 p25에 의하여 억제된다는 사실을 수용한다.

이 개량된 발명의 추가의 매력은 그것은 Sde1에 의한 본 발명자들의 결과와, Sde1과 동일한 Sgs2에 의한 뮤라인(Mourrain) 등(2000)의 결과 사이의 명백한 모순을 해결한다는 것이다. 본 발명자들은 자신들의 분석에서 Sde1/Sgs2의 돌연변이는 담배 모자이크 바이러스, 담배 래틀 바이러스(tobacco rattle virus) 및 순무 주름 바이러스(turnip crinkle virus)에 대한 감수성에 영향을 미치지 않는 반면(Dalmay et al., 2000), 뮤라인 및 동료들은 이 유전자 좌에서의 돌연변이는 오이 모자이크 바이러스에 대한 과도한 민감성을 일으킨다는 것을 밝혔다(Mourrain et al., 2000). 생각컨데, 시험된 바이러스 중 CMV는 RNA 축적이 전신의 PTGS에 의하여 강하게 제한되는 유일한 것이기 때문에 이 2가지의 데이터가 다르다. 기타의 바이러스는 전술한 바와 같이 Sde1에 의존하지 않는 국부적인 PTGS에 의하여 가장 많이 제한된다.

바이러스 억제제를 사용한 PTGS의 해체

실시예 1 내지 8에 있어서, 이식 유전자에 의하여 유도되는 GFP의 PTGS를 나타내는 식물의 감염은 다양한 바이러스 억제제가 관련되는 것으로 나타났다. PVY 및 기타의 바이러스에 의하여 감염된 조직의 일부 또는 전부에서 GFP가 증가하였으며, 이는 상응하는 바이러스가 PTGS의 억제제를 암호화했다는 것을 나타낸다(Brigneti et al., 1998; Voinnet et al., 1999). 반면에, PVX에 의하여 감염된 식물에 있어서, PTGS가 되돌려지지 않았으며 본 발명자들은 처음에는 이 바이러스가 억제제를 암호화하지 않는다고 결론지었다.

그러나, 여기에 제시된 데이터의 관점에 있어서, 구체적으로 p25의 전위 발현에 있어서, PVX가 PTGS의 억제제를 암호화한다는 것은 분명하다. PVX의 p25 단백질 및 PVY의 HcPro를 비롯한 PTGS의 기타의 억제제는 유전자 사일런싱 메커니즘에서 상이한 단계에 작용하기 때문에 PVX의 이러한 특성은 이전의 실시예에서 분명하지 않았던 것 같다.

Hcpro 및 p25가 유전자 사일런싱의 상이한 단계를 표적화하는 것은 바이러스에 의하여 유도된 PTGS를 억제하는 이들의 상이한 능력으로부터 가장 명확하게 나타난다. HcPro는 바이러스에 의하여 유도된 GFP의 PTGS를 억제하는 반면(Anandalakshmi et al., 1998), p25는 그렇지 않다는 것이 현재 및 과거의 연구에서 분명하다. 또한, 도 3b의 도식에 따르면, HcPro는 SDE1-의존성 및 SDE1-비의존성 지류의 합류 후 어느 시점에서 PTGS에 작용해야만 한다. 본 발명자들은 시그널 생성이 두 지류가 합류되기 전에 일어나야 한다고 제안했기 때문에, 본 발명자들은 HcPro가 전신의 PTGS를 억제하지 않을 것이라고 예상한다. 접목 실험으로부터 나온 최근의 데이터는 이 예상을 확인하며 이에 의하여 PTGS의 상이한 바이러스 억제제의 분석이 기초가 되는 메커니즘에 대하여 어떻게 정보를 제공하는지 설명한다.

실시예 10

아그로박테리움에 의하여 매개된 일시적인 발현에서 유전자 사일런싱의 바이러스에 의하여 암호화된 억제제의 사용

10.1 아그로박테리움에 의하여 매개된 유전자 발현의 일시적인 성질은 T-DNA내에 삽입된 서열에 대하여 표적화된 전사 후 유전자 사일런싱의 강한 활성화에 의하여 설명된다.

녹색 형광 단백질(GFP)를 암호화하는 유전자는 35S 프로모터 및 Nos 터미네이터의 조절하에서 클론화되었다. 이어서 그 결과물인 발현 카세트를 pBin19 바이너리 벡터의 T-DNA내로 삽입하였다. 그 이후에 헬퍼 플라스미드 pCh32(Hamilton et al (1996) PNAS 93 pp9975-9979)를 운반하는 아그로박테리움 종 c58c1(Farrand et al (1989) J. Bacteriology 171 pp 5314-5321)는 상기 결과물인 플라스미드로 전기천공되었다. 유전자 이식되지 않은 Nicotiana benthamiana의 하나 또는 몇 개의 성숙한 잎을 미리 10mM $MgCl_2$로 재현탁하였던 상응하는 아그로박테리움 종의 포화된 배양물로 침투시키고 100 μM 아세토시린곤으로 항온시켰다. 침투는 전술한 바와 같이 주사로 수행하였다.

접종 후 2.5일(dpi)에, 침투된 조직은 손바닥 크기의 UV 램프로부터의 조명하에서 녹색 형광을 나타내었다. 이 녹색 형광은 아그로박테리움으로부터 나온 T-DNA가 식물 세포내로 수송되었으며 리포터 유전자의 일시적인 발현이 개시되었다는 것을 나타내었다. 2.5 dpi에서 시작하여, 2일 간격으로 침투된 잎을 식물로부터 제거하였다. 잎 샘플을 11 dpi까지 수집하였다. 이들 샘플로부터 전체 RNA을 추출하고, 전체 길이의 GFP cDNA에 상응하는 프로브를 이용하여 고분자량 및 저분자량 부분의 추출된 RNA에 대하여 노던 분석을 수행하였다.

고분자량 부분의 분석에서 GFP mRNA는 2.5 dpi에서 풍부했음이 나타났다. 4-5 dpi에서도 여전히 풍부했으나, 그 이후 시점에서는 시그널의 손실이 진행되었고 11 dpi에서는 GFP mRNA이 노던 검출의 수준 또는 그 이하였다. GFP mRNA의 이러한 감소는 전 시간동안 UV 조명하에서 관찰된 녹색 형광의 감소와 일치하였다. ≥4 dpi에서 녹색 형광은 감소하기 시작하였고 ≥7.5 dpi에서 검출할 수 없었다.

짧은 21-23nt RNA는 식물에서의 전사 후 유전자 사일런싱(PTGS) 및 C.elegans와 초파리에서의 RNA 관여(RNAi)의 독특한 마커이다. 이들 과정은 메커니즘에서 관계가 있으며 RNA의 서열 특이적 이용률에서 관련된다. 21-23개의 뉴클레오티드 RNA 종은 PTGS/RNAi에 관계된 세포 장치의 주요한 성분의 특징을 나타냈다. 이들은 분해 시스템의 특이성 결정소로서 작용하는 것 같다.

5 dpi에서, 침투된 잎으로부터 추출된 저분자량 RNA는 유사한 분자 크기의 마커로서 분해된 GFP 플라스미드 DNA를 가지고 전기 영동에 의하여 분리되었다(Hamilton and Baulcombe, 1999). RNA 및 DNA는 나일론 막으로 운반되었다. 이어서 T7 RNA 폴리머라아제(Promega)를 사용하여 이 막을 선형 GFP 플라스미드의 실험실내 전사에 의하여 생산된 안티센스 특이적 GFP RNA^{32} P 표지된 프로브와 하이브리드시켰다(Hamilton and Baulcombe, 1999).

RNA 블롯은 많은 양의 GFP 특이적 21-23nt RNA가 아그로박테리움의 35S-GFP 종으로 침투된 유전자 이식되지 않은 N.benthamiana의 조직내에 축적되었음을 나타내었다. 또한, 이들 RNA 종의 풍부함은 안정하게 융합된 GFP 이식 유전자의 PTGS를 나타내는 유전자 이식 식물에서만큼 높았다(트랙 3). 35S-GFP 종을 아그로박테리움의 p19 종과 함께 침투하면 GFP mRNA를 증가시켜 결과적으로 단백질의 축적을 초래한다는 것이 추가로 확인되었다(후술함). 예상대로, 23-21nt RNA의 수준은 5 dpi에서 이들 샘플로부터 검출 한계 이하였다.

종합하면, 이들 결과는 유전자 이식되지 않은 N.benthamiana 중의 GFP 이식 유전자의 일시적인 발현이 식물에 의하여 활성화된 강한 PTGS 반응에 의하여 억제된다는 것을 나타낸다. 또한, 짧은 RNA 종의 양은 추가의 시간(예를 들어 11 dpi까지)에 수집된 조직에서 증가하였다.

이들 데이터로부터, 본 발명자들은 시간에 따른 GFP mRNA의 불안정성 및 아그로박테리움에 의하여 침투된 조직 중의 녹색 형광의 중단 결과는 상기 유전자(예를 들어 GFP 유전자)에 대하여 표적화된 PTGS의 매우 강한 활성화에 의하여 일어난다고 결론지었다. PTGS의 활성화는 아그로박테리움에 의하여 매개된 유전자 발현의 일시적인 성질을 전부 설명할 수 있다.

10.2 PTGS의 바이러스에 의하여 암호화된 억제제의 일시적인 발현은 유전자 이식되지 않은 N.benthamiana 중에서 아그로박테리움에 의하여 매개된 유전자 발현에 대한 강한 유전자 사일런싱 반응을 억제한다.

전술한 바와 같이, 포티바이러스의 HcPro, 쿠쿠모바이러스의 2b 단백질, 아프라카 카사바 모자이크 바이러스로부터의 Ac2 단백질, 소베모바이러스의 P1 단백질 및 톰버스바이러스의 19k 단백질은 PTGS의 바이러스에 의하여 암호화된 억제제이다. 모든 이들 단백질은 감자 바이러스 X(PVX) 벡터로부터 발현되었을 때 GFP의 PTGS를 나타내는 유전자 이식 식물의 조직 일부 또는 전부 중에서 GFP 발현을 회복하였기 때문에 PTGS의 억제제로 확인되었다. 또 하나의 단백질인, PVX에 의하여 암호화된 25kDa 단백질도 역시 유전자 사일런싱의 억제제로 확인되었다. 이 단백질은 PTGS 전신의 시그널 생성을 억제하여 이식 유전자 사일런싱을 폐기하는 것으로 나타났다.

상기 억제제들이 유전자 이식되지 않은 식물 중에서 아그로박테리움에 의하여 매개된 일시적인 발현을 할 때 활성화된 강한 PTGS 반응에 대하여 효율적인지를 시험하기 위하여, 이들 단백질을 암호화하는 유전자를 35S 프로모터 및 35S 터미네이터의 조절하에서 클론화되었다. 이어서 결과물인 발현 카세트를 pBin19 바이너리 벡터의 T-DNA내로 삽입하였다. 이어서 헬퍼 플라스미드 pCh32를 운반하는 아그로박테리움 종 c58cl을 상응하는 플라스미드로 전기천공시켰다.

이들 실험에 있어서, GFP 유전자가 리포터 유전자로서 사용되었다(10.1에 기재됨). GFP 리포터를 운반하는 아그로박테리움 종을 전술한 PTGS 억제제 중의 하나를 함유하는 또 하나의 아그로박테리아 종과 혼합하였다(동등한 부피). 유전자 이식되지 않은 N.benthamiana의 잎의 침투 후에, 녹색 형광의 외관 및 지속은 UV 조명하에서 측정되었다. 이들 공침투는 포화된 아그로박테리움 배양물로 수행되어 상응하는 T-DNA의 최적의 공수송을 확실하게 했다.

4-5 dpi에서, 공침투 조직 전부는 GFP 종 단독으로 침투된 조직보다 더 밝은 것이 분명하였다. 이 효과는 19k 단백질의 경우 가장 극적으로 나타나 강력한 연녹색 형광을 나타내었다. 또한 HcPro 및 25kDa 단백질의 경우 시각적으로는 덜 강력하지만 효과는 매우 강력하였다. 2b의 효과는 HcPro 및 25kDa 단백질의 효과보다 덜 강력하였으며, Ac2의 효과는 2b 단백질 중의 하나보다 덜 강력하였다. P1의 효과는 가장 약했으나 대조구에 비하여 여전히 유의성이 있었다. 모든 이들 시험은 각 처리에 대하여 10주의 식물을 포함하면서 적어도 4번 반복되었으며(처리군 당 40주 식물) 유사한 결과를 낳았다. 침투된 조직은 이 시점에서 어떠한 독성 징후도 나타내지 않았다.

리포터 유전자 발현에서 관찰된 변화를 정량하기 위하여 이들 조직으로부터 추출된 전체 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 GFP 항체를 사용하여 수행하였다. 19k, HcPro 및 25kDa 단백질의 관찰된 효과로부터, GFP 발현은 적어도 10배가 될 것으로 기대되었으며, 대조구 조직의 발현보다 50배 더 높을 수도 있다.

GFP 발현은 초기 시점(4-5 dpi)에 더 강할 뿐만 아니라 또한 시간이 지난 후에도 상당히 지속되었다. 예를 들면, 강한 녹색 형광이 19k 및 HcPro로 공침투된 조직에서 18 dpi에서 여전히 관찰되었고 이 형광은 잎이 노화될 때까지 지속되었다. 기타의 억제제의 효과는 시간이 흐름에 따라 덜 지속되었고 ≥12 dpi에서 더 이상 관찰되지 않았다. 또한 본 발명자들은 25kDa가 공침투된 조직은 7 dpi근처에서 괴저성으로 명백히 나타나는 독성의 징후를 나타내었다.

GFP 발현에 대한 이들 효과가 PTGS의 억제에 기인한다는 것을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 샘플로 된 조직 중의 고분자량 및 저분자량 RNA에 대하여 분석하였다. 이 결과는 상기 형광 데이터와 일치하였다. 5 dpi에서, 19kDa, HcPro 및 25kDa로 공침투된 조직 중에서 GFP 21-23nt RNA의 수준은 대조구 샘플(GFP 단독) 중의 21-23nt RNA의 수준과 비교하여 볼 때 크게 감소하였다(6배 이상). 2b 및 AC2로 공침투된 샘플 중에서 이들 RNA는 대조구 샘플(GFP 단독)에서보다 적어도 3배 덜 풍부하였다. 놀랍게도, P1이 공침투된 조직에서 유일한 하나의 종(23nt)이 강하게 영향을 받았다. 11 dpi에서, 2b, Ac2 및 P1 단백질로 공침투된 조직 중에 더 높은 수준의 21-23nt RNA가 있었다. 그러나, 19k- 및 HcPro-공침투된 조직 중에서 이들 수준은 낮은 상태로 유지되었다. 11 dpi에서, 25kDa로 공침투된 조직의 분석은 잎의 괴저성에 의하여 제한되었다(전술됨).

이들 결과로부터, 본 발명자들은 PTGS의 바이러스에 의하여 암호화된 억제제의 일시적인 발현은 아그로박테리움에 의하여 유전자 이식되지 않은 식물로 일시적으로 전달되는 유전자의 발현을 상당히 향상시킨다고 결론지었다.

10.3 유전자 이식되지 않은 식물 중에서 일시적인 발현을 향상시키고 안정화하는 PTGS 억제제의 추가의 효과

상기 실험들은 억제제들과 GFP 리포터 유전자의 조합을 사용하여 반복되었다. 억제제의 조합은 개개의 아그로박테리움 배양물(포화된 배양물)을 함께 혼합하고 GFP 배양물 내에 이들을 조합함으로써 간단히 이루어졌다. 상이한 혼합물의 침투 후에, 본 발명자들은 높은 수준의 녹색 형광이 억제제들의 조합 후에 달성되었다는 것을 밝혀냈다:

(ⅰ) 2b+P1은 개개의 2b 또는 P1 침투에서 보다 더 큰 형광을 나타냈고,

(ⅱ) Ac2+P1은 개개의 Ac2 또는 P1 침투에서 보다 더 큰 형광을 나타냈으며,

(ⅲ) Ac2+2b 조합은 2b 또는 Ac2 각각의 처리에 비하여 형광의 상당한 증가를 나타내지 않았다.

본 발명자들은 또한 (2b+HcPro+Ac2+P1) 혼합물을 GFP 리포터 배양물과 혼합하는 효과를 시험하였다. 이 경우에 있어서, 강력한 연녹색 형광(19k 단독의 효과와 유사함)이 침투된 조직에서 관찰되었고 18일까지 동안 시각으로 관찰되었다.

관찰된 높은 수준의 GFP를 확인하기 위하여 이들 잎 샘플에서 웨스턴 블롯 분석을 수행할 수 있다.

이들 억제제의 추가/상승적인 효과에 대한 추가 실험에서, 본 발명자들은 (2b+HcPro+Ac2+P1) 샘플 중의 21-23nt RNA의 수준을 분석하였다. 5 dpi에서, 이들 RNA 종은 형광 데이터에 따르면 검출 수준 또는 그 이하였다.

그러나, 유전자 발현의 증가가 PTGS의 억제제 조합으로부터 발생할 수 있다는 것은 이미 명백하다.

아그로박테리움의 일시적인 발현 시스템에서 PTGS의 억제제와 최소 PVX-GFP 암플리콘의 혼합

이전의 실시예에 기재된 바와 같이, PVX-GFP 구조를 조작하여 외피 단백질의 오픈 리딩 프레임을 바이러스 게놈으로부터 제거함으로써 식물 중에서 바이러스 이동을 방지하였다. 그 후 35 프로모터 및 Nos 터미네이터의 조절하에서 이 구조를 클론화하고 이어서 pBin19의 T-DNA내로 도입하였다. 이어서 상기 플라스미드를 pBin19 바이너리 벡터의 T-DNA내로 삽입하였다. 헬퍼 플라스미드 pCh32를 운반하는 아그로박테리움 종 c58cl을 플라스미드로 전기천공시켰다.

그 후에, 본 발명자들은 3)에서 기재된 바와 같이 최소의 PVX-GFP 암플리콘을 PTGS의 다양한 억제제와 혼합하고 상응하는 배양물을 유전자 이식되지 않은 N.bemthamiana의 잎으로 도입하였다. 본 발명자들은 매우 밝은 녹색 형광이 공침투된 조직에서 생성되었음을 발견하였다. 이 녹색 형광은 35S 프로모터를 GFP 마커 유전자를 PTGS의 억제제(이는 2) 및 3)에 기재됨)와 함께 유도하기 위하여 사용하였을 때보다 더 강력하였다. 이 결과는 PVX 암플리콘에 의하여 정상적으로 강하게 활성화된 사일런싱은 억제제에 의하여 감소되었고 강력한 발현이 바이러스 복제, GFP 리포터 유전자를 유도하는 sgRNA의 합성 및 번역을 통하여 일어날 수 있었다는 것을 제시한다.

실시예 11

유전자 이식되지 않은 식물 중에서 단백질 합성을 증가시키기 위한 PTGS의 억제제 및 일시적인 발현의 사용

이후의 2개의 실시예에서는 유전자 사일런싱의 억제제의 사용이 일시적인 발현 분석에서 어떻게 단백질의 축적을 상당히 향상시키고 유지할 수 있는지를 설명한다. 이하에 기재된 모든 실시예는 유전자 이식되지 않은 식물에서 수행되었다.

11.1 식물 유전자 CDPK의 발현

이 실험의 목적은 토마토 칼슘 의존성 단백질 키나아제(CDPK, Romeis et al., 2000) 중 담배 상동 부분의 절단된 형태를 일시적으로 발현시켜 검출하는 것이다. 과잉 발현을 위하여 사용된 식물은 Nicotiana benthamiana이었다.

담배 CDPK 단편(부록 Ⅰ)에 상응하는 cDNA를 35S 프로모터 및 35S 터미네이터의 조절하에서 표준 방법을 사용하여 블런트(blunt) 말단 단편으로 pBin19 바이너리 벡터의 T-DNA의 Sma I 사이트에 삽입하였다. 이어서 상응하는 플라스미드를 전기가 충분한 아그로박테리움 세포(과잉 전염성 플라스미드 pCh32를 운반하는 종 c58cl) 내로 전기천공시켰다. 재조합 박테리아(CDPK 종으로 기재됨)는 28 단계에서 배양되었고 분리된 하나의 콜로니를 표화된 배양물을 생성하기 위하여 사용하였다. 이어서 이 배양물을 전술한 바와 같이 10mM $MgCl_2$ 내에서 재현탁시키고 아세토시린곤으로 유도하였다. 이 유도된 배양물을 광학 밀도 0.5(600nm)으로 되게 하였다.

N.benthamiana의 잎을 아그로박테리움 현택액으로 침투시킨 후에, CDPK의 축적을 검출하기 위하여 경시적인 분석을 수행하였다. p19 cDNA가 35S 프로모터 및 35S 터미네이터의 조절하에서 클론화된 pBin19바이너리 벡터를 운반하는 아그로박테리움(p19 종)의 제2 현탁액으로 공침투된 조직으로부터 유사하게 비슷한 경시적 분석을 수행하였다. 이 제2 아그로박테리움 배양믈은 LD_{600} =1.0에서 사용되었다.

침투된 조직으로부터 추출된 총 단백질 중 가용화된 막 부분의 10 μg에 대하여 수행된 웨스턴 블롯에 의하여 CDPK를 검출하였다. HA 에피토프 태그 서열(Niman et al., 1983)을 CDPK cDNA의 3' 말단에 추가하였다. 문헌[Romeis et al., 2000]에 기재된 바와 같이 HA 항체(Sigma)를 면역검출을 위하여 사용하였다. 시그널의 정량은 막바스(MacBas) 소프트웨어를 사용하여 수행하였다(Koshin Graphics Systems Inc, USA).

결과

초기 시점에서(즉 접종 후 1.5일 전에), CDPK는 양 실험 장치 모두에서 검출될 수 없었다. 그러나, 1.5 dpi에서 시작하여 CDPK 종 단독으로 침투되었던 조직으로부터 생산된 낮은 수준의 CDPK가 검출될 수 있었다. 2 dpi에서 이들 수준은 약간더 높아졌다(1.5 dpi에서의 수준보다 2배 더 많음). 그러나, 3 dpi에서는(5 dpi까지) 시그널이 웨스턴 블롯 검출 수준 또는 그 이하였다. 또한, 비어있는 pBin19 벡터(즉 T-DNA내에 삽입물이 없음)를 운반하는 아그로박테리움 배양물의 배양물로 침투되었던 주직으로부터 추출된 샘플에서는 어느 시점에서도 시그널이 검출되지 않았다.

반면에, 1.5 dpi에서, 아그로박테리움의 p19 종과 함께 침투된 조직으로부터 나온 CDPK의 수준은 전술한 대조구 실험에서의 수준보다 이미 적어도 3배 높았다. 2 dpi에서, 이들 수준은 CDPK 단독으로 침투시킨 조직으로부터 나온 것 보다 적어도 5배 높았다. CDPK는 CDPK 단독으로 침투된 샘플에서는 3 dpi 및 그 이후 시점에 검출할 수 없었지만, p19와 함께 침투된 조직에서 관찰된 수준은 증가하였으며 대조구 샘플에서 2 dpi에 관찰된 최대 수준보다 적어도 10배 높았다. CDPK 수준의 정확한 정량은 p19의 존재하에 만들어진 매우 많은 양의 단백질에 의하여 약화되어 시그널의 포화를 초래하였다. 50배까지 더 많은 단백질이 생산될 것이 기대된다. 이들 높은 수준의 CDPK는 5 dpi 또는 그 이상까지 수집된 샘플에서 여전히 검출될 수 있었다.

결론

p19의 부가는 CDPK의 발현을 상당히 증가시켰을 뿐만 아니라, 이는 또한 3 dpi 및 그 이후 시점에서 이 단백질의 분해를 억제하는 것으로 보였다. 그러므로 p19 단백질은, 이것의 항 사일런싱 특성의 관점에서 볼 때, 매우 높은 수준의 CDPK mRNA를 세포내에 축적하도록 하였다는 것이 이 효과의 가장 적절한 해설일 것이다. 이어서 이들 mRNA는 식물의 단백질 분해 장치가 포화될 정도로 번역되어서 과도의 불안정한 단백질이 최정점에 이르게 하였다.

p19 및 CDPK 종 모두의 포화된 배양물의 사용은 이미 더 높은 수준의 단백질을 생산하였을 것이다.

11.2 식물 저항성 유전자의 발현

이 실시예는 일시적인 발현 분석에서 p19의 단백질 합성에 대한 효과가 CDPK에 특유한 것이 아니라는 것을 설명한다.

또 하나의 일련의 실험에 있어서, 본 발명자들은 p19의 존재하에 N.benthamiana 중에서 일시적으로 발현되는 2종의 토마토 단백질의 축적 수준을 평가하였다. 이들 두 종의 단백질은 Cf4 및 Cf9 저항성 유전자 산물이며, 토마토 중의 Cladosporium fulvum에 대하여 저항성을 부여하였다.

이들 실험의 원리는 전술한 바와 동일하다. 첫째로, Cf4 및 Cf9를 암호화하는 cDNA는 TAP(Rigaut et al., 1999) 에피토프 TAG의 서열과 융합되었고 35S 프로모터 및 35S 터미네이터의 조절하에서 pBin19의 T-DNA로 삽입되었다. 이어서 결과물인 플라스미드를 아그로박테리움 세포(과잉 전염성 플라스미드 pCh32를 운반하는 종 c58cl) 내로 전기천공시켰고 하나의 콜로니를 광학 밀도 0.2(600nm)에서 배양물을 생성하기 위하여 사용하였으며, 각각은 Cf4TAP 및 Cf9TAP 종으로 기재되었다. 아그로박테리움의 p19 종은 전술되었으며 OD_{600} =1.0에서 사용되었다.

Cf4 및 Cf9의 검출은 침투된 조직으로부터 추출된 총 단백질 중 10μg에 대하여 수행된 웨스턴 블롯 분석에 의하였다. 페록시다아제 항 페록시다아제 항체(sigma)는 문헌[Romeis et al., 2000]에 기재된 바와 같이 면역검출을 위하여 사용되었다. 시그널의 정량은 막바스(MacBas) 소프트웨어(Koshin Graphics Systems Inc, USA)를 사용하여 수행되었다.

결과

침투 후 5일에 분석은 상응하는 아그로박테리움 종이 p19 종의 부재하에 침투되었을 때 Cf4TAP 및 Cf9TAP 양자 모두가 검출 수준 이하였음을 나타낸다. 그러나, p19 배양물이 함께 공침투된 샘플에서는 양 단백질이 쉽게 검출되었다.

실시예 12

비식물 단백질의 발현 증가

실험의 기타의 세트에 있어서, 해파리의 Aequoria victoria로부터 나온 녹색 형광 단백질(GFP)의 변형된 cDNA(GFP$_5$, Haseloff et al., 1997)은 35S 프로모터 및 35S 터미네이터의 조절하에서 표준 기법을 사용하여 pBin19 바이너리 벡터의 T-DNA내로 클론화되었다. 이어서 결과물인 벡터는 전기가 풍부한 아그로박테리움(과잉 전염성 플라스미드 pCh32를 운반하는 종 c58cl) 내로 전기천공되었다. 실시예 10 및 11에 기재된 바와 같이 이들 박테리아를 증식시키고 아세토실린곤으로 유도하였다. 포화된 배양물(GFP 종으로 기재됨)은 야생형 Nicotiana benthamiana의 잎을 침투시키기 위하여 사용되었다.

실험의 유사한 세트에 있어서, GFP 종을 아그로박테리움의 p19 종과 함께 혼합하였고(동일한 부피)(실시예 1 및 2 참고) 이어서 결과인 혼합물을 야생형 Nicotiana benthamiana의 잎으로 침투시켰다. 이 실험에 있어서, p19 종의 배양물는 광학 밀도 (600nm) 2.0이었다.

또한, 고도로 발현된 단일 복제물 GFP 이식 유전자를 운반하는 두 개의 독립되고 안정한 Nicotiana benthamiana의 형질변환체(라인 16c 및 8, Ruiz et al., 1998; Voinnet et al., 1998)는 이들 실험에서 기준으로 사용되었다.

침투된 조직 중의 GFP의 축적은 UV 조명하에서 전 시간동안 측정되었다. GFP의 정량은 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 나온 토끼의 항 GFP 항체를 사용하여 면역검출에 의하였다. 샘플을 접종 후 4일(dpi)에 채취하고, 총 단백질을 추출하여 일부(30 μl)를 문헌[Romeis et al., 2000]에 기재된 바와 같이 웨스턴 블롯에 의하여 분석하였다. 정량은 막바스(MacBas) 소프트웨어(Koshin Graphics Systems Inc, USA)를 사용하여 수행되었다.

결과

GFP 종 단독으로 침투된 조직에 있어서, 2-2.5 dpi에서 5 dpi까지 시각으로 검출가능한 GFP의 축적이 있었다. 이 시점 이후에, 녹색 형광이 감소하여 7 dpi에서 침투된 조직은 가장(물) 침투된 조직과 구별될 수 있었다. 4 dpi에서, 2개의 독립적인 샘플에 대하여 수행된 웨스턴 블롯은 GFP 발현(일시적인 발현)의 이러한 신속한 감소에도 불구하고 2개의 안정한 유전자 이식 라인으로부터 추출된 동등한 조직에서보다 GFP가 2배 더 많았다는 것을 나타내었다. 이 결과는 아그로박테리움에 의하여 매개된 일시적인 발현이 일시적으로 안정된 형질전환에 의하여 이루어진 경우보다도 더 높은 단백질 수준을 유도할 수 있다는 것을 나타낸다. 예상대로, 물로 침투시킨 조직으로부터 추출된 샘플에서는 GFP가 검출되지 않았다.

아그로박테리움의 p19 종과 함께 공침투된 조직에서, UV 광선하에서 강한 녹색 형광이 있었으며, 이는 11일 이상 지속되었다. 또한, 2개의 독립된 샘플의 웨스턴 블롯 분석은 4 dpi에서 GFP 종 단독으로 침투된 유사한 조직(판넬 A) 보다 이들 조직에서 적어도 10배 더 많은 GFP가 있었다는 것을 나타내었다. 또한, 이들 수준은 2개의 안정한 GFP 형질전환체로부터 생성된 것들보다 적어도 15배 더 높았다.

결론

상기 실시예에서와 같이, p19의 효과는 외래 단백질의 발현을 (ⅰ) 상당히 증가시키고 (ⅱ) 지속시키는 것이었다. 또한 상기 발현은 안정하게 형질전환된 식물에서 보다 훨씬 더 높았다.

실시예 13

유전자 사일런싱의 억제제 및 일시적인 발현의 혼합된 사용은 효소 반응으로부터 발생한 산물의 합성을 증가시킬 수 있다.

PVX RNA-의존성 RNA 폴리머라아제(RdRp, Malcuit et al., 2000)의 cDNA 단편은 표준 기법을 사용하여 변형된 GFP(GFP_4, Haseloff et al., 1997)를 암호화하는 cDNA의 3' 말단에 융합되었다. 감자 바이러스 Y(PVY)의 Nia 단백질 가수 분해 효소에 대한 절단 사이트를 암호화하는 짧은 서열을 양 cDNA 사이에 삽입하였다(Mestre et al., 2000). GFP-RdRp 융합 cDNA(하기의 서열 참고)를 pBinY53 바이너리 벡터의 T-DNA내로 삽입하였다(Mestre et al., 2000). 이어서 결과물인 벡터를 전기가 풍부한 아그로박테리움(과잉 전염성 플라스미드 pCh32를 운반하는 종 c58cl) 내로 전기천공시켰다. 실시예 1, 2 및 3에 기재된 바와 같이, 이들 박테리아(GFP-RdRp 종으로 기재됨)를 증식시키고 아세토시린곤으로 유도하였다. 이 구조는 Nia 단백질 가수 분해 효소의 작용에 의하여 유리 GFP_4의 방출을 허용하는 Nia 단백질 가수 분해 효소의 절단 사이트를 운반하는 융합 단백질[GFP_4아미노 말단/RdRp 카르복시 말단]을 생산하였다. Pro라고 개지되는 또 하나의 아그로박테리움 종은 Nia 단백질 가수 분해 효소로부터 나온 프로테아제 도메인의 발현을 허용하는 pBinYPro 바이너리 벡터를 함유하였다(Mestre et al., 2000).

결과

GFP-RdRp 종의 배양물의 침투는 UV 조명하에서 가시적인 녹색 형광을 일으키지 않았으며, 이는 GFP-RdRp 단백질 융합이 GFP를 불활성으로 만들었다는 것을 나타낸다. 그러나, 아그로박테리움의 Pro 종을 GFP-RdRp 종과 혼합하였을 때, 2 dpi 내지 5 dpi에서 녹색 형광이 UV 조명하에서 검출되었다. 이 결과는 pBinYpro에 의하여 생산된 Nia 프로테아제가 융합 GFP-RdRp 단백질을 잘름으로써 유리 GFP_4의 방출을 허용하여 녹색 형광을 일으킨다는 것을 나타낸다.

이어서 상기 분석은 아그로박테리움의 p19 종의 존재하에 반복되었다. 이러한 실험에서, Pro, GFP-RdRp 및 p19 종의 배양물을 함께 혼합하고(1:1:1 혼합) GFP의 축적을 전 시간에 걸쳐 측정하였다. 3dpi에서, 침투된 조직에서 강한 연녹색 형광이 있었다. 이 형광은 이후 시점에서 지속되었다.

3 dpi에서의 웨스턴 블롯 분석(실시예 3 에서 기재된 바와 같음)은 Pro/ GFP-RdRp/p19 조합으로 침투된 조직에서 생산된 유리 GFP_4의 수준이 Pro/ GFP-RdRp(판넬 B)9로 침투된 유사한 조직보다 적어도 6배 더 높았다는 것을 나타내었다.

결론

GFP-RdRp 단백질 융합은 UV 광선하에서 형광을 발하지 않는다(이것은 카르복시 말단의 융합이 GFP4 단백질의 적절한 접힘을 방해하기 때문일 수 있다). 이 해석은 녹색 형광이 Nia 단백질 가수 분해 효소의 존재하에 회복되어 유리 GFP_4의 축적을 일으켰다는 사실에 의하여 지지된다. 따라서, Pro/ GFP-RdRp/p19으로 침투된 조직 중의 높은 수준의 유리 GFP_4는 GFP-RdRp 융합 단백질 기질의 높은 수준을 표적화하는 Nia 단백질 가수 분해 효소의 단백질 분해 활성의 증가로부터 기인한다고 생각되어진다. 이러한 T-DNA 구조로 식물 세포 내로 도입된 기질 및 효소 양자 모두의 높은 수준은 p19의 항 사일런싱 특성으로부터 기인하는 것 같다. 그러므로 GFP-RdRp 및 Pro mRNA는 높은 수준으로 축적될 수 있었으며 이어서 고도로 번역되었다. 이 실시예는 식물에서 신속하게 전개하고 다량의 특정한 생성물을 생산하는 복집한 생합성 반응에 대한 침투/억제의 일시적인 분석의 사용을 설명한다.

[표 4]

바이러스 군	바이러스	PTGS의 억제	노후한 잎/새로운 잎	전체 잎/엽맥 중심	단백질	기타 공지된 기능
알파모바이러스	ALMV	0/9	-	-	-	-
코모바이러스	CpMV	5/6	OL 및 NL	엽맥 중심	?	-
쿠쿠모바이러스	CMV	20/20	NL	전체 잎	2b	숙주 특이적 장거리 이동
제미니바이러스	ACMV	6/6	OL 및 NL	전체 잎	AC2	비리온 센스 유전자 발현 처리자
네포바이러스	TBRV	0/6	-	-	-	-
포텍스바이러스	PVX	0/9	-	-	-	-
	FoMV	0/9	-	-	-	-
	NMV	8/9	OL 및 NL	전체 잎	?	-
	NVX	7/9	OL 및 NL	전체 잎	?	-
	VMV	7/9	OL 및 NL	전체 잎	?	-
			OL 및 NL	전체 잎	HcPro	게놈 증폭
	TEV					바이러스 상승작용장거리 이동폴리프로틴 처리진딧물 전염
소베모바이러스	RTMV	- +	- +	- +	P1	바이러스 축적장거리 이동
토바모바이러스	TMV	4/6	OL 및 NL	엽맥 중심	?	-
토브라바이러스	TRV	7/9	OL 및 NL	전체 잎	?	-
톰버스바이러스	TBSV	7/9	NL	엽맥 중심	19K	기주 특이적 퍼짐 및 증상 결정소

부록 I

CPDK 서열

ATGGGGAACACTTGTGTAGGACCAAGCATTTCTAAAAATGGGATCTTTCAATCAGTTTCAGCAGCAATGTGGCG
ATCCCGGTCGCCCGATGACACTGCTTCCACCACTAATGGTGAAAGTGCTAGAATTGAAACACCAATTTCTGTTA
AAGAACCTGATTCACCTTTGCCAGTTCAAGAGCCACCAGAACAAATGACAATGCCTAAGTCAGAAAAGAAAGAA
GAAGAAAAAGAACAACCAAAAAAGCCCAAAAAGCCTGCTGAAATGAAGAGGGTGTCAAGTGCTGGCCTTAGGAC
AGATTCTGTGTTACAAAAGAAAACTGGAAACTTAAAGGAGTTTTTCAGTATAGGAAAGAAATTAGGACAAGGTC
AATTTGGAACTACATTTAAATGTGTCGAAAAGGCAACAGGGAAGGAATATGCTTGCAAATCGATTGCTAAGAGG
AAGTTGTTAACAGATGATGATGTGGAAGATGTTAGAAGGGAAGTACAGATAATGCACCATTTGGCAGGACATCC
TCATGTTATATCGATAAAAGGTGCTTATGAGGATGCTGTAGCTGTTCATGTAGTTATGGAGTTTTGTGCTGGGG
GTGAGCTTTTCGATAGGATTATTCAACGGGGGCACTATACAGAAAGAAAAGCAGCTGAGCTTACTAGGACTATT
GTTGGAGTTGTAGAAGCTTGTCATTCTCTTGGTGTCATGCATCGTGATCTTAAGCCTGAAAATTTTCTCTTTGT
TGATCAGAAGGAGGATTCACTTCTCAAAGCAATTGACTTTGGGTTATCGATATTCTTCAAACCAGGCGACAGAT
TTACTGATGTTGTTGGCAGTCCATATTATGTTGCACCAGAAGTTCTCCGAAAACGTTATGGTCCTGAAGCTGAT
GTTTGGAGTGCTGGTGTAATTATCTACATCTTATTAAGTGGAGTACCTCCTTTCTGGGCTGAAAATGAGCAAGG
AATATTTGAACAAGTCCTGCACGGTGATCTTGACTTCACGTCAGACCCATGGCCAAGTATTTCAGAAGATGCAA
AAGACTTGATGAGGAGAATGCTCGTTCGAGATCCGAGAAGACGTTTAACTGCACATGAAGTTTTATGCCATCCT
TGGGTACAAGTTGATGGTGTTGA

부록 II

GFP - PdRp 서열

5'atgagtaaaggagaagaacttttcactggagttgtcccaattcttgttgaattagatggtgatgt
taatgggcacaaattttctgtcagtggagagggtgaaggtgatgcaacatacggaaaacttaccctt
aaatttatttgcactactggaaaactacctgttccatggccaacacttgtcactatttctcttatg
gtgttcaatgcttttcaagatacccagatcatatgaagcggcacgacttcttcaagagcgccatgcc
tgagggatacgtgcaggagaggaccatcttcttcaaggacgacgggaactacaagacacgtgctgaa
gtcaagtttgagggagacaccctcgtcaacaggatcgagcttaagggaatcgatttcaaggaggacg
gaaacatcctcggccacaagttggaatacaactacaactcccacaacgtatacatcatggcagacaa
acaaaagaatggaatcaaagttaacttcaaaattagacacaacattgaagatggaagcgttcaacta
gcagaccattatcaacaaatactccaattggcgatggccctgtccttttaccagacaaccattacc
tgtccacacaatctgccctttcgaaagatcccaacgaaaagagagaccacatggtccttcttgagtt
tgtaacagctgctgggattacacatggcatggatgaactatacaaaTATGAAGTGCACCATCAAGGA

AATGACatgGCCAAGGTGCGCGAGGTTTACCAATCTTTACAGACTCCACCACAAAAACTCTCATCCA
AGATGAGGCTTATAGAAACATTCGCCCCATCATGGAAAAACACAAACTAGCTAACCCTTACGCTCAA
ACGGTTGAAGCGGCTAATGATCTAGAGGGGTTCGGCATAGCCACCAATCCCTATAGCATTGAATTCA
TACACATGCAGCCGCTAAGACCATAGAGAATAAACTTCTAGAGGTGCTTGGTTCCATCCTACCACAA
GAACCTGTTACATTTATGTTTCTTAAACCCAGAAAGCTAAACTACATGAGAAGAAACCCGCGGATCA
AGGACATTTTCCAAAATGTTGCCATTGACCAAGAGACGTAGCCAGGTACCCCAAGGAAACAATAATT
GACAAACTCACAGAGATCACAACGGAAACAGCATACATTAGTGACACTCTGCACTTCTTGGATCCGA
GCTACATAGTGGAGACATTCCAAAACTGCCCAAAATTGCAAACATTGTATGCGACTTAGTTCTCCCC
GTTGAGGCAGCCtaac 3'

참고문헌

1. Depicker, A. & Van Montagu, M. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 372-382.
2. Palauqui, J.-C., Elmayan, T., Pollien, J.-M. & Vaucheret, H. (1997) *EMBO J.* 16, 4738-4745.
3. Voinnet, O. & Baulcombe, D. C. (1997) *Nature* 389, 553.
4. Baulcombe, D. C. (1999) *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2, 109-113.
5. Baulcombe, D. C. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32, 79-88.
6. Ratcliff, F., MacFarlane, S. & Baulcombe, D. C. (1999) *Plant Cell* 11, 1207-1216.
7. Covey, S. N., Al-Kaff, N. S., Langara, A. & Turner, D. S. (1997) *Nature* 385, 781-782.
8. Ratcliff, F., Harrison, B. D. & Baulcombe, D. C. (1997) *Science* 276, 1558-1560.
9. Vance, V. (1991) *Virology* 182, 486-494.
10. Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C. & Vance, V. B. (1997) *Plant Cell* 9, 859-868.
11. Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Smith, T. H. & Vance, V. B. (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95, 13079-13084.
12. Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W. & Baulcombe, D. C. (1998) *EMBO J.* 17, 6739-6746.
13. Kasschau, K. D. & Carrington, J. C. (1998) *Cell* 95, 461-470.
14. Beclin, C., Berthome, R., Palauqui, J.-C., Tepfer, M. & Vaucheret, H. (1998) *Virology* 252, 313-317.
15. Kasschau, K. D., Cronin, S. & Carrington, J. C. (1997) *Virology* 228, 251-262.

16. Ding, S. W., Li, W.-X. & Symons, R. H. (1995) *EMBO J.* 14, 5762-5772.
17. Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. & Baulcombe, D. C. (1998) *Cell* 95, 177-187.
18. Marano, M. R. & Baulcombe, D. (1998) *Plant J.* 13, 537-546.
19. Chapman, S. N., Kavanagh, T. A. & Baulcombe, D. C. (1992) *Plant J.* 2, 549-557.
20. Pinto, Y. M., Kok, R. A. & Baulcombe, D. C. (1999) *Nature Biotech.* 17, 702-707.
21. Hong, Y., Saunders, K. & Stanley, J. (1997) *Virology* 228, 383-387.
22. Scholthof, H. B., Scholthof, K. B. G. & Jackson, A. O. (1995) *Plant Cell* 7, 1157-1172.
23. Bakker, W. (1974) in *Agricultural Research Report No. 829.* (Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen), pp. 152.
24. Bonneau, C., Brugidou, C., Chen, L., Beachy, R. N. & Fauquet, C. (1998) *Virology* 244, 79-86.
25. Matthews, R. E. F. (1991) *Plant Virology* (Academic Press, San Diego, CA).
26. Kjemtrup, S., Sampson, K. S., Peele, C. G., Nguyen, L. V., Conkling, M. A., Thompson, W. F. & Robertson, D. (1998) *Plant J.* 14, 91-100.
27. Atkinson, R. G., Bieleski, L. R. F., Gleave, A. P., Jannsen, B. J. & Morris, B. A. M. (1998) *Plant J.* 15, 593-604.
28. Barker, H. (1989) *Ann. appl. Biol* 115, 71-78.
29. Carrington, J. C. & Whitham, S. A. (1998) *Curr. Opin. Plant. Biol.* 1, 336-341.
30. Elmayan, T., Balzergue, S., Beon, F., Bourdon, V., Daubremet, J., Guenet, Y., Mourrain, P., Palauqui, J. C., Vernhettes, S., Vialle, T., Wostrikoff, K. & Vaucheret, H. (1998) *Plant Cell* 10, 1747-1757.
31. Birchler, J. A., Pal-Bhadra, M. & Bhadra, U. (1999) *Nature Genetics* 21, 148-149.

그 밖의 참고 문헌

Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Smith, T. H., and Vance, V. B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. Proc.Natl.Acad.Sci.USA *95*, 13079-13084.

Angell, S. M., Davies, C., and Baulcombe, D. C. (1996). Cell-to-cell movement of potato virus X is associated with a change in the size exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*. Virology *215*, 197-201.

Atabekov, J. C., and Taliansky, M. E. (1990). Expression of a plant virus-encoded transport function by different viral genomes. Adv in Virus Research *38*, 201-248.

Baulcombe, D. C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant. Biol. *2*, 109-113.

Baulcombe, D. C. (1999). Viruses and gene silencing in plants. Arch. Virol. *suppl. 15*, 189-201.

Bendahmane, A., Kanyuka, K., and Baulcombe, D. C. (1999). The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. Plant Cell *11*, 781-791.

Bevan, M. W. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucleic Acids Res. *12*, 8711-8721.

Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W., and Baulcombe, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in Nicotiana benthamiana. EMBO J. *17*, 6739-6746.

Carrington, J. C. (1999). Reinventing plant virus movement. Trends in Microbiology *8*, 312-313.

Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K., and Schaad, M. C. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. Plant Cell *8*, 1669-1681.

Chisholm, S. T., Mahajan, S. K., Whitham, S. A., Yamamoto, M. L., and Carrington, J. C. (2000). Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long distance movement of tobacco etch virus. Proc.Natl.Acad.Sci.USA *97*, 489-494.

Covey, S. N., Al-Kaff, N. S., Langara, A., and Turner, D. S. (1997). Plants combat infection by gene silencing. Nature *385*, 781-782.

Dalmay, T., Hamilton, A. J., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. Cell *101*, 543-553.

Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A novel species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing. Science *286*, 950-952.

Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *PNAS* 18;94(6):2122-7.

Jones, L., Hamilton, A. J., Voinnet, O., Thomas, C. L., Maule, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. Plant Cell *11*, 2291-2302.

Jorgensen, R. A., Atkinson, R. G., Forster, R. L. S., and Lucas, W. J. (1998). An RNA-Based Information Superhighway in Plants. Science *279*, 1486-1487.

Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. Cell *95*, 461-470.

Lucas, W. J., and Wolf, S. (1999). Connections between virus movement, macromolecular signaling and assimilate allocation. Curr. Opin. Plant. Biol. *2*, 192-197.

Malcuit I, de Jong W, Baulcombe DC, Shields DC, Kavanagh TA. (2000) Acquisition of multiple virulence/avirulence determinants by potato virus X (PVX) has occurred through convergent evolution rather than through recombination.Virus Genes ;20(2):165-72.

Matthews, R. E. F. (1991). Plant Virology, 3rd Edition (San Diego, CA: Academic Press).

Mestre P., Brigneti G. and Baulcombe D.C. (2000) An Ry-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the Nia proteinase from potato virus Y. *Plant Cell* 23(5), 653-661.

Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.-B., Jouette, D., Lacombe, A.-M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.-A., and Vaucheret, H. (2000). *Arabidopsis SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. Cell *101*, 533-542.

Niman, H. et al., (1983) Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: Implications for the structural basis of immune recognition. PNAS, 80, 4949-4953.

Palauqui, J.-C., Elmayan, T., Pollien, J.-M., and Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. EMBO *J. 16*, 4738-4745.

Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C., and Vance, V. B. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. Plant Cell *9*, 859-868.

Ratcliff, F., Harrison, B. D., and Baulcombe, D. C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. Science *276*, 1558-1560.

Ratcliff, F., MacFarlane, S., and Baulcombe, D. C. (1999). Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross protection between viruses. Plant Cell *11*, 1207-1215.

Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B, (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nat Biotechnol. Oct;17(10):1030-32.

Romeis T, Piedras P, Jones JD, (2000). Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. Plant Cell. May;12(5):803-16.

Ruiz, F., Vassie, L., Klotz, K., Sperling, L., and Madeddu, L. (1998). Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. Molecular Biology Of The Cell *9*, 931-943.

Ruiz, M. T., Voinnet, O., and Baulcombe, D. C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. Plant Cell *10*, 937-946.

Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.-B., Mourrain, P., Palauqui, J.-C., and Vernhettes, S. (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. Plant J. *16*, 651-659.

Verchot, J., Angell, S. M., and Baulcombe, D. C. (1998). In Vivo Translation of the Entire Triple Gene Block of Potato Virus X Requires Two Separate mRNAs. J. Virol. *72*, 8316-8320.

Voinnet, O., and Baulcombe, D. C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. Nature *389*, 553.

Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses. Proc.Natl.Acad.Sci.USA *96*, 14147-14152.

Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., and Baulcombe, D. C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation is initiated by localised introduction of ectopic promoterless DNA. Cell *95*, 177-187.

Whitham, S. A., Yamamoto, M. L., and Carrington, J. C. (1999). Selectable viruses and altered susceptibility mutants in Arabidopsis thaliana. Proc.Natl.Acad.Sci.USA *96*, 772-777.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell *101*, 25-33.

SEQUENCE LISTING

<110> Plant Bioscience Limited
Baulcombe, David C
Voinnet, Olivier
Hamilton, Andrew J

<120> Enhanced Expression

<130> SMK/LP5894209

<140> PCT/GB00/04454
<141> 2000-11-22

<150> GB 9927609.9
<151> 1999-11-22

<150> GB 0022960.9
<151> 2000-09-19

<150> GB 0023668.7
<151> 2000-09-27

<160> 10

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 1133
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cDNA corresponding to a fragment of tobacco CDPK

<400> 1
atggggaaca cttgtgtagg accaagcatt tctaaaaatg ggatctttca atcagtttca 60

gcagcaatgt ggcgatcccg gtcgcccgat gacactgctt ccaccactaa tggtgaaagt 120

gctagaattg aaacaccaat ttctgttaaa gaacctgatt caccctttgcc agttcaagag 180

ccaccagaac aaatgacaat gcctaagtca gaaaagaaag aagaagaaaa agaacaacca 240

aaaaagccca aaaagcctgc tgaaatgaag agggtgtcaa gtgctggcct taggacagat 300

tctgtgttac aaaagaaaac tggaaactta aaggagtttt tcagtatagg aaagaaatta 360

ggacaaggtc aatttggaac tacatttaaa tgtgtcgaaa aggcaacagg gaaggaatat 420

gcttgcaaat cgattgctaa gaggaagttg ttaacagatg atgatgtgga agatgttaga 480

agggaagtac agataatgca ccatttggca ggacatcctc atgttatatc gataaaaggt 540

gcttatgagg atgctgtagc tgttcatgta gttatggagt tttgtgctgg gggtgagctt 600

ttcgatagga ttattcaacg ggggcactat acagaaagaa aagcagctga gcttactagg 660

actattgttg gagttgtaga agcttgtcat tctcttggtg tcatgcatcg tgatcttaag 720

cctgaaaatt ttctctttgt tgatcagaag gaggattcac ttctcaaagc aattgacttt 780

gggttatcga tattcttcaa accaggcgac agatttactg atgttgttgg cagtccatat 840

tatgttgcac cagaagttct ccgaaaacgt tatggtcctg aagctgatgt ttggagtgct 900

ggtgtaatta tctacatctt attaagtgga gtacctcctt tctgggctga aaatgagcaa 960

ggaatatttg aacaagtcct gcacggtgat cttgacttca cgtcagaccc atggccaagt 1020

atttcagaag atgcaaaaga cttgatgagg agaatgctcg ttcgagatcc gagaagacgt 1080

ttaactgcac atgaagtttt atgccatcct tgggtacaag ttgatggtgt tga 1133

<210> 2
<211> 1287
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> GFP-RdRp fusion cDNA

<400> 2
atgagtaaag gagaagaact tttcactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt 60

gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aaggtgatgc aacatacgga 120

aaacttaccc ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg gccaacactt 180

gtcactactt tctcttatgg tgttcaatgc ttttcaagat acccagatca tatgaagcgg 240

cacgacttct tcaagagcgc catgcctgag ggatacgtgc aggagaggac catcttcttc 300

aaggacgacg ggaactacaa gacacgtgct gaagtcaagt ttgagggaga caccctcgtc 360

aacaggatcg agcttaaggg aatcgatttc aaggaggacg gaaacatcct cggccacaag 420

ttggaatata actacaactc ccacaacgta tacatcatgg cagacaaaca aaagaatgga 480

atcaaagtta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg gaagcgttca actagcagac 540

cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac 600

ctgtccacac aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agagagacca catggtcctt 660

cttgagtttg taacagctgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caaatatgaa 720

gtgcaccatc aaggaaatga catggccaag gtgcgcgagg tttaccaatc tttacagact 780

ccaccacaaa aactctcatc caagatgagg cttatagaaa cattcgcccc atcatggaaa 840

aacacaaact agctaaccct tacgctcaaa cggttgaagc ggctaatgat ctagaggggt 900

tcggcatagc caccaatccc tatagcattg aattcataca catgcagccg ctaagaccat 960

agagaataaa cttctagagg tgcttggttc catcctacca caagaacctg ttacatttat 1020

gtttcttaaa cccagaaagc taaactacat gagaagaaac ccgcggatca aggacatttt 1080

ccaaaatgtt gccattgacc aagagacgta gccaggtacc ccaaggaaac aataattgac 1140

aaactcacag agatcacaac ggaaacagca tacattagtg acactctgca cttcttggat 1200

ccgagctaca tagtggagac attccaaaac tgcccaaaat tgcaaacatt gtatgcgact 1260

tagttctccc cgttgaggca gcctaac 1287

<210> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 3
catcccgtgt cagtctg 17

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 4
atcacacggt tgtaaggttc 20

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 5
atgactcggt tggaagttc 19

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 6
gtagttgagg tagttgaccc 20

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 7
gcacagattt tcctaggcac gttatc 26

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 8
gaaagaaatt gggccggctc ttgaac 26

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 9
cagaaaccgg ccgctagcgg gccattgccg 30

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 10
tgtactgctt gagatttaca gct 23

(57) 청구의 범위

청구항 1.

유기체 중의 표적 뉴클레오티드 서열로부터 발현을 증가시키기 위한 방법으로서, 전사 후 유전자 사일런싱(PTGS) 억제제 단백질과 함께, 프로모터에 작용가능하게 연결된 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표적 핵산 구조를 유기체의 세포내로 일시적으로 도입하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2.

상기 구조는 복제 기점을 포함하지 않는 것인 방법.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유기체는 동물인 것인 방법.

청구항 4.

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유기체는 식물인 것인 방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 억제제 단백질은 바이러스 유래인 것인 방법.

청구항 6.

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 표적 구조는 (a) 원하는 뉴클레오티드 서열을 식물 세포 게놈으로 운반하도록 하는 경계 서열 및 (b) 프로모터와 작용가능하게 연결된 표적 뉴클레오티드 서열이 들어 있는 발현 카세트를 포함하는 원하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 7.

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 식물의 조직 중에 존재하는 체세포인 것인 방법.

청구항 8.

제7항에 있어서, 상기 구조가 조직 중의 다수의 세포내로 동시에 도입되는 것인 방법.

청구항 9.

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제제 단백질은 억제제 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로부터의 발현에 의하여 세포내로 도입되는 것인 방법.

청구항 10.

제9항에 있어서, 상기 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1의 (표적) 핵산이 억제제 단백질을 암호화하는 제2의 (억제제) 핵산과 함께 사용되는 것인 방법.

청구항 11.

제10항에 있어서, 식물 중의 표적 뉴클레오티드 서열의 발현을 증가시키기 위한 방법으로서, 상기 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 핵산 및 PTGS 억제제 단백질을 암호화하는 제2 핵산을 식물의 조직내로 일시적으로 도입하는 단계를 포함하며, 이때 제1 핵산 및 제2 핵산은 단일의 바이너리 벡터 구조내에 포함되거나 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열이 각각 제1 바이너리 벡터 및 제2 바이너리 벡터 구조에 포함되는 방법.

청구항 12.

표적 단백질을 생산하는 방법으로서,

(ⅰ) 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 핵산 및 이종성 PTGS 억제제 단백질을 암호화하는 제2 핵산(각각의 경우에 프로모터에 작용가능하게 연결되어 있음)을 식물의 조직내로 도입하는 단계(이때 제1 핵산 및 제2 핵산은 임의로 단일의 바이너리 벡터 구조에 포함됨),

(ⅱ) 일정 시간에 걸쳐 핵산으로부터 억제제 및 표적 단백질의 발현을 일으키거나 허용하는 단계(이때 상기 억제제는 표적 단백질을 암호화하는 mRNA의 분해를 억제함),

(ⅲ) 적어도, 상기 표적 단백질이 발현되었던 조직을 채취하는 단계,

(ⅳ) 임의로 상기 표적 단백질을 상기 식물로부터 분리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 13.

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산은 2종 또는 그 이상의 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 14.

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산 서열은 2종 또는 그 이상의 상이한 억제제를 암호화하는 것인 방법.

청구항 15.

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 핵산은 분리된 바이너리 벡터 구조에 존재하고, 이 벡터들이 상기 식물에 함께 도입되는 것인 방법.

청구항 16.

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산은 단일의 바이너리 벡터 구조에 존재하는 것인 방법.

청구항 17.

미리 결정된 순서로 유기체 중에서 2종 또는 그 이상의 표적 단백질을 생산하는 방법으로서,

(ⅰ) 각각 적어도 하나의 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 2종 또는 그 이상의 표적 핵산 및 이종성 PTGS 억제제 단백질을 암호화하는 추가의 핵산(각각의 경우에 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있음)을 식물의 조직내로 도입하는 단계(이때 상기 핵산은 임의로 단일의 바이너리 벡터 구조에 포함됨),

(ⅱ) 상기 핵산으로부터 상기 억제제 및 제1 표적 단백질의 발현을 일으키거나 허용하는 단계,

(iii) 이어서, 일정기간 내에, 추가의 표적 핵산으로부터 추가의 표적 단백질의 전위 발현을 일으키거나 허용하는 단계,

(iv) 임의로 단계 (iii)을 반복하는 단계,

(iv) 적어도 최종 표적 단백질이 발현되었던 조직을 채취하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18.

제17항에 있어서, 상기 2종 또는 그 이상의 표적 단백질은 대사 경로 또는 이화 경로의 전부 또는 일부를 구성하거나, 또는 적어도 하나의 표적 단백질이 추가의 표적 단백질에 대하여 기질인 것인 방법.

청구항 19.

제12항, 제17항 또는 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 일정 시간은 약 3일 내지 15일 사이이고, 약 3일 내지 10일 더 바람직하고, 약 4일 내지 7일 사이인 것이 더 바람직한 방법.

청구항 20.

제7항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물 조직은 하나의 잎 또는 여러 개의 잎인 것인 방법.

청구항 21.

(ⅰ) 식물 조직 중에서 발현시키고자 하는 표적 단백질을 암호화하는 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 핵산, 및 (ⅱ) PTGS 억제제 단백질을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 물질(이때 제1 핵산 및 제2 핵산은 각각 제1 바이너리 벡터 및 제2 바이너리 벡터 구조내에 포함됨)에 (ⅲ) 식물 물질 내에 상기 벡터를 함께 도입하는 것을 촉진하는 추가의 물질을 임의로 추가한 조성물.

청구항 22.

표적 단백질을 암호화하는 mRNA의 숙주 유기체에 의한 분해를 방지하는 이종성 PTGS 억제제의 용도로서, 상기 mRNA는 프로모터에 작용가능하게 연결된 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표적 핵산 구조로부터의 전사에 의하여 생성되며, 상기 구조는 상기 유기체의 세포내에 일시적으로 도입되는 것인 이종성 PTGS 억제제의 용도

청구항 23.

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제제 단백질은 감자 바이러스 X(pvx) p25 단백질, 아프리카 카사바 모자이크 바이러스(acmv) AC2 단백질, 벼 황색 반점 바이러스(rymv) P1 단백질, 토마토 부쉬 스턴트 바이러스(tbsv) 19K 단백질, rgs CAM 또는 이들과 적어도 약 75%의 서열 일치성을 공유하는 이들 중의 임의의 것의 변종으로 구성된 목록으로부터 선택되는 것인 방법, 조성물 또는 용도.

청구항 24.

세포 중의 표적 유전자의 발현을 증가시키기 위한 방법으로서, 상기 유전자는 PTGS에 이용되고, 상기 방법은 감자 바이러스 X(pvx) p25 단백질, 아프리카 카사바 모자이크 바이러스(acmv) AC2 단백질, 벼 황색 반점 바이러스(rymv) P1 단백질, 토마토 부쉬 스턴트 바이러스(tbsv) 19K 단백질, 또는 이들과 적어도 약 75%의 서열 일치성을 공유하는 이들 중의 임의의 것의 변종으로 구성된 목록에서 선택되는 분리된 억제제 단백질을 상기 세포내로 도입하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 25.

제24항에 있어서, 상기 표적 유전자는 상기 세포 게놈 중에 존재하는 내생 유전자 또는 이식 유전자, 노출된 DNA로 존재하는 이종성 유전자, 발현 벡터에 존재하는 이종성 유전자로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 26.

제25항에 있어서, 상기 표적 유전자는 상기 세포 게놈 중에 존재하는 내생 유전자 또는 이식 유전자이고, 상기 억제제 단백질은 pvx p25 또는 이의 변종인 것인 방법.

청구항 27.

제26항에 있어서, 상기 억제제 단백질은 PTGS의 전신의 시그널의 생성 또는 수송을 특이적으로 억제하여 상기 식물 중에서 바이러스에 의하여 유도된 국부적인 유전자 사일런싱이 실제적으로 상기 증가에 의하여 영향을 받지 않는 것인 방법.

청구항 28.

제25항에 있어서, 상기 표적 유전자는 세포질에서 복제하는 구조 또는 바이러스 벡터인 발현 벡터에 존재하는 이종성 유전자이고, 상기 억제제 단백질은 acmv AC2, rymv P1, tbsv 19K 또는 이들 중 임의의 것의 변종으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 29.

제25항에 있어서, 상기 표적 유전자는 잎의 엽맥에서 발현되고, 상기 억제제 단백질은 TBSV 19K 또는 이의 변종인 것인 방법.

청구항 30.

제24항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분리된 억제제 단백질은 상기 억제제 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로부터의 발현에 의하여 상기 세포내로 도입되는 것인 방법.

청구항 31.

제9항 또는 제30항에 있어서, 상기 억제제 단백질은 세포의 게놈에 안정하게 혼입된 이식 유전자로부터의 발현에 의하여 상기 세포 내로 도입되는 것인 방법.

청구항 32.

제31항에 있어서, 상기 억제제 단백질은 억제제 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 억제제 핵산 구조로서 상기 세포 또는 이의 선조 내로 도입되는 것인 방법으로서, 상기 구조는 억제제 단백질이 유래한 바이러스로부터 추가의 단백질을 암호화하지 않으며, 상기 세포는 본 발명에 따르는 핵산을 게놈 내로 도입하기 위하여 구조와 식물 세포 게놈 사이의 재조합을 일으키거나 허용함에 의하여 상기 구조로 형질 전환되는 식물 세포인 방법.

청구항 33.

제32항에 있어서, 형질 전환된 식물 세포로부터 식물을 재생산하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34.

제31항에 있어서, 상기 억제제 단백질은 억제제 단백질을 암호화하는 억제제 뉴클레오티드 서열을 포함하는 억제제 핵산 구조로서 상기 세포내로 도입되고, 상기 구조는 식물 세포 중에서 RNA 분자(전사 후 세포의 세포질 내에서 RNA 분자에 복제하는 능력을 부여하는 식물 바이러스 서열을 추가로 포함함)의 전사를 위하여 (ⅰ) 프로모터 및 (ⅱ)이에 작용가능하게 결합하고 억제제 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 35.

제1항 내지 제20항 또는 제23항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터는 유도성 프로모터인 것인 방법.

청구항 36.

제1항 내지 제11항 또는 제23항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현은 적어도 약 25-50%, 50-100%, 5, 10, 15 또는 20배 또는 그 이상까지 증가하는 것인 방법.

청구항 37.

제1항 내지 제20항 또는 제23항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 유전자 또는 뉴클레오티드 서열은 곤충 저항성 단백질, 질병 저항성 단백질, 제초제 저항성 단백질, 포유류 단백질인 표적 단백질을 암호화하는 것인 방법.

청구항 38.

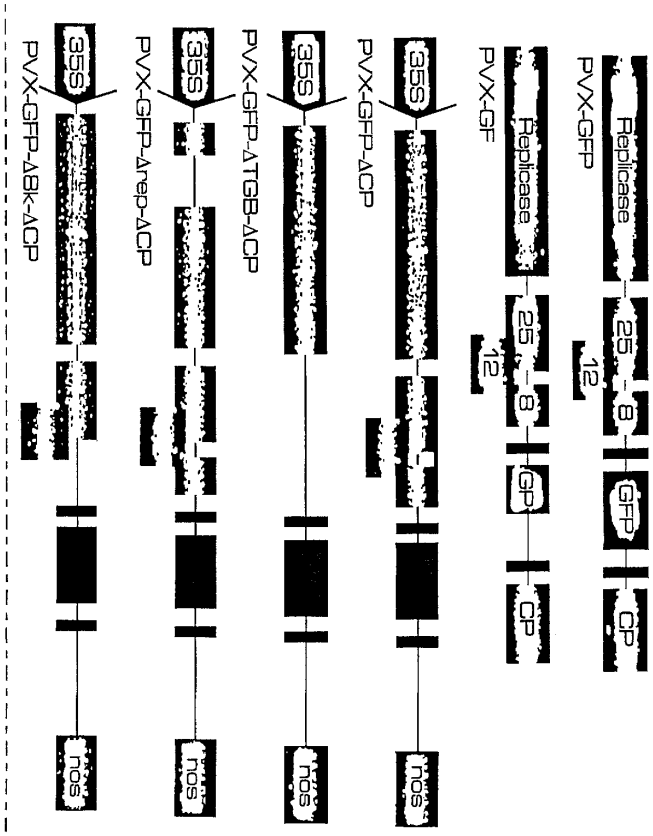
유전자 사일런싱의 억제제를 확인하기 위한 방법으로서, 이 방법은 리포터 분자를 암호화하고 PTGS의 추정되는 억제제를 암호화하는 바이너리 벡터인 적어도 하나의 핵산 구조를 추정되는 억제제를 암호화하는 바이너리 벡터인 제2 핵산 구조와 함께 식물 물질 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 39.

제38항에 있어서, 상기 리포터 분자는 GFP 또는 루시페라아제로부터 선택되는 것인 방법.

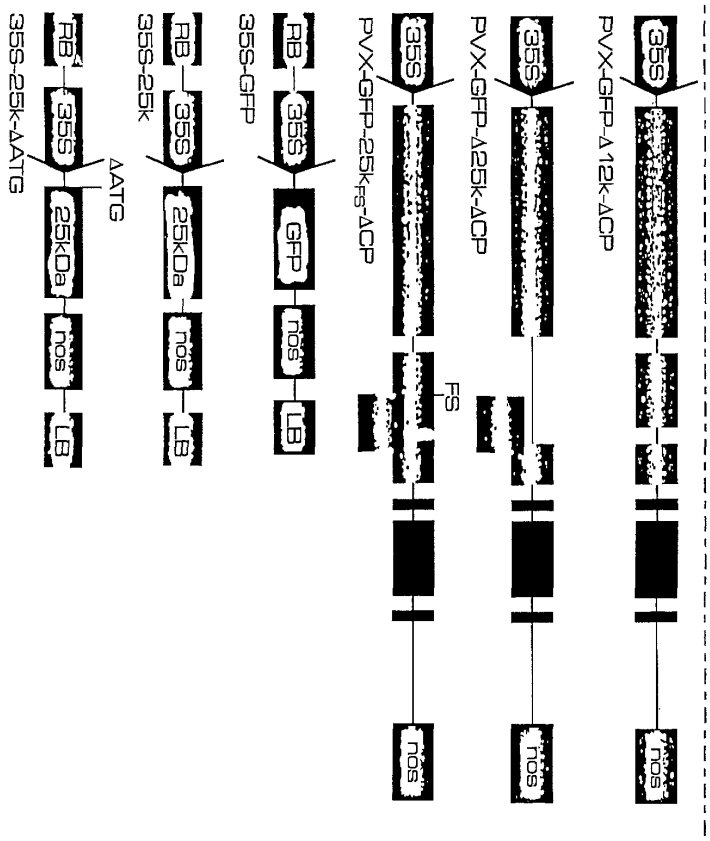
도면

도면 1a

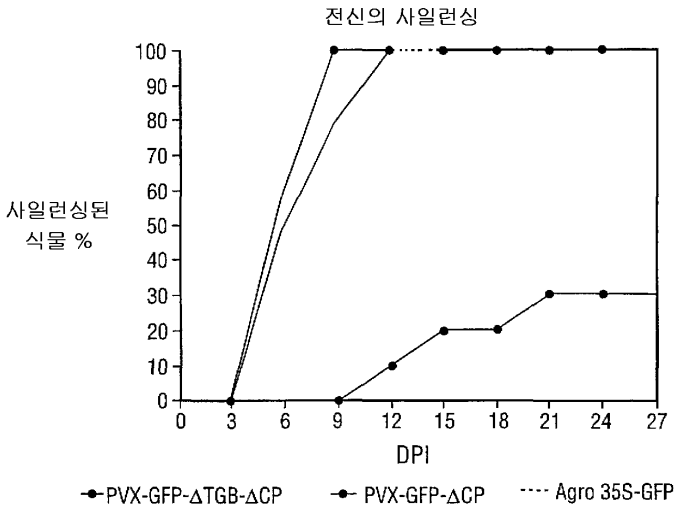


도면 1b

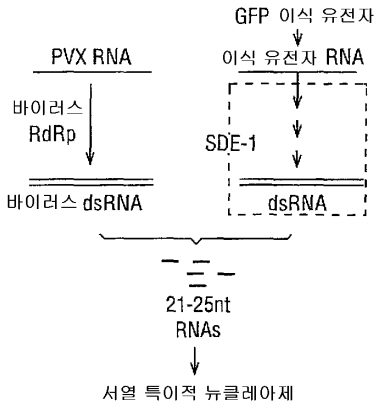
(계속)


PVX-GFP-Δ12k-ΔCP
35S
nos
PVX-GFP-Δ25k-ΔCP
35S
nos
PVX-GFP-25k$_{FS}$-ΔCP
35S
FS
nos
35S-GFP
RB
35S
GFP
nos
LB
35S-25k
RB
35S
25kDa
nos
LB
35S-25k-ΔATG
ΔATG
RB
35S
25kDa
nos
LB

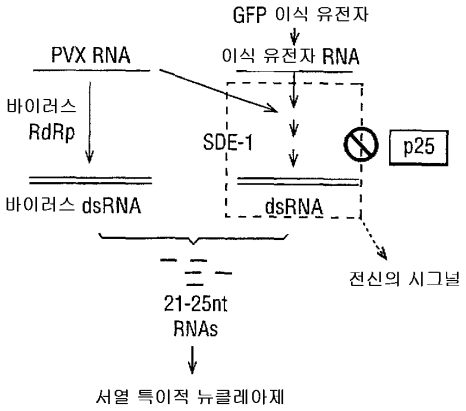
도면 2


전신의 사일런싱
사일런싱된
식물 %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
DPI
PVX-GFP-ΔTGB-ΔCP
PVX-GFP-ΔCP
Agro 35S-GFP

도면 3a


GFP 이식 유전자
PVX RNA
이식 유전자 RNA
바이러스
RdRp
SDE-1
바이러스 dsRNA
dsRNA
21-25nt
RNAs
서열 특이적 뉴클레아제

도면 3b


GFP 이식 유전자
PVX RNA
이식 유전자 RNA
바이러스
RdRp
SDE-1
p25
바이러스 dsRNA
dsRNA
전신의 시그널
21-25nt
RNAs
서열 특이적 뉴클레아제