



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0092644
(43) 공개일자 2010년08월23일

(51) Int. Cl.

A01N 65/00 (2009.01) *C12N 15/29* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0011872

(22) 출원일자 2009년02월13일

심사청구일자 2009년02월13일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김옥매

서울특별시 노원구 중계본동 366 라이프아파트
110-802

권순일

경기도 군포시 궁내동 대림솔거아파트 729-203

조홍주

서울특별시 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 녹지관 205호

(74) 대리인

구현서

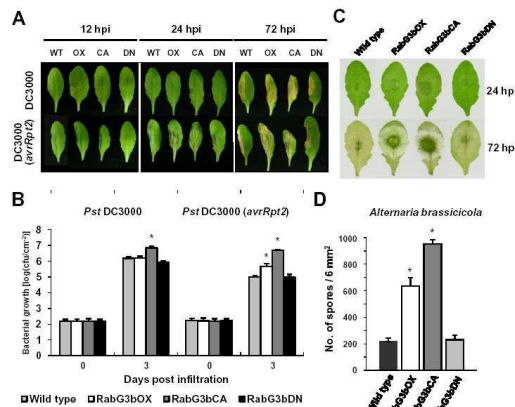
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 식물의 병저항성을 조절하는 단백질 및 그 유전자

(57) 요약

본 발명은 식물의 병저항성을 조절하는 단백질 및 그 단백질을 코딩하는 유전자에 관한 발명이다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 단백질을 유효성분으로 함유하는 식물 면역반응 조절용 조성물.

청구항 2

제 1항의 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물 면역반응 조절용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 유전자 서열은 서열번호 2에 기재된 것을 특징으로 하는 식물 면역반응 조절용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 면역반응은 곰팡이 독신 및 식물병원균에 대한 면역반응인 것을 특징으로 하는 식물 면역반응 조절용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 곰팡이 독신은 후모니신 B1(FB1)인 것을 특징으로 하는 식물 면역반응 조절용 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 식물병원균은 *Alternaria brassicicola*, 또는 *Pseudomonas syringae*인 것을 특징으로 하는 식물 면역반응 조절용 조성물.

청구항 7

식물에 서열번호 1의 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 식물에서 활성화된 프로모터를 포함하는 융합유전자로 형질전환시키는 단계를 포함하는 곰팡이 독신 또는 병원균 침입으로부터 식물을 보호하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 서열번호 1의 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 2에 기재된 서열인 것을 특징으로 하는 곰팡이 독신 또는 병원균 침입으로부터 식물을 보호하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 곰팡이 독신은 후모니신 B1(FB1)인 것을 특징으로 하는 곰팡이 독신 또는 병원균 침입으로부터 식물을 보호하는 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 식물병원균은 *Alternaria brassicicola*, 또는 *Pseudomonas syringae*인 것을 특징으로 하는 곰팡이 독신 또는 병원균 침입으로부터 식물을 보호하는 방법.

청구항 11

서열번호 1의 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 식물에서 활성을 가지는 프로모터를 포함하는 융합유전자로 형질전환시킨 식물 병 저항성 형질전환 식물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 서열번호 1의 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 2에 기재된 서열인 식물 병 저항성 형질전환 식물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물의 병저항성을 조절하는 단백질 및 그 단백질을 코딩하는 유전자에 관한 발명이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 병원균 공격에 대하여 식물들은 그들 자신을 보호하기 위하여 매우 복잡한 신호전달과 보호 기작을 개발하였다. 식물 질병 저항성은 식물 저항성(*R*) 및 병원균 비독성(*avr*) 유전자들 산물 사이의 상호작용에 의존하는 과민성 반응(hypersensitive response; HR)으로 명명된 프로그램화된 세포 사멸(PCD)에 의하여 종종 밝혀진다(Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., and Dangl, J.L. (2006). *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 425-449; Hofius, D., Tsitsigiannis, D.I., Jones, J.D., and Mundy, J. (2007). *Semin. Cancer Biol.* 17: 166-187). HR-PCD은 시도된 병원균 감염에 대하여 신속하게(<12 h) 발생하여 병원균들의 확산을 저해하고 식물에서 면역성과 병 진행을 조절한다(Goodman, R.N., and Novacky A.J. (1994). *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens: A Resistance Phenomenon.* (St. Paul, MN: APS Press).; Lincoln, J.E., Richael, C., Overduin, B., Smith, K., Bostock, R., and Gilchrist, D.G. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15217-15221; Abramovitch, R.B., and Martin, G.B. (2004). *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 356-364; del Pozo, O., Pedley, K.F., and Martin, G.B. (2004). *EMBO J.* 23: 3072-3082; Greenberg, J.T., and Yao, N. (2004). *Cell Microbiol.* 6: 201-211; Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., and Dangl, J.L. (2006). *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 425-449).

[0003] HR-PCD는 외부 및 내부 인자들의 다양한 배열에 의하여 엄격하게 조절된다. jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA), nitric oxide (NO), 및 에틸렌과 같은 호르몬들의 신호 네트워크는 상승적 및/또는 길항적 상호작용을 통하여 면역 반응 및 HR-PCD에 영향을 주고있다(Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2000). *Plant Mol. Biol.* 44: 371-385). 병원균 공격에 대하여 식물체는 세포벽 강화, reactive oxygen species (ROS)의 축적, 발병-관련 (*PR*) 유전자들의 발현, 및 파이토알렉신의 형성을 포함하는 일련의 세포 사멸 유도 이벤트가 발생한다(Greenberg, J.T., and Ausubel, F.M. (1993). *Plant J.* 4: 327-341; Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., and Dangl, J.L. (1994). *Cell* 77: 565-577; Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S., and Greenberg, J.T. (1999). *Plant Cell* 11: 1695-1708). 병원균 유래 파이토독식 화합물들이 HR-PCD를 유도하는 외부 독성(virulence) 인자로 작용한다. *Alternaria* 및 *Fusarium* spp와 같은 살생영양성(Necrotrophic) 식물병원성 진균류는 Fumonisin B1 (FB1)과 같은 마이코톡신을 생성한다(Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nelsen, T.C., and Leslie, J.F. (1995). *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 79-86; Gilchrist, D.G., Wang, H., and Bostock, R.M. (1995). *Can. J. Bot.* 73: S459-S467; Dutton, M.F. (1996). *Pharmacol. Ther.* 70: 137-161; Gilchrist, D.G. (1997). *Cell Death Differ.* 4: 689-698).

[0004] HR-PCD를 조절하는 구성요소를 동정하기 위하여 유전학적 접근이 사용되었다. 여러 다른 R 단백질들의

다운스트림에 작용하는 일군의 유전자들은 *EDS1*, *PAD4*, 및 *NDR1* 포함한다(Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B.J., Daniels, M.J., and Parker, J.E. (1998). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10306-10311; Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., and Glazebrook, J. (1999). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13583-13588). 해당 돌연변이체 식물들은 HR를 개발 하는데 실패하고 병원균들에 대한 증가된 민감성을 나타낸다. 또 다른 군은 결손이 자발적인 HR-유사 장애를 발생하고 병원균 부존재에서 방어 작용의 지속적인 활성화를 유도하는 유전자들로 구성된다(Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2000). Plant Mol. Biol. 44: 371-385). *accelerated cell death (acd)*, *constitutive expressor of PR genes (cpr)*, *lesion simulating disease (lsd)*, *suppressor of SA insensitivity (ssi)*, 및 *mlo*를 포함하는 30 개 이상의 그러한 장애 유사 돌연변이체가 분리되었다(Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., and Dangl, J.L. (1994). Cell 77: 565-577.;Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F., and Ausubel, F.M. (1994). Cell 77: 551-563;Weymann, K., Hunt, M., Uknes, S., Neuenschwander, U., Lawton, K., Steiner, H.Y., and Ryals, J. (1995). Plant Cell 7: 2013-2022.;Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C., and Dangl, J.L. (1997). Cell 88: 685-694.;Greenberg, J.T. (1997). Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 525-545.;Greenberg, J.T., Silverman, F.P., and Liang, H. (2000). Genetics 156: 341-350.;Mach, J.M., Castillo, A.R., Hoogstraten, R., and Greenberg, J.T. (2001). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 771-776.;Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H.M., Olszak, B., Skov, S., Odum, N., Jorgensen, L.B., Brown, R.E., and Mundy, J. (2002). Genes Dev. 16: 490-502.;Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., Collins, N.C., Panstruga, R., and Schulze-Lefert, P. (2002). Plant Physiol. 129: 1076-1085.;Liang, H., Yao, N., Song, J.T., Luo, S., Lu, H., and Greenberg, J.T. (2003). Genes Dev. 17: 2636-2641.;Lorrain, S., Vailleau, F., Balague, C., and Roby, D. (2003). Trends Plant Sci. 8: 263-271.).

[0005]

애기장대(Arabidopsis) 유전자는 세포증식과 세포골격 구성 및 세포내 막 트래픽킹과 같은 다양한 세포 과정을 조절하는 작은 GTPases를 코딩하는 93 유전자를 포함한다. 계통발생학적 분석은 애기장대는 Ras, GTPases가 아니라 Rop, Arf, Ran, 및 Rab을 함유한다고 알려졌다(Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z., and Nielsen, E. (2003). Plant Physiol. 131: 1191-1208.). RabG3b는 RabG 계열로, 여덟 Rab 서브패밀리 중 하나 이다(RabA to RabH; Rutherford, S., and Moore, I. (2002). Curr. Opin. Plant Biol. 5: 518-528; Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z., and Nielsen, E. (2003). Plant Physiol. 131: 1191-1208.).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006]

본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 식물체에 선천적 면역성을 부여하는 단백질질을 제공하는 것이다.

[0007]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질질을 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0008]

상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0009]

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 단백질을 유효성분으로 함유하는 식물 면역반응 조절용 조성물 제공한다.

[0010]

본 발명의 단백질은 서열번호 1의 단백질 뿐 아니라 이들 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 역위, 전위 등과 같은 돌연변이를 통하여 본 발명의 목적인 식물 면역반응 조절을 수행하는 활성을 가지는 모든 변이 단백질을 포함한다.

[0011]

본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 본 발명의 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물 면역반응 조절용 조성물을 제공한다.

[0012]

본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 유전자 서열은 서열번호 1의 단백질을 코딩하는 서열 뿐 아니라 이들 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 역위, 전위 등과 같은 돌연변이를 통하여 변형된 동일한 활성을 가진 모든 변형단백질을 코딩하는 유전자인 것이 바람직하고, 서열번호 2에 기재된 것이 더욱 바람직하나 코드 디제너리시

등을 고려하여 서열번호 2와 적어도 80% 이상의 상동성을 가진 유전자인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 면역반응은 곰팡이 독신 및 식물병원균에 대한 면역반응인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0014] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 곰팡이 독신은 모든 곰팡이에 관한 독신이 가능하고, 후모니신 BI(FB1)인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0015] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 식물병원균은 하기에서 열거한 식물 병원균들이 가능하나, 본 발명의 실시예에서는 *Alternaria brassicicola*, 또는 *Pseudomonas syringae*을 사용하였으나 이에 한정되지 아니한다.

[0016] 또한 본 발명은 식물에 서열번호 1의 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 식물에서 활성인 프로모터를 포함하는 융합유전자로 형질전환시키는 단계를 포함하는 곰팡이 독신 또는 병원균 침입으로부터 식물을 보호하는 방법을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 서열번호 1의 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 식물에서 활성인 프로모터를 포함하는 융합유전자로 형질전환시킨 형질전환 식물을 제공한다.

[0018] A. 식물발현카세트의 제작

[0019] RabG3b 유전자를 발현시킴으로써 식물에 질병 내성을 부여하는 본 발명의 유전자를 통상의 재조합 DNA 기술을 사용하여 식물 세포중으로 혼입시킬 수 있다. 일반적으로, 이는 상기 기술된 선택된 형태의 RabG3b를 암호화하는 DNA 분자를 상기 DNA 분자가 이중성인 (즉, 통상적으로 존재하지 않는) 발현 시스템중으로 당해 분야에 공지된 표준 클로닝 공정을 사용하여 삽입시키는 것이다. 벡터는 삽입된 단백질-암호화 서열의 전사 및 해독에 필수적인 요소를 함유한다. 플라스미드, 박테리오파지 바이러스 및 기타 개질된 바이러스와 같은, 당해 분야에 공지된 다수의 벡터 시스템을 사용할 수 있다. 적합한 벡터로는 비제한적으로, 람다 벡터 시스템 λ gt11, λ gt10 및 카론 4와 같은 바이러스성 벡터; pBI121, pBR322, pACY177, pACYC184, pAR 시리즈, pKK223-3, pUC8, pUC9, pUC18, pUC19, pLG339, pRK290,

[0020] pKC37, pKC101, pCDNA11과 같은 플라스미드 벡터; 및 기타 유사한 시스템이 있다. 발현 시스템의 성분은 또한 발현을 증가시키기 위하여 개질시킬 수 있다.

[0021] 예를 들면, 절단된 서열, 뉴클레오티드 치환 또는 기타 개질을 이용할 수 있다. 본 명세서에 기술된 발현 시스템을 사용하여 적합한 조건하에서 작물 식물을 실제로 형질전환시킬 수 있다. 형질전환된 세포는 선택된 형태의 RabG3b 유전자가 유전자 전이 식물에서 RabG3b를 발현시키도록 전체 식물중에서 재생될 수 있다.

[0022] 간단하게 예시하면, 유전자전이 식물에서 발현시키고자하는 유전자 서열을 먼저 식물중에서 발현될 수 있는 적합한 프로모터의 뒤에서 발현카세트중에 포함시킨다. 발현 카세트는 또한 전이유전자의 발현에 필요하거나 선택된 추가의 서열을 포함할 수 있다. 상기와 같은 서열로는 비제한적으로, 전사 종결자(terminator), 인트론과 같은 발현을 향상시키기위한 외인성 서열, 바이탈 서열, 및 특정 세포기관 및 세포 구획에 유전자 생성물을 표적시키기위한 서열이 있다. 이들 발현 카세트는 상기한 식물 형질전환 벡터로 용이하게 전이시킬 수 있다. 하기에는 전형적인 발현 카세트의 여러가지 성분이 기술되어 있다.

[0023] 발현 카세트에 사용되는 프로모터의 선택은 유전자전이 식물 중 전이 유전자의 공간적 및 주기적 발현 패턴을 결정한다. 선택된 프로모터는 특정 세포 타입(예를들면 잎 표피 세포, 엽육 세포, 뿌리 피층 세포) 또는 특정 조직 또는 기관(예를들면, 뿌리, 잎 또는 꽃)에서 전이유전자를 발현시키며, 선택은 유전자 생성물의 축적의 목적하는 위치를 반영한다. 달리, 선택된 프로모터는 여러가지 유도 조건하에서 유전자의 발현을 유발할 수 있다. 프로모터는 이들의 강도, 즉 전사를 증진시

[0024] 킬 수 있는 능력에 있어서 변화된다. 이용되는 숙주 세포 시스템에 따라서, 수많은 적합한 프로모터중 하나를 사용할 수 있다. 다음은 발현 카세트에 사용할 수 있는 프로모터의 비제한 예이다.

[0025] 예를 들어 CaMV 35S 프로모터상기 프로모터를 사용한 예가 공개된 특허원 EP 0 392 225(실시예 23)에 기재되어 있다. pCGN1761는 "이중" CaMV 35S 프로모터와 상기 프로모터와 종결자 사이에 독특한 EcoRI 부위를 갖는 tml 전사 종결자를 함유하며 pUC-타입 골격을 갖는다. 존재하는 EcoRI 부위외에 NotI 및 XhoI 부위를 포함하는 개질된 폴리링커를 갖는 pCGN1761의 유도체를 제작한다. 상기 유도체를 pCGN1761 ENX로 표시한다. pCGN1761

ENX는 유전자전이 식물중에서 35S 프로모터의 조절하에 이들을 발현시키고자하는 폴리링커내에서 cDNA 서열 또는 유전자 서열(미생물 ORF 서열을 포함)을 클로닝시키는데 유용하다. 상기와 같은 제작의 전체 35S 프로모터-유전자 서열-tml 종결자 카세트는 하기 기술되는 바와 같은 형질전환 벡터로 전달하기위해 프로모터에 대해 HindIII, SphI, SaII, 및 XbaI 부위 5' 및 종결자에 대해 XbaI, BamHI 및 BgII 부위 3'에 의해 절제될 수 있다. 또한, 다른 프로모터로 대체시키기위하여, 이중 35S 프로모터 단편을 HindIII, SphI, SaII, XbaI, 또는 PstI를 사용한 5' 절제 및 폴리링커 제한 부위(EcoRI, NotI 또는 XhoI)를 사용한 3' 절제에 의해 제거할 수 있다. 경우에 따라, 해독을 향상시킬 수 있는 서열을 도입시켜 클로닝 부위 주변을 개설시킬 수 있다.

[0026] 이는 과발현이 바람직할 경우 특히 유용하다. 예를들면, 미국 특허 제5,639,949호의 실시예 37에 기재된 바와 같이 해독 개시 부위를 최적화하여 pCGN1761 ENX를 개설시킬 수 있다.

[0027] B. 식물 형질전환 벡터의 제작

[0028] 식물 형질전환에 이용가능한 수많은 형질전환 벡터가 식물 형질전환 기술 분야에서의 숙련가에게 공지되어 있으며, 본 발명에 따른 유전자를 상기와 같은 벡터와 함께 사용할 수 있다. 벡터의 선택은 바람직한 형질전환 기술 및 형질전환용 표

[0029] 적 종에 따른다. 특정 표적 종의 경우, 상이한 항생제 또는 제초제 선택 마커가 바람직할 수 있다. 형질전환에 통상적으로 사용되는 선택 마커로는 가나마이신 및 관련 항생제에 대한 내성을 부여하는, nptII 유전자(Messing & Vierra. Gene

[0030] 19:259-268 (1982); Bevan et al., Nature 304:184-187 (1983), 제초제 포스포노트리신에 대한 내성을 부여하는 bar 유전자(White et al., Nucl. Acids Res 18:1062 (1990), Spencer et al. Theor. Appl. Genet 79:625-631 (1990)), 항생제 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 hph 유전자(Blochinger & Diggelmann, Mol Cell Biol 4:2929-2931), 및 메타트렉세이트에 대한 내성을 부여하는 dhfr 유전자(Bourouis et al., EMBO J. 2(7):1099-1104 (1983)), 및 글리포세이

[0031] 트에 대한 내성을 부여하는 EPSPS 유전자(미국 특허 제4,940,935호 및 제5,188,642호)가 있다.

[0032] C. 형질전환

[0033] 해당 암호화 서열을 발현 시스템중으로 일단 클로닝시킨 다음, 식물 세포중으로 형질전환시킨다. 식물의 형질전환 및 재생 방법은 당해 분야에 숙지되어 있다. 예를들면, Ti 플라스미드 벡터가 외래 DNA의 운반, 뿐만 아니라 직접적인 DNA 흡수, 리포솜, 일렉트로포레이션, 미세주입법, 및 미세발사체에 이용되고 있다. 또한, 아그로박테리움속으로부터의 세균을 이용하여 식물 세포를 형질전환시킬 수 있다. 이후 쌍자엽식물 및 단자엽식물 둘다를 형질전환시키는 대표적인 기술을 기재한다.

[0034] 본 발명의 명세서에서 사용된 용어는 다음과 같이 정의된다.

[0035] 식물 세포: 원형질체와 세포벽으로 이루어진, 식물의 구조 및 생리학적 단위. 용어 "식물 세포"는 식물의 일부 또는 식물로부터 유래된 세포를 언급한다. 세포의 일부에는 살아있는 식물의 일부인 분화된 세포; 배양중의 분화된 세포; 배양중의 비분화된 세포; 융합조직 또는 종양과 같은 비분화된 조직의 세포; 종자, 배아, 주아 및 화분의 분화된 세포가 있다.

[0036] 식물 조직: 구조 및 기능성 단위로 조직화된 식물 세포군. 식물체 또는 배양중 식물 조직이 포함된다. 이 용어는 비제한적으로, 전체 식물, 식물 기관, 식물 종자, 조직 배양 및 구조 및/또는 기능성 단위로 조직화된 식물 세포. 상기 열거한 것이거나 상기 정의에 포함되는 특정 타입의 식물 조직과 관련되거나, 부재하는 상이 용어를 사용하는 것은 다른 타입의 식물 조직만을 포함하는 것은 아니다.

[0037] 원형질체: 세포벽이 없는 식물 세포.

[0038] 유전자전이(또는 형질전환) 식물: 계놈중에 안정하게 포함된 재조합 DNA를 갖는 식물.

[0039] 재조합 DNA: 상이한 공급원으로부터의 DAN 절편을 연결하여 형성되고 재조합 DNA 기술을 사용하여 생산한 DNA 분자.

[0040] 재조합 DNA 기술: 재조합 DNA를 시험관내에서 생산하고 DNA를 발현시키거나 보급시킬 수 있는 세포중으로 재조합DNA를 운반시키는 기술(참조: Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Ed. Juo, CRC Press, Boca Raton (1996)), 예를들면, 원형질체(들) 또는 세포(들)중으로 DNA를 여러가지 형태로, 예를들어,

(1) 원형, 선형 또는 슈퍼코일된 형태의 나상(naked) DNA, (2) 뉴클레오솜 또는 염색체 또는 핵 또는 이의 일부중에 함유된 DNA, (3) 다른 분자와 복합체화되거나 관련된 DNA, (4) 리포솜, 원형질체(spheroplast), 세포 또는 원형질체중에 함포된 DNA 또는 (5) 숙주 유기체(예, *Agrobacterium tumefaciens*) 이외의 유기체로부터 전이된 DNA의 전이. 이들 및 다른 여러가지 세포 중의로의 재조합 DNA를 도입시키는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 이를 사용하여 본 발명의 유전자전이 세포 또는 유전자전이(또는 형질전환) 식물을 생산할 수 있다.

[0041] 재조합 DNA 기술은 또한 다음 문헌: Treco et al., WO 94/12650 및 Treco et al., WO 95/31560에 기술된 상동 재조합방법이 있으며, 이는 단자엽식물중 피옥시다제 활성을 증가시키는데 적용할 수 있다. 상술하면, 조절 영역(예, 프로모터)을 식물 계통중에 도입시켜 내인성 피옥시다제의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0042] 선택된 발현 시그날이 결여되어 있는 피옥시다제 암호화 서열을 단자엽식물중에 삽입시키고 단자엽식물 중에서 내인성조절 서열로 인한 피옥시다제의 증가된 발현에 대해 유전자전이 단자엽식물을 평가하는 것이 또한 재조합 DNA 기술로 포함된다. 이는 식물내에서 피옥시다제 암호화 서열의 카피수를 증가시킨다.

[0043] 발현 카세트: 프로모터와 종결기 사이에 암호화 서열을 삽입시킬 수 있는, 프로모터와 종결기를 포함하는 DNA 분자.

[0044] 본 발명에서 "식물에서의 면역 반응 조절"이란 용어는 다양한 병원균들이 함유한 특징적인 분자군 (미생물분자 패턴; MAMPs)을 식물세포 표면에 존재하는 자연면역 반응인식 수용체들이 인식하여 방어 반응을 개시하는 것을 의미한다. 이러한 방어기작은 수용체에 의한 인식을 통하여 다양한 신호전달 기구를 통하여 전달되어져 최종적으로 식물체가 병원균에 대한 저항 기작의 일종이 면역 능력을 함유하게 된다.

[0045] 본 명세서에 기재된 단백질 및 그 유전자에 의하여 보호될 수 있는 표적 작물의 예에는 비제한적으로, 다음과 같은 식물종이 포함된다: 곡류(옥수수, 밀, 보리, 호밀, 옌트, 쌀, 사탕수수 및 관련 작물); 참채류(사탕무 및 마초); 이과, 핵과 및 연과(사과, 배, 자두, 복숭아, 아몬드, 체리, 딸기, 래스베리 및 블랙베리); 콩과 식물(강낭콩, 렌즈콩, 완두콩, 대두); 유과 식물(평지, 겨자, 양귀비, 올리브, 해바라기, 코코넛, 피마자유 식물, 카카오씨, 땅콩); 오이과 식물(강낭콩(marrows), 오이, 멜론); 섬유과 식물(면화, 아마, 대마, 황마); 감귤류 식물(오렌지, 레몬, 그레이프푸르트, 귤); 야채류(시금치, 양상추, 아스파라거스, 양배추, 당근, 양파, 토마토, 감자, 파프리카); 로라세(lauraceae)(아보카도, 계피, 장뇌); 또는 담배, 너트, 커피, 당밀, 차, 포도나무, 호프, 바나나 및 천연 고무 식물과 같은 식물 뿐만 아니라 장식용 식물(꽃, 관목, 활엽수 및 상록수, 예: 침엽수). 상기 목록으로 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 방법을 사용하여 비제한적으로 하기의 것들을 포함한, 광범위한 식물 병원균에 대한 내성을 부여할 수 있다:

[0047] 바이러스 또는 비로이드, 예로서 담배 또는 오이 모자이크 바이러스, 링스포트 바이러스 또는 괴사 바이러스, 켈라르그놈 잎마름 바이러스, 적색 클로버 얼룩 바이러스, 토마토 부시 스텐트 바이러스, 등; 아스코마이세테(Ascomycete) 진균류,

[0048] 예로서 벤투리아(Venturia), 포도스페라(Podosphaera), 에리시페(Erysiphe), 모놀리니아(Monolinia), 마이코스페렐라(Mycosphaerella), 및 운시놀라(Uncinula) 속; 바시디오마이세테(Basidiomycete) 진균류, 예로서 헤밀레이아(Hemileia), 리족토니아(Rhizoctonia), 및 푸치니아(Puccinia) 속; 불완전 진균, 예로서 보트리티스(Botrytis), 헬민토스포륨(Helminthosporium), 린초스포륨(Rhynchosporium), 푸사륨(Fusarium)(즉, F. moniliforme), 셉토리아(Septoria), 세르코스포라 (Cercospora), 알터나리아(Alternaria), 피리컬라리아(Pyricularia), 및 슈도세르코스포렐라 속(Pseudocercospora; 즉, P. herpotrichoides); 오오마이세테 (Oomycete) 진균류, 예로서 피토프토라(Phytophthora; 즉, P. parasitica), 페로노스포라(Peronospora; 즉, P. tabacina), 브레미아(Bremia), 피툼(Pythium), 및 플라스모파라(Plasmopara) 속; 뿐만 아니라 스클레로프토라 매크로스포라 (Sclerophthora macrospora), 스클레로프토라 레이시아(Sclerophthora rayissiae), 스클레로스포라 그라미니콜라(Sclerospora graminicola), 페로노스클레로스포라 소르기(Peronosclerospora sorghi), 페로노스클레로스포라 필리피넨시스 (Peronosclerospora philippinensis), 페로노스클레로스포라 사카리(Peronosclerospora sacchari) 및 페로노스클레로스포라 메이디스 (Peronosclerospora maydis), 피조켈라 지아(Peronosclerospora zeae), 세르코스포라 지아-메이디스(Cercospora zeae-maydis), 콜레토티리움 그라미니

[0049] 콜라(Colletotrichum graminicola), 지베렐라 지아(Gibberella zeae), 엑세롤룸 투르시쿰(Exserohilum

turcicum), 카바티엘루 지아(Kabatiellu zae) 및 비폴라리스 메이디스(Bipolaris maydis); 세균류, 예로서 슈도모나스 시린개(Pseudomonas syringae), 슈도모나스 타박(Pseudomonas tabaci), 및 에르위니아 스튜워트(Erwinia stewartii); 곤충류, 예로서 거미, 예를들면 마이조스 페르시캐(Myzus persicae); 및 레피도프테라(Lepidoptera), 예로서 헬리오투스종(Helliothus)종; 및 선충류, 예로서 멜로이도가인 인코그니타(Melodogyne incognita).

[0050] 이하 본 발명을 설명한다.

[0051] 병원균에 대한 식물의 방어반응의 중심 구성요소가 프로그램 세포 사멸(PCD)의 일종인 과민성 반응(hypersensitive response;HR). 신속하고 국소화된 HR-PCD의 유도는 병원균 침입을 예방하게 한다. 자식작용(Autophagy)은 HR-PCD를 조절하는 기작으로 제안되었으나, 자식작용과 HR-PCD 사이의 기능적인 관계에 대해서는 알려진 것이 없었다. 본 발명에서 본 발명자들은 작은 GTP 결합 단백질인 RabG3b가 자식작용에서 역할을 하며 HR-PCD를 조절한다는 것을 밝혔다. 야생형(WT) RabG3b (RabG3bOX) 또는 컨스티투티브하게 활성화된 돌연변이체(RabG3bCA)를 과발현하는 형질전환 식물들을 감염에 대하여 제한되지 않은 HR-PCD를 나타낸 반면, 도미넌트 네가티브 돌연변이체(RabG3bDN)를 과발현하는 형질전환 식물과 WT 식물체 사이에 주요한 차이는 관찰되지 않았다. 현미경 분석은 소포체(vesicle) 트래픽킹(trafficking)과 오토리조솜 형성은 RabG3bOX 및 RabG3bCA 형질전환 식물체에서 변종을 나타낸다. 본 발명은 식물 면역 반응에서 HR-PCD를 조절하는 소포체 트래픽킹과 자식작용에서 필수적인 구성요소로서 RabG3b를 동정하였다.

[0052] 본 발명의 기능연구들에서, 야생형 (RabG3bOX) 및 컨스티투티브하게 활성화된 (RabG3bCA) RabG3b를 과발현하는 형질전환 식물은 FB1, *Alternaria brassicicola*, 및 *Pseudomonas syringae*에 대한 확장된 HR-PCD를 나타낸다. 야생형 식물체에 비교하여 도미넌트 네가티브 RabG3b-과발현 형질전환 식물체 (RabG3bDN)는 현저한 형태학적 변화가 관찰되지 않았다. 막 트래픽킹, HR-PCD 및 자식작용에서 RabG3b의 역할을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 FB1 및 병원균으로 처리한 것에 대한 세포내 트래픽킹과 자식작용 경로의 여러 측면을 현미경적으로 조사하였다. 본 발명에서 본 발명자들은 RabG3b가 소포체 트래픽킹 및 자식작용, 특히 액포로 자가용해리소솜 (autophagosomes)을 융합하여 세포사멸 진행 및 식물에서 선천적인 면역성을 조절한다는 것을 확인하였다.

[0053] 본 발명에서는 조직들에서 RabG3b의 발현을 RT-PCR과 웨스턴 블롯 분석으로 결정하였다 (도 13 참고). Both RabG3b 전사체 및 RabG3b 단백질들은 모든 조직 특히 오래된 잎에서 많이 검출되었다.

[0054] 식물에서 RabG3b의 기능을 결정하기 위하여, 본 발명자들은 WT 또는 RabG3b 돌연변이체를 과발현하는 RabG3bOX, RabG3bCA, 및 RabG3bDN 형질전환체 식물을 제조하였다. CA (Q67L) 및 DN (T22N) 돌연변이는 각각 GTP-결합 및 GDP-결합 RabG3b를 야기하였다(도 6 참고). 각 컨스트럭트에 대하여, 두 동형접합 라인[homozygous lines (T3)]을 나타내는 트랜스진 과발현은 기능 분석을 선택하였다(see 도 7 참고). RabG3bOX, RabG3bCA, 및 RabG3bDN 형질전환 식물체는 형태학적으로 WT와 같이 정상이었다.

[0055] Genevestigator에서 입수할 수 있는 마이크로어레이 데이터는 RabG3b는 PCD 및 노화(senescence) 동안 크게 유도되었다. 따라서 본 발명자들은 WT, RabG3bOX, RabG3bCA, 및 RabG3bDN 식물체들에서 잎 노화를 조사하였다 (도 1). RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체로부터 떨어진 잎은 WT 및 RabG3bDN 식물의 것에 비교하여 가속화된 노화를 진행하였다(도 1A). WT 잎에서 RabG3b의 전사 레벨은 노화의 12에서 24시간 동안에 증가되었다(도 1B). 유사한 단백질 발현 패턴이 관찰되었다(도 1C). 이들 결과들은 RabG3b가 식물 노화에서 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

[0056] RabG3b가 SA-반응성 단백질의 스크리닝을 통하여 분리되었기 때문에, 본 발명자들은 박테리아 병원균으로 *P. syringae* 또는 진균류 병원균으로 *A. brassicicola*를 접종한 후 WT, RabG3bOX, RabG3bCA, 및 RabG3bDN 식물체의 형태를 조사하였다(도 2, 도 8 및 도 9 참고). 독성 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) 감염에 대하여, 세균 성장은 야생형 식물에 비하여 RabG3bCA 식물에서 증가(3배)하였고, 병 증상은 RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체 모두에서 증가하였다(도 2A 및 2B). 증가된 세균 증식과 상관관계가 있는 몇 질병 증상이 비독성 *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)로 접종된 RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체(각각 7.3-배 및 41.9-배)에서 발생하였다. 유

사한 결과들은 또 다른 비독성 *Pst* DC3000 (*avrRpm1*)로부터 얻었다.

[0057] 본 발명자들은 다음으로 *A. brassicicola* (도 2C 및 2D, 도 9 참고)로 접종한 후에 행태를 조사하였다. WT 및 RabG3bDN 식물체와 다르게, RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체들은 감염 부위에서 진균 포자의 대량 형성, 곰팡이 균사에 의한 심한 군집 및 확산되는 장애의 형성에 의하여 결정된 것과 같은 민감한 표현형을 나타내었다(도 2 및 도 9 참고). *E. carotovora*로 감염된 식물의 반응은 부가적으로 분석하였고 질병 증상은 RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체에서 발생하였다. WT 및 RabG3bDN 식물체들은 테스트된 병원균에 대하여 질병 증상 발생 및 세균 증식이 크게 다르지 않았다(도 2 및 도 8과 도 9 참고). RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체는 *Pst* DC3000 (*avrRpt2*) 및 *A. brassicicola* 로 접종 후 24시간에서 확장된 장애를 나타내었다는 것에 주목한다. 이 가속화되고 확장된 장애는 전형적인 질병 증상이라기 보다는 HR-PCD와 관련된 세포 사멸에 기인하는 것 같다.

[0058] 병원균 처리에 의하여 유도된 퍼지는 손상이 비조절된 HR-PCD으로부터 야기되는지를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 주지된 PCD-유도 마이코토신 FB1으로 식물을 처리하였다. 병원균 감염으로 관찰된 것에 따르면, FB1-처리된 RabG3bOX 및 RabG3bCA는 침투 자리에 한정된 작은 손상이 형성된 WT 및 RabG3bDN 잎과 대조적으로 퍼지는 세포 사멸을 나타내었다(도 3A). FB1으로 처리된 잎들의 단면 이미지는 WT 및 RabG3bDN 식물체와 비교하여 RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체에서 심하게 손상된 세포 내 구조 및 RabG3bCA 식물체에서 심지어 완전한 붕괴를 나타내었다(도 3B).

[0059] PCD를 나타내는 DNA 절편화는 terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 분석 및 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 염색을 사용한 에팍토틱 핵을 염색하여 검출될 수 있다. 핵의 축소나 절편화와 같은 부가적인 PCD-관련 이벤트들은 투과 전자 현미경(TEM)에 의하여 관찰될 수 있다. 도 3C에서 알 수 있는 바와 같이, 에팍토틱 핵 변화가 RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체에서 컨스티투티브하게 일어나고 FB1 처리에 의하여 더욱 촉진되었다. 그러나, WT 및 RabG3bDN 식물체는 FB1 투입 후에서만 절편화, 핵 수축 및 TUNEL-양성 신호를 나타내었다. ROS 생성은 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA)를 사용하여 프로토프라스트에서 측정되었다(Figure 3D). ROS 생성은 포지티브하게 염색된 프로토프라스트 수 및 RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체에서 염색의 강도 모두는 크게 증가하였다. 이 데이터는 RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체들은 자발적으로 가시적인 증상없이 세포 사멸을 당하고, 에팍토틱 세포 사멸을 야기하는 확장된 손상을 유도적으로 형성한다는 것을 제안한다.

[0060] 본 발명자들은 WT, RabG3bOX, RabG3bCA, 및 RabG3bDN 식물체들에서 자가용해리소좀 구조를 체크하였다(도 4 및 도 10-12 참고). 식물체들을 PCD-유도제로 FB1 및 *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)으로 음성 대조군으로 *Pst* DC3000으로 처리하였다. 자식작용(Autophagy)을 두 산성지향성(acidotropic) 염료인, LysoTracker Green (LTG) (Via, L.E., Fratti, R.A., McFalone, M., Pagan-Ramos, E., Deretic, D., and Deretic, V. (1998). J. Cell Sci. 111: 897-905)과 monodansylcadaverine (MDC) (Contento, A.L., Xiong, Y., and Bassham, D.C. (2005). Plant J. 42: 598-608; Patel, S., and Dinesh-Kumar, S.P. (2008). Autophagy 4: 20-27)으로 염색하여 상피 및 잎살(mesophyll) 조직에서 모니터링하였다. FB1 및 *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)의 처리는 상피 및 잎살 조직 모두에서 LTG-및 MDC-염색된 구조들의 형성을 촉진하였다(도 4 및 도 12 참고). 이들 점상(punctate) 구조들은 처리 및 비처리 부위 모두에서 관찰되었다(도 10 참고). MDC-염색된 구조들이 RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체에서 LTG-염색된 구조들보다 더 많았고, 이것은 MDC 및 LTG가 자가용해리소좀 숙성의 다른 단계에서 자가용해리소좀 구조를 다르게 염색할 수 있다는 것을 암시한다(도 4 및 도 10과 12 참고). RabG3b가 액포와 자가용해리소좀의 융합에 관여할 수 있는 것을 고려하여, 이들 결과들은 RabG3bCA 및 RabG3bOX 식물체들은 자가용해리소좀 턴오버에서 결손될 수 있고, 따라서 세포들에서 자가용해리소좀들을 축적할 수 있다는 것을 나타낸다. 이 관점에서 LTG는 자가용해리소좀을 더 선호하게 염색할 수 있는 반면 MDC는 오토파고솜과 자가용해리소좀 모두를 염색할 수 있다. 융합 과정에서 결손에 기인한 오토파고솜의 축적은 FB1과 병원균에 의하여 처리된 RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체에서 관찰된 확장된 세포 사멸의 기초일 수 있다. 반면, 증가된 점상 구조들은 RabG3bDN 식물체에서 검출되고, 이것은 증가된 오토파고솜-액포 융합에 기인한 액포에서 자식작용체(autophagic bodies)들의 축적을 나타낸다(도 4 및 도 10과 12 참고). Concanamycin A는 액포 하이드로레이즈를 저해하는 V-ATPase 저해제로 액포에서 자식작용체의 축적을 유도한다. concanamycin A의 존재하에서 FB1 처리는 WT, RabG3bOX, 및 RabG3bDN 식물체에서 염색된 점상 구조들의 크기를 증가시키지만, RabG3bCA 식물체에는 영향이 없다(도 4C). 이 결과들은 RabG3b가 액포와 오토파고솜의 융합에 역할을 하고 자식작용에서 작용하기 위해서는 GTP가 GDP로 가수분해되어야 할 필요가 있다는 것을 나타낸다.

- [0061] TEM은 FB1 또는 *Pst* DC3000 (*avrRpt2*) 투입 후 WT 및 형질전환 식물체 세포의 미세구조를 관찰하기 위하여 수행되었다(도 5A). 본 발명자들은 WT 및 RabG3bDN 세포들에서 액포와 융합되고(도 5A, 패널 2와 3), 기관들 및 원형질 구성요소를 함유하는 많은 자식작용 구조를 관찰하였다(도 5A, 패널 1, 2, 10, 및 11). 또 RabG3bDN 세포들은 액포에서 자식작용체를 형성하였다(도 5A, 패널 3 및 12). 비처리된 식물들은 자식작용 모습을 나타내지 않았다. RabG3bOX 및 RabG3bCA 세포들은 또한 오토파고솜-유사 구조들을 형성하였고(도 5A, 패널 4, 5, 및 7) 많은 수의 소포체 및 프라스티드를 포함하는 손상된 구조들을 현저하게 축적하였다(도 5A, 패널 6, 8, 및 9). 본 발명자들은 또한 FB1 처리 동안에 세포 구성요소들에서 일시적인 변화들을 조사하였다(도 5B). FB1-처리된 WT 세포들은 세포 구성요소들을 분해하는 자가용해리소솜을 형성하기 위하여 오토파고솜이 융합된 큰 액포를 초기에 나타내었다. 반면에 FB1-처리된 RabG3bCA 세포들은 초기 및 시간이 지남에 따라 많은 수의 소포체로 충전되고 그 세포들은 수축되고 세포 구성요소들은 죽은 세포를 나타내는 고전자밀도 물질들로 나타났다.
- [0062] 오토파고솜에서 담배에서 RabG3b 단백질들의 위치는 WT, CA, 및 DN 형태의 RabG3b 중 하나와 오토파고솜 마커 단백질인 ATG8을 공발현시켜서 조사하였다(도 5C). RabG3b 단백질은 원형질과 소포체에 존재하였다. 소포체의 RabG3b 단백질들이 ATG8 단백질과 동시에 존재하고, 이것은 RabG3b 단백질들이 오토파고솜에 존재하고 그 RabG3b-관련된 소포체들이 오토파고솜들을 나타낸다는 것을 나타낸다.
- [0063] 본 발명에서 식물체에서 WT 및 CA 형태의 *RabG3b* 의 과발현이 FB1 곰팡이 독신 및 병원균에 대한 확장된 HR-PCD 반응 및 가속화된 잎 노화를 야기한다. 본 발명자들은 식물체-병원균 상호작용 동안에 RabG3b는 HR-PCD를 조절하는 자식작용에서 역할을 한다는 것을 증명하였다.
- [0064] 또 본 발명은 RabG3b가 소포체 트래픽킹 및 오토파고솜/자가용해리소솜 형성에서 역할을 한다는 것을 나타내었다.
- [0065] 본 발명자들은 RabG3b-관련 자식작용 활성화가 애기장대에서 선천적 면역반응 동안에 HR-PCD를 조절하는 것을 보였다. RabG3bCA 및 RabG3bOX 식물체에서 나타난 것과 같은 가속화된 잎 노화 및 비조절된 HR-PCD는 이전에, *ATG7*, *ATG9*, 및 *ATG6/Becn1* 돌연변이 식물체(Doelling, J.H., Walker, J.M., Friedman, E.M., Thompson, A.R., and Vierstra, R.D. (2002). *J. Biol. Chem.* 277: 33105-33114)에서도 나타났다. 본 발명의 결과는 자식작용은 식물 선천적 면역에서 HR-PCD를 조절하는 주요한 시스템이고 그 확장된 세포 사멸은 손상된 자식작용의 결과라는 것을 나타낸다.
- [0066] HR-PCD가 병원균을 물리적으로 고립하여서 병에 대한 저항성을 부여한다고 오랫동안 알려져 왔다. 그러나 세포 사멸 자체는 병원균의 억제에 필수적이지 않을 수 있다. 본 발명자들은 병원균 성장이 종종 감염 부위를 넘어서 검출되므로 RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체에서 확장된 HR-PCD가 감염 부위에서 병원균 성장을 충분히 제한할 수 없다는 것을 발견하였다. 이들 결과들은 병원균 확산의 완전한 제한을 위하여 HR-PCD가 유일한 과정이 아니라 자식작용에 의하여 동반되어야 한다는 것을 제안한다. 이들 결과들은 자식작용이 식물 선천적 면역 동안에 HR-PCD 및 병원균 성장을 억제하여 세포 생존 기작으로서 작용한다는 것을 나타낸다.
- [0067] 선천적 및 적응성 면역에서 자식작용의 중요성은 포유류 시스템에서 강조되어 왔다(Huang, J., and Klionsky, D.J. (2007). *Cell Cycle* 6: 1837-1849.). 자식작용의 주된 역할은 병원균의 직접적인 제거이다. 침입한 박테리아와 바이러스들은 오토파고솜으로 타겟되고 그 후에 제노파지(xenophagy)라는 과정에서 분해되기 위하여 리조솜으로 운반된다(Levine, B. (2005). *Cell* 120: 159-162.). 직접적인 병원균 사멸 이외에 제노파지 분해는 선천적 및 적응성 면역 시스템에 주 조직적합 복합체 class II (MHC II) 프레젠테이션을 위한 미생물 항원을 제공하는 기능을 할 수 있다(Levine, B. (2005). *Cell* 120: 159-162.).
- [0068] FB1- 및 병원균-촉발된 HR-PCD는 감염 부위 뿐만 아니라 비감염 지역에서 오토파고솜/자가용해리소솜 형성이 동반된다. 이 결과들은 세포들이 서로 커뮤니케이션한다는 것이고 소위 "프로-데스(pro-death)"신호가 처음에는 감염 세포에서 생성되어 자식작용에 의하여 제한된 건강한 주변 세포들에 세포 사멸을 확산시킨다는 것을 알 수 있다. 또는 자식작용이 처음에는 프로-데스 신호에 의하여 촉발되어 자식작용을 더욱 활성화하고 세포들을 보호하기 위하여 다른 비감염된 조직으로 "프로-서바이벌" 신호를 생성하여 전달할 수 있다. 또는 "프로-데스"와 "프로-서바이벌" 신호 모두가 생성되나 에팍토시스 및 자식작용 사이의 협동적인 상호작용에 의하여 균형이 될 수 있다. ROS는 HC-PCD 개시전에 일반적으로 생성되고, 방어 반응을 중재하는 신호 분자로서 작용하거나 병원균을 직접 사멸하여 작용하기 때문에 "프로-데스"와 "프로-서바이벌" 신호의 후보물질 중 하나이다(Torres, M.A., and Dangl, J.L. (2005). *Curr. Opin.Plant Biol.* 8: 397-403.). RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체들은 오토파고솜의 형성과 함께 H₂O₂ 를 축적하고, 자식작용에서 ROS에 관련된다.

[0069] 본 발명의 결과는 RabG3b 단백질이 오토파고솜, 일부 소포체 및 트렉픽킹 경로에서 PVC 및 TGN과 같은 세포 기관에 위치한다는 것을 나타낸다. PCD-유도 조건 하에서, 대부분 RabG3b 단백질들은 WT 및 RabG3bDN 식물체에서는 세포벽 또는 세포의 스페이스로 이동하였지만 RabG3bOX 및 RabG3bCA 식물체에서는 그러하지 않았고, 이것은 RabG3b의 분비가 액포와 오토파고솜의 융합에 의존한다는 것을 나타낸다. 이것은 작은 GTP-결합 단백질의 세포 외 위치가 식물 또는 동물에서 보고된 바 없기에 최초의 결과이다.

효 과

[0070] 상기에서 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 단백질 및 유전자는 식물에 있어서, 식물 병원균 등에 대한 면역성을 조절할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0071] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 목적으로 기재된 것이므로, 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되지 아니한다.

[0072] 실시예 1: 식물체, 성장 조건 및 처리

[0073] *Arabidopsis thaliana* 식물체들을(Col-0) 병원균-유도된 질병 분석을 위하여 긴 날 조건(16-h 명/8-h 암 주기) 하에서 성장 림, 또는 짧은 날 조건들(8-h 명/16-h 암 주기) 하에서 성장 챔버에서 24℃에서 성장하였다.

[0074] *RabG3b*를 과발현하는 형질전환체 식물을 생성하기 위하여, *RabG3b* (At1g22740) cDNA를 사용하여 증폭된 PCR산물들을 CaMV 35S 프로모터의 조절 하에서 바이너리 벡터 pBI121로 클론하였다. RabG3bCA (RabG3b[Q67L]) 및 RabG3bDN (RabG3b[T22N])를 생성하기 위한 *RabG3b*의 포인트 돌연변이를 하기 프라이머를 사용하여 PCR에 의하여 생성하였다: *RabG3bCA*, 5'CAA ATA TGG GAC ACT GCT GGG CTA GAG AGG TTT CAA AGT CTT G-3'(서열번호 3) 및 5'CAA GAC TTT GAA ACC TCT CTA GCC CAG CAG TGT CCC ATA TTT G-3'(서열번호 4), *RabG3bDN*, 5'GAG ACA GCG GGG TTG GCA AAA ACT CGT TGA TGA ATC AAT ATG TG-3'(서열번호 5) 및 5'CAC ATA TTG ATT CAT CAA CGA GTT TTT GCC AAC CCC GCT GTC TC-3'(서열번호 6). 애기장대 식물체들은 플라우어 덤 방법을 사용하여 형질전환하였다(Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). *Floral dip*: Plant J. 16: 735-743.).

[0075] 잎 노화 분석을 위하여, 4-주령 식물의 잎들을 분리해서 암 조건의 상온에서 탈이온화수에 뜨게하여서 1일, 3일 및 7일에 촬영하였다(Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallozy, Z., Levine, B., and Dinesh-Kumar, S.P. (2005). *Cell* 121: 567-577.).

[0076] *Pts* DC3000 (*avrRpt2*) 및 *Pst* DC3000을 100 µg/ml 리팜피신 및 50 µg/ml 가나마이신을 함유한 NYGA 배지에서 성장하였다(Kwon, S.I., Koczan, J.M., and Gassmann, W. (2004). *Plant J.* 40: 366-375.). 질병 증상을 관찰하기 위하여, 4-주령 식물체들의 잎을 10⁶ cfu/ml의 박테리아 현탁액으로 침투하였다. 박테리아 성장 분석을 위해서, 4-주령 식물체들을 *Pst* DC3000 또는 *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)의 박테리아 10⁵ cfu/ml 현탁액으로 침투시켰다. 잎 디스크(0.5 cm²)를 10 mM MgCl₂에서 분쇄하여 연속적으로 희석하고 타이터를 결정하기 위하여 플레이트 아웃하였다.

[0077] *Alternaria brassicicola*를 10-µL 드롭의 포자 현탁액(5 x 10⁵ spores/ml)을 적용하여서 4 주령 식물체의 잎에 접종하였다(Oh, I.S., Park, A.R., Bae, M.S., Kwon, S.J., Kim, Y.S., Lee, J.E., Kang, N.Y., Lee, S., Cheong, H., and Park, O.K. (2005). *Plant Cell* 17: 2832-2847.). 접종된 식물체들을 지시된 시간 동안 성장 챔버에서 100% 상대 습도에서 유지하였다. 포자의 수를 계수하기 위하여, 10 잎들을 모아서 테스트 튜브에서 5 ml의 0.1% Tween 20에서 진탕하였다. 잎들을 제거하고 그 포자-함유 현탁액을 5000g에서 15 분간 원심분리하였다. 그 포자들을 200 µl의 0.1% Tween 20에서 재부유하고, 연속적으로 희석하고 현미경으로 계수하였다. 그 손상(lesions) 및 곰팡이 균사들을 전에 기재된 방법에 따라 감염된 잎들을 염색하여 육안화하였다(Oh, I.S., Park, A.R., Bae, M.S., Kwon, S.J., Kim, Y.S., Lee, J.E., Kang, N.Y., Lee, S., Cheong, H., and Park, O.K. (2005). *Plant Cell* 17: 2832-2847.). 4일 동안 *A. brassicicola*로 처리된 분리된 잎들을 lactophenol-aniline blue로 염색하였다.

[0078] FBI (Sigma-Aldrich) 처리를 위하여(Watanabe, N., and Lam, E. (2006). Plant J. 45: 884-894.), 흡에서 성장한 4주령 식물체의 잎들을 바늘없는 1ml 주사기를 사용하여 10 μ M FBI로 접종하여 3일동안 성장 챔버에서 유지하였다.

[0079] 실시예 2: RNA 분석

[0080] RT-PCR를 Reverse Transcription System (iNtRON)을 사용한 여러 애기장대 조직으로부터 추출된 1 μ g 전체 RNA (또는 100 ng polyA⁺ RNA로 수행하였다. cDNA들을 증폭하기 위한 프라이머들을 표 1에 요약하였다.

표 1

Genes	Forward Primers	Reverse Primers
<i>RabG3b</i>	AGAAGGCTAGAGAATGGTGTGCTGA	CATACAAATCGTGAACCACCAAAATG
<i>AtSEN1</i>	ACATCACGAATTGGAAACTGGTCA	TTGACCGCTCTCACAACCGATTAT
<i>ATG1a</i>	GAAAAGGCTGATATGTGGAGTG	GAACCTTGATGCTCTCTCCTCT
<i>ATG1c</i>	GCAACAACCTTAGTCGATTGG	TTCTCTGCGTCTCCCATCAC
<i>ATG3</i>	CTTACCATCCATGGATGCCT	CCGAGATCAAAGTCCATTGT
<i>ATG4b</i>	TTGAGCCTATTGGAGACACAAC	AATGTACCTGGGGTTCCTCT
<i>ATG5</i>	CCATGGAATCTCACGATACACT	CCCTTCTTCTTTGAGGAAGTCA
<i>ATG6</i>	TGTCTTCTCTCCATACGATGT	TGAAGGCTTACTAGAGTCAGGA
<i>ATG7</i>	TCATGATGCGGTGTTCTTGT	GTAAGATCCTCCAGGTATGT
<i>ATG8a</i>	TTCGCAGAGACTAATCGAATCG	GACATCAATGCAGCAGTTGGA
<i>ATG8b</i>	GCTTTCTAATCTCTGGAGATG	ATCAGACGTAGAAGCTGAGGTA
<i>ATG8c</i>	TGGAACACCCACTAGAGAGGA	CAGCACAAAAGCATTGGAAGG
<i>ATG8d</i>	CAAGCATGAACATCTCTTGAAG	TAGAAGAAGATCCCGAACGTGTTT
<i>ATG8e</i>	TGGACGACGATTTGAAAAGAG	CATTAAAACGTGGCGGATTCTC
<i>ATG8f</i>	GCAAGAGCATGACTTAGAGAAG	ATATTAACGCCCGACCAAAGG
<i>ATG8g</i>	AGAAATACCTTGCCAGCTGA	CAAACCGATTGGTTGTGCCTA
<i>ATG8h</i>	CTCCTCTGATGAGAGATTGAAGG	CAGTAACAACAAGAGCTGACGT
<i>ATG8i</i>	CGGATTCCAGTAATTGCTGAGA	GAACGATTGTGCACAGATGAAC
<i>ATG9</i>	CACACTGATTCAATGTGGCT	CATCGTCGAAATGGAGATCA
<i>ATG18a</i>	AATAGCTTGCTTCGCTCTCA	TCAGACAGTTGTGGTACTCA
<i>ATG18b</i>	ATTGCTACAGGATCTGAGCA	CAGTGTCATAGAGACTCAT
<i>ATG18c</i>	TTGCGTGTATGACCTTGACA	TCACGGGATCAAAGCTGCAT
<i>ATG18d</i>	TATCGCGTGCATGACCTTGA	GTTCAAGCTGAGTCATCTCT
<i>VPS34</i>	AGGTGTTAGCAACTGGACATGA	TTGAGAATGCCCTTTTCTGGGT
<i>UBQ10</i>	GATCTTTGCCGAAAACAATTGGAGGATGGT	CGACTTGTTCATTAGAAAGAAAGAGATAACAGG
<i>Actin</i>	GGCGATGAAGCTCAATCCAAACG	GGTCACGACCAGCAAGATCAAGACG

[0081]

[0082] 표 1은 RT-PCR에 대하여 사용된 유전자 특이적인 프라이머를 나타낸다.

[0083] 실시예 3: 단백질 분석

[0084] *RabG3b*의 전장 코딩 부위를 pET15 벡터(Novagen)에 클로닝하고 *E. coli* (BL21) 세포의 형질전환에 사용하였다. 재조합 *RabG3b* 단백질들의 생성은 1 mM IPTG의 첨가에 의하여 2시간 동안 유도되었고 제조업자(Qiagen)의 지시에 따라서 Ni⁺-NTA 컬럼을 사용하여 정제하였다. 친화-정제된 재조합 단백질을 토끼에서 항-RabG3b 항체를 증

가시킴을 위하여 사용하였다. 웨스턴 블롯 분석은 표준 프로토콜(Lee, S., Lee, E.J., Yang, E.J., Lee, J.E., Park, A.R., Song, W.H., and Park, O.K. (2004). Plant Cell 16: 378-391.)을 사용하여 수행하였다. 단백질을 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 분리하고, polyvinylidene difluoride 막으로 옮겨서 항-RabG3b 항체로 4°C에서 오버나잇 프로브하였다. 항체-결합된 단백질을 ECL 시스템(Amersham Biosciences)을 사용하여 horseradish peroxidase 결합된 2차 항체와 배양한 후 검출하였다.

[0085] 실시예 4:TUNEL 및 DAPI 염색

[0086] TUNEL 염색을 위하여, 샘플들을 RNase (30 µg/ml)와 Proteinase K (20 µg/ml)로 먼저 처리하고, 구연산 버퍼 (300 mM NaCl 및 30 mM sodium citrate)에서 1% Triton X-100으로 처리하였다. TUNEL 용액을 *in situ* 세포 사멸 검출 키트(Promega)의 지시에 따라서 제조하였다. 처리된 샘플들을 37°C에서 1시간 동안 암실에서 유지하고 공초점 현미경(Zeiss LSM 510 META)을 사용하여 488-505 nm에서 관찰하였다. 샘플들을 DAPI 용액(0.1 µg/ml DAPI, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM mercaptoethylamine, 및 10 mM Tris-HCl [pH 7.4])으로 5-10 분간 염색하고 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0087] 실시예 5:H₂O₂ 염색

[0088] 인 비보 H₂O₂ 측정을 위하여, 잎으로부터 분리된 프로토플라스트를 2 µM H₂DCFDA (Molecular Probes)에서 2분간 배양하였다. 프로토플라스트를 현미경 슬라이드에 옮겨서 H₂O₂-산화된 프로브의 녹색 형광성을 보기 위하여 공초점 현미경(Zeiss LSM 510 META)을 사용하여 488-505 nm에서 관찰하였다. H₂O₂는 3,3'-diaminobenzidine (DAB)를 사용하여 내생적인 퍼옥시데이즈-의존성 인 시투 조직화학 염색 과정에 의하여 검출하였다. 잎들을 상온에서 1 mg/ml DAB (pH 5.5)를 함유하는 용액에서 2시간 정치하고, 95% 에탄올에서 2분간 가열하고, 증류수에 저장하였다. H₂O₂ 생성은 적갈색으로 확인하였다. 이미지들을 차지-커플된 디바이스 카메라(Leica EZ4D)를 가진 현미경을 사용하여 캡처하였다.

[0089] 실시예 6:트립판 블루 염색

[0090] 전에 기재된 방법(Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., and Dong, X. (1997). Plant Cell 9: 1573-1584.)에 따라 트립판 블루 염색을 수행하였다. 샘플들을 젖산-페놀-트립판 블루 용액(2.5 mg/ml trypan blue, 25% lactic acid, 23% water-saturated phenol, 및 25% glycerol)에 담근 후 1분간 가열하였다. 그 후 염색된 샘플들을 60% chloral hydrate에 정치하고 50% 글리세롤로 최종적으로 평형화하였다.

[0091] 실시예 7:LTG, MDC, 및 FM1-43 염색

[0092] LTG 및 MDC 염색은 전에 기재된 방법(Liu, Y., Schiff, M., Czymbek, K., Tallochy, Z., Levine, B., and Dinesh-Kumar, S.P. (2005). Cell 121: 567-577.)과 같이 수행되었다. 잎 조각들을 1 µM LTG DND-26 (Molecular Probes) 및 500 µM MDC (Fluka)로 침투시키고, 1시간 동안 암실에서 배양하였다. FM1-43 (Molecular Probes) 염색을 위하여, 잎 조각들을 15분간 얼음에서 정치시키고 20 µM FM1-43을 공급하였다. 그 샘플들을 26°C, 180 rpm에서 1 시간 동안 오비탈 진탕기상에 위치하였다. 이미지들을 공초점 현미경(Zeiss LSM 510 META)을 사용하여 얻었다. 사용된 파장들은 LTG에 대해서는 488-505, MDC에 대해서는 420-480 nm 그리고 엽록체에 대해서는 565-625 nm이었다. 소포체 트래픽킹의 살아있는 세포 이미지들을 살아있는 세포 이미징 시스템(PerkinElmer UltraVIEW ERS)을 사용하여 전체 경과시간 90분 동안에 매 20초마다 촬영하였다.

[0093] 실시예 8:RabG3b 및 ATG8의 코로칼라이제이션

[0094] RabG3b(WT)-TagCFP, RabG3b(CA)-TagCFP, RabG3b(DN)-TagCFP, 및 Atg8-Citrine에 대한 발현벡터를 함유한 GV2260 *Agrobacterium* 을 오버나잇 배양하고, 10 mM Morpholinoethanesulfonic acid, 10 mM MgCl₂, 및 200 µM

acetosyringone을 함유한 침윤 배지에 재부유하였다. 배양액을 2시간 배양하고 1.0의 OD₆₀₀ 로 희석하였다. 동부피의 RabG3b-TagCFP 및 Atg8-Citrine을 혼합하고, *N. benthamiana* 잎들에 침윤하였다. 48 시간 후, 생존 조직 샘플들을 잘라서 공초점 현미경(Zeiss LSM 510 META) 상에서 이미지하였다. 엽록체 및 TagCFP를 META 디텍터(651-704 nm)를 가지는 458nm 레이저 라인 또는 465-510 nm 밴드 패스 필터를 각각 사용하여 이미지화하였다. 시트린은 514nm 레이저 라인 또는 520-555 nm 밴드 패스 필터를 사용하여 분리된 트랙상에서 이미지화하였다. Colocalization of TagCFP 및 Citrine의 코로칼라이제이션은 채널 크로스토크를 제거하기 위하여 패스트 라인 트랙 스위칭에 의하여 수행되었다.

[0095] 실시예 9: RabG3b의 세포내 위치

[0096] GFP:RabG3b 및 RFP:RabG3b의 키메라 융합 컨스트럭스를 생성하기 위하여, 전장 *RabG3b*를 *XmaI* 및 *XhoI* (밀줄친)에 대한 서열들을 가지는 프라이머를 사용하여 PCR에 의하여 증폭하였다:

[0097] 5'CCC GGG CAA TGT CGA GAA GAC GAA-3'(서열번호 7) 및 5'CCG CTC GAG TCA GCA AGC ACA ACC TCC T-3'(서열번호 8). 그 증폭된 DNA들을 GFP 또는 RFP의 C-말단에 인 프레임하게 RabG3b를 융합하는데 사용하였다. 그 키메라 GFP 및 RFP 융합 컨스트럭트를 프로토플라스트에서 발현하기 위하여 CaMV 35S 프로모터의 조절하에 위치시키고, 폴리에틸렌 글리콜-매개되는 형질전환에 의하여 전체 묘목으로부터 제조된 애기장대 프로토플라스트로 투입되었다(Kim, D.H., Eu, Y.J., Yoo, C.M., Kim, Y.W., Pih, K.T., Jin, J.B., Kim, S.J., Stenmark, H., and Hwang, I. (2001). Plant Cell 13:287-301.). 융합 컨스트럭트의 발현은 여러 시간 동안에 모니터링되고 이미지들을 Zeiss Axioplan 형광 현미경을 사용하여 캡처하였다.

[0098] 실시예 10: 조직화학 분석

[0099] 잎들을 0.1 M 인산 버퍼(pH 7.4)에 2.5% glutaraldehyde, 4% para-formaldehyde를 함유한 용액에서 4°C에서 4시간 고정하고, 0.1 M 인산 버퍼(pH 7.4)로 세척하고, 1% OsO₄에서 4°C에서 4시간 동안 더 고정하였다. 세척 후, 샘플들을 탈수하고 LR 백색 레진(London Resin)에 넣었다. 단면(1 μm)을 초마이크로톰(RMC MT X)을 사용하여 제조하고 여과된 1% toluidine blue로 짧게 염색하였다. 전자 현미경법을 위하여, 니켈 그리드(1-GN, 150 mesh)상에서 수집된 박편(40-50 nm 두께)을 우라닐 아세테이트와 리드 사이트레이트로 염색하고 TEM (Philips, Tecnai12)으로 조사하였다. 면역위치화를 위하여, 구리 그리드에서 수집한 절편들을 BSA-TBS 버퍼 (500 mM NaCl, 1% BSA, 0.3% Tween 20, 및 10 mM Tris-HCl [pH 7.4])로 1시간 동안 블럭하고, 항-RabG3b 항체로 상온에서 4시간 동안 배양하였다. 세척 후, 결합된 1차 항체를 20-nm 콜로이드 골드(Electron Microscopy Sciences)가 표지된 염소 항-토끼 IgG를 사용하여 검출하였다. 샘플들을 TEM에 의하여 관찰 전에 우라닐 아세테이트로 염색하였다. 단백질 위치화의 통계적 분석을 위하여, 25 세포를 사진을 찍어서 면적(μm²)당 면역골드 입자를 전에 기재된(Yao, N., Tada, Y., Park, P., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S. (2001). Plant J. 28: 13-26.)의 방법에서와 같이 계수하였다.

[0100] 실시예 11: 투과 전자 현미경

[0101] 샘플들을 진공 하에서 FAA 용액(10% formaldehyde, 5% acetic acid, 및 45% ethanol)에서 오버나잇 고정하고, 등급 에탄올 시리즈로 탈수하고 Critical Point Dryer (Tousimis Research Corp)를 사용하여 건조하였다. 샘플들을 sputter-coater (Cressington Scientific Instruments) 상에서 골드로 코팅된 스템브(stub) 상에 올린 후, 주사 현미경(JEOL JSM 5300)을 사용하여 관찰하였다.

도면의 간단한 설명

[0102] 도 1은 RabG3b 형질전환 식물체에서 잎 노화를 나타낸 그림.

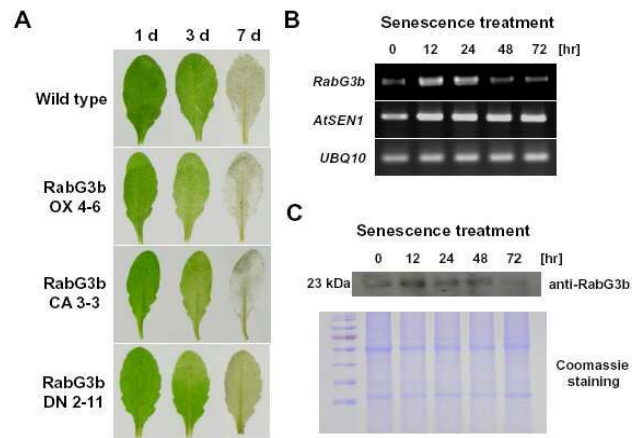
[0103] (A) 노화 분석. 잎을 분리하여서 암실에서 상온에서 물에 뜨게한 후 1일, 3일 및 7일 후에 촬영하였다. 결과들은 각 실험당 10 개 이상의 식물체를 사용하여 5회 독자적인 실험으로 재연하였다.

- [0104] (B) 노화 처리 동안에 노화 마커인 *RabG3b* 및 *AtSEN1*의 반정량적(Semiquantitative) RT-PCR 분석. *UBQ10*을 대조군으로 사용하였다. 결과들은 3회 독자실험으로 재연하였다.
- [0105] (C) 노화 처리 동안에 *RabG3b* 발현의 웨스턴 블롯 분석.
- [0106] 도 2는 병원균 처리에 대한 세포 사멸의 제한에 *RabG3b*가 관련된다는 것을 나타내는 그림.
- [0107] (A) 10^6 cfu/ml의 *Pst* DC3000 또는 *Pst* DC3000 (*avrRpt2*). OX, *RabG3bOX*; CA, *RabG3bCA*; DN, *RabG3bDN*으로 접종한 잎의 표현형.
- [0108] (B) 10^5 cfu/ml 의 *Pst* DC3000 또는 *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)으로 접종된 식물체에서 박테리아 성장의 정량 분석. 결과들은 평균 $\pm$ SD ($n = 9$)를 나타낸다. 이 실험들은 동일한 결과를 가지는 5회 수행하였다. 별표는 WT와 비교하여 현저한 차이를 나타낸다($P < 0.01$).
- [0109] (C) 10^{-6} l 드롭의 *A. brassicicola* 포자懸液(5×10^5 spores/ml)으로 접종한 잎의 표현형.
- [0110] (D) (C)에서와 같이 접종된 잎에서 새롭게 형성된 포자들의 정량화. 결과들은 3회 독자적인 실험의 평균($n = 10$)을 나타낸다. 별표는 WT와 비교하여 현저한 차이를 나타낸다($P < 0.01$).
- [0111] 도 3은 PCD가 FB1-처리된 *RabG3bOX* 및 *RabG3bCA* 식물체에서 유도된다는 것을 나타낸다.
- [0112] (A) FB1으로 24시간 및 72 시간 처리된 잎들의 표현형.
- [0113] (B) 24시간 및 72 시간 동안 mock (H_2O)-처리된 잎들 및 FB1 ($10 \mu M$)으로 처리된 잎들의 단면 이미지를 나타냄. Bar, $100 \mu m$.
- [0114] (C) 식물체에서 에팍토틱 핵 변화가 TUNEL 및 TEM에 의하여 관찰됨. 핵은 DAPI (blue)로 염색되고 DNA 절단은 TUNEL (green)에 의하여 검출되었다. 엽록체의 배경 오토형광은 적색에서 나타남. TEM 이미지들은 수축과 절편화를 관찰하기 위하여 촬영되었다. 바들은 $1 \mu m$ (TEM) 및 $20 \mu m$ (TUNEL).
- [0115] (D)프로토플라스트에서 ROS 생성의 측정. 4주령 애기장대 잎에서 분리된 프로토플라스트를 명조건에서 3시간 동안 $2 \mu M H_2DCFDA$ (green)에서 배양하였다. 바들은 $100 \mu m$ (위쪽 패널) 및 $10 \mu m$ (하단 패널). 형광은 시계(field of view)($600 \mu m^2$) 당 형광 프로토플라스트의 %로 정량화하였다. 결과들은 3회 독자적 실험에서 평균 $\pm$ SD로 표시하였다. 별표는 WT와 비교하여 현저한 차이를 나타낸다($P < 0.01$).OX, *RabG3bOX*; CA, *RabG3bCA*; DN, *RabG3bDN*.
- [0116] 도 4는 FB1-처리된 WT 및 *RabG3b* 형질전환 식물체에서 형성된 오토파괴증 및 자가용해리소증.
- [0117] (A) FB1 처리 후 72시간 동안 LTG (green)- 및 MDC (blue)-염색된 상피 및 잎살 조직들.
- [0118] (B)FB1 처리 후 24시간 후 상피 조직에서 LTG- 및 MDC-염색된 구조들의 정량 분석. 염색된 조직들은 촬영되고 형광 점들을 $0.6 mm^2$ 면적 당 계수하였다. 결과들은 3회 독자적 실험에서 평균 $\pm$ SD로 표시하였다.
- [0119] (C)상피 조직에서 오토파괴증/자가용해리소증 구조들에 대한 Concanamycin A (ConA)의 효과. concanamycin A ($5 \mu M$)과 FB1으로 24시간 동안 동시처리한 잎들을 LTG (green) 및 MDC (blue)으로 염색하였다.
- [0120] FB1 처리를 위하여, $10 \mu M$ FB1이 잎에 침투되었다. 염색된 조직의 이미지들은 FB1-침투된 부위 인접한 비처리되고 건강한 부위로부터 얻었다. Bar, $50 \mu m$.
- [0121] 도 5는 *RabG3b*가 오토파괴증에서 ATG8과 코로칼라이즈되고 자식작용 과정에서 기능한다는 것을 나타낸 것.
- [0122] (A) *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)-처리된 잎들에서 자식작용 구조의 TEM 이미지. 화살표는 액포와 오토파괴증의 융합을 나타낸다(패널 2와 3). 이미지들은 3회 독자적인 실험으로부터 얻은 대표작이다. Bars, $0.5 \mu m$ (탑과 중간 패널) 및 $2 \mu m$ (바닥 패널).
- [0123] (B) 초기, 중간 및 후기 단계에 의하여 나타낸 것과 같이 FB1 처리 72 시간 동안 WT 및 *RabG3bCA* 식물체에서 자식작용 변화. Bar, $0.5 \mu m$.
- [0124] (C)오토파괴증에서 *RabG3b* 및 ATG8 단백질들의 코로칼라이제이션. WT, CA, 및 DN 형태의 *RabG3b* 중 하나가 ATG8 in *N. Benthamiana*에서 오토파괴증 마커 단백질인 ATG8과 공동발현되었다. Bar, $20 \mu m$.

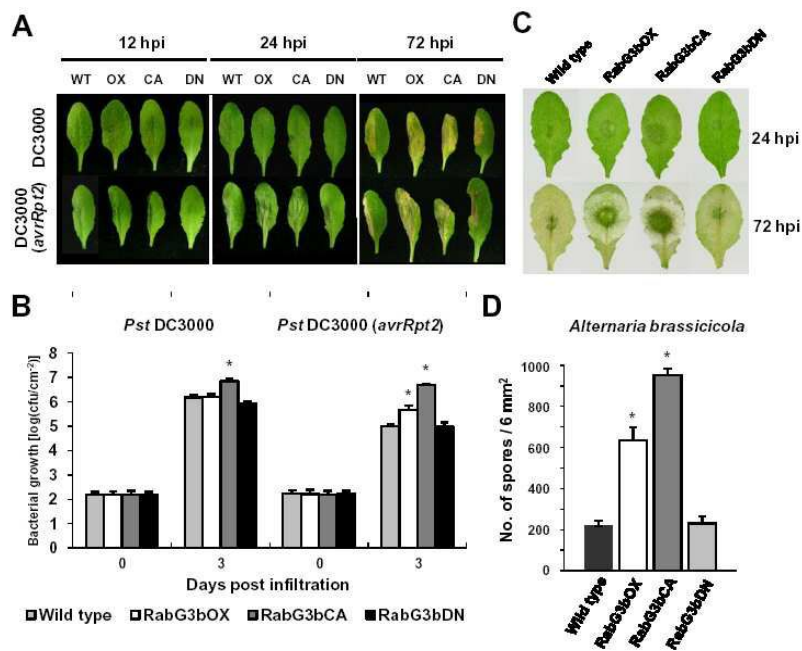
- [0125] 도 6은 *Arabidopsis* RabG3b (AtRabG3b)과 인간 Rab7 (HsRab7) 및 효모 Ypt7 (ScYpt7)의 아미노산 서열의 배열.
- [0126] 서열들을 ClustalW를 사용하여 배열하였다. 모두 세 생물체에서 동일한 잔기들을 박스로 표시하였다. 밑줄은 Rab GTPases에서 보존된 뉴클레오타이드 결합 및 가수분해에 관여된 서열 모티프를 나타낸다. 청색과 적색 잔기들은 DN (T22N) 및 CA (Q67L) 형태들의 RabG3b를 생성하기 위하여 돌연변이되었다.
- [0127] 도 7은 RabG3bOX, RabG3bCA, 및 RabG3bDN 형질전환 애기장대 식물체의 구축.
- [0128] 두 라인들의 RabG3bOX (2-8 및 4-6), RabG3bCA (3-3 및 4-2), 및 RabG3bDN (1-10 및 2-11) 식물체들이 기능 연구용으로 선택되었다.
- [0129] (A) WT 및 RabG3b 형질전환 식물체에서 *RabG3b* 발현의 RT-PCR분석. *Actin*이 대조군으로 사용됨.
- [0130] (B) WT 및 RabG3b 형질전환 식물체에서 *RabG3b*의 웨스턴 블롯 분석. 각 라인은 10 μ g의 전체 단백질들로 로딩하였다.
- [0131] 도 8은 FB1-과 병원균 처리된 식물체에서 세포 사멸 및 ROS 생성.
- [0132] (A) 트립판 블루로 염색된 잎에서 세포사멸.
- [0133] (B) DAB로 염색된 잎에서 H₂O₂ 생성.
- [0134] 염색은 mock (10 mM MgSO₄), 10 mM FB1, 그리고 10⁶ cfu/ml의 *Pst* DC3000 또는 *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)로 3일간 처리한 후 수행되었다. Bar, 1 mm.
- [0135] 도 9는 *A. brassicicola*로 접종된 RabG3b 형질전환 식물체에서 질병 증상
- [0136] (A) 손상들(Lesions)을 락토펜올 블루로 염색하였다. 곰팡이 균사의 형성이 현미경 하에서 관찰되었다. Bar, 200 μ m.
- [0137] (B) SEM에 의하여 관찰된 *A. brassicicola* 성장. Bars, 100 μ m (왼쪽), 10 μ m (중앙), 및 5 μ m (오른쪽).
- [0138] 잎들을 10- μ l 드롭의 포자懸液(5x10⁵ spores/ml)의 *A. brassicicola*로 처리하였다
- [0139] 도 10은 FB1-처리된 식물체에서 오토파고솜 및 자가용해리소솜 구조.
- [0140] 상피 조직들의 처리 및 비처리 부위들을 10 μ M FB1로 24시간 처리 후 LTG (green) and MDC (blue)로 염색하였다. Bar, 50 μ m.
- [0141] 도 11은 *Pst* DC3000-처리된 식물체에서 오토파고솜 및 자가용해리소솜 구조.
- [0142] 상피 및 잎살 조직들을 10⁵ cfu/ml의 *Pst* DC3000로 72 시간 접종 후 LTG (green) and MDC (blue)로 염색하였다. Bar, 50 μ m.
- [0143] 도 12는 *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)-처리된 식물체에서 오토파고솜 및 자가용해리소솜 구조.
- [0144] 상피 및 잎살 조직들을 10⁵ cfu/ml의 *Pst* DC3000(*avrRpt2*)로 72 시간 접종 후 LTG (green) and MDC (blue)로 염색하였다. Bar, 50 μ m.
- [0145] 도 13은 *Arabidopsis* 조직에서 RabG3b의 발현을 나타낸 그림이다.
- [0146] (A) 조직에서 RabG3b 발현의 반정량적인(Semiquantitative) RT-PCR 분석이다. *UBQ10* 및 rRNA는 대조군으로 사용.
- [0147] (B) 식물 추출물에서 RabG3b에 대한 항-RabG3b 항체의 특이적인 결합에 대한 실험. 웨스턴 블롯을 위해서, 25 μ g의 4주령 식물 잎에서 유래한 단백질을 사용하였다.
- [0148] (C) 조직에서 RabG3b 발현의 웨스턴 블롯 분석. 각 레인은 표시된 조직들로부터 유래한 30 μ g의 총 단백질로 로딩하였다.

도면

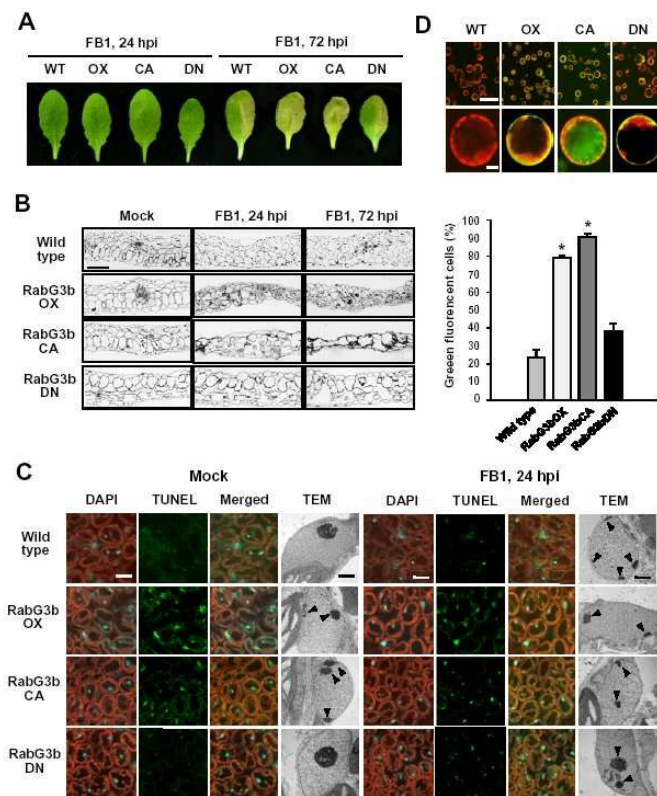
도면1



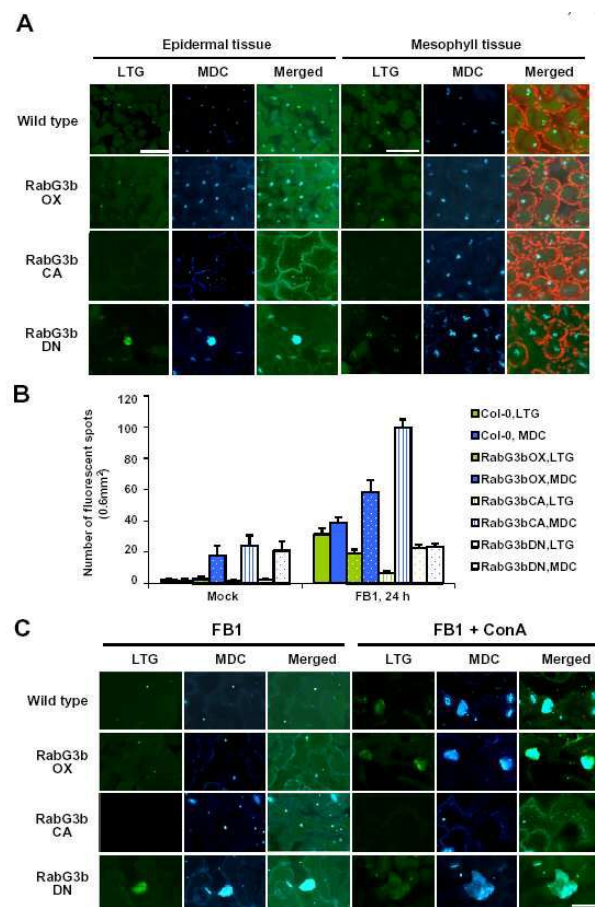
도면2



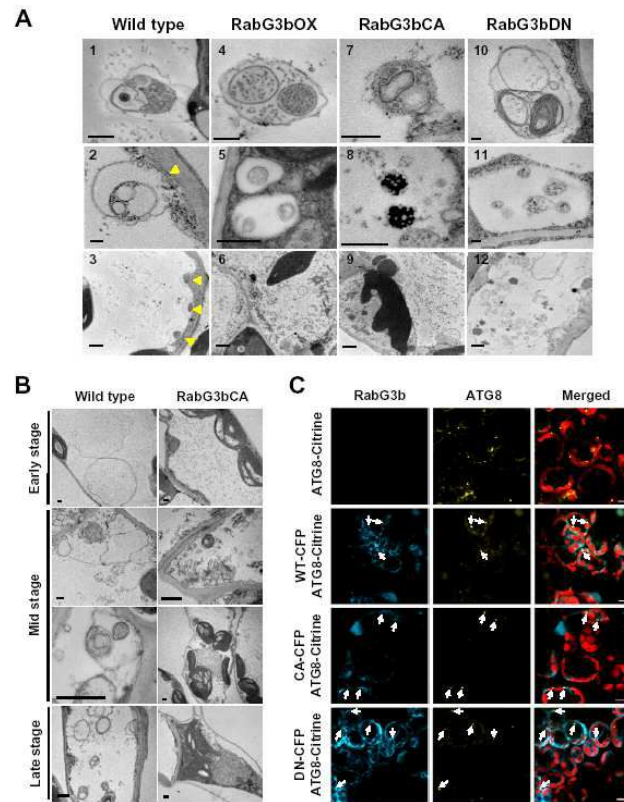
도면3



도면4



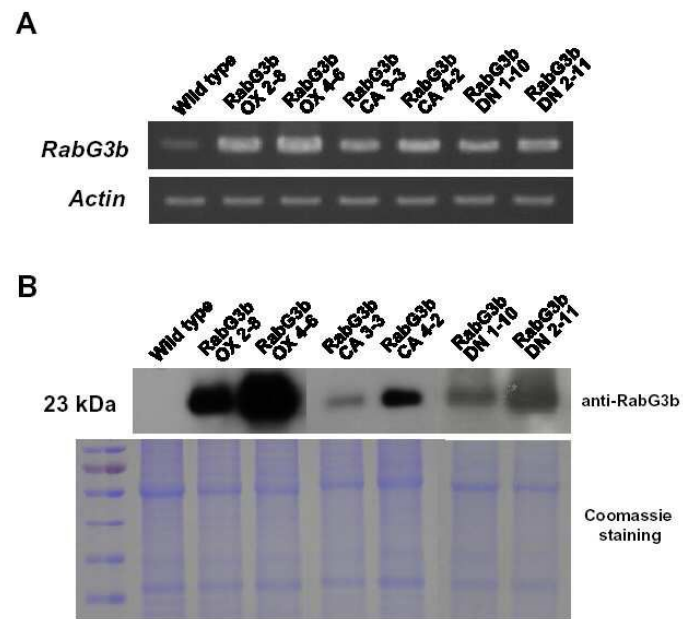
도면5



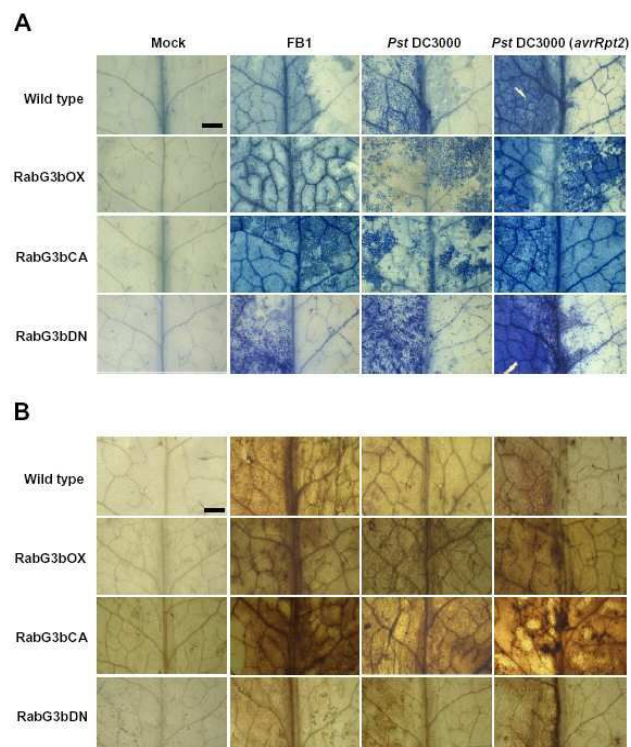
도면6

AtRabG3b	MSIFRRRTILKVIILGDSGVGKTSIMNQYVNNHESCOYKATIGADHYTKELQIT--LRLVIL	59
HsRab7	MTSEKKVILKVIILGDSGVGKTSIMNQYVNNHESCOYKATIGADHITKEVMVL--LRLVIM	59
ScYpt7	MSSEKKNIIKVIILGDSGVGKTSIMHRYVNDHSCCOYKATIGADHITKEVTVLSKVAIM	60
AtRabG3b	CIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCVLVYDVNHLKSPESLDNHNHFLITRSPRDEMFF	119
HsRab7	CIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCVLVYDVITAPNIFKTLDSARDEFLIQSPRDEENFF	119
ScYpt7	CIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCVLVYDVITNASSDENIKENRDEFLVHNVNSSETFF	120
AtRabG3b	EVILGNKIVIDGGNSRVSEKREWCSEKGNIVYFETSAREDMVODSFLCITKLALAN	179
HsRab7	EVVLGNKICILE---NRQVATRRQAWCYSKNNIPYFETSAREAINVEQAFQTIARNALKQ	176
ScYpt7	EVILGNKICAE--SKKINSESSQELAKSLGIPLFLITSAKNAINVDTAREETARSALQQ	179
AtRabG3b	ERDQDIYFQPDGTSVPEQRG-----GAC	203
HsRab7	ETEVELYNEFPPIKLDKNDRAKASAES--SC	207
ScYpt7	NQADTEAFEDDYNDAINIRLDGENNSCS--	208

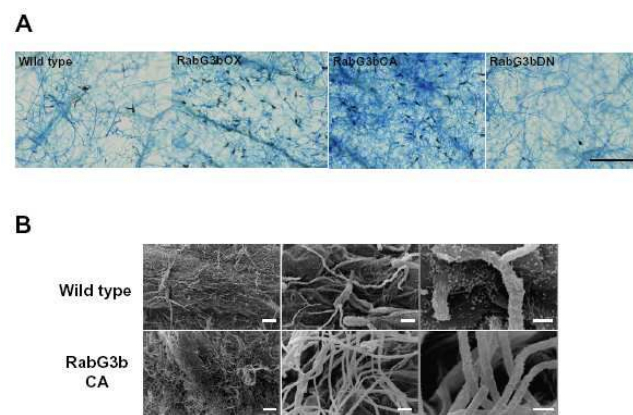
도면7



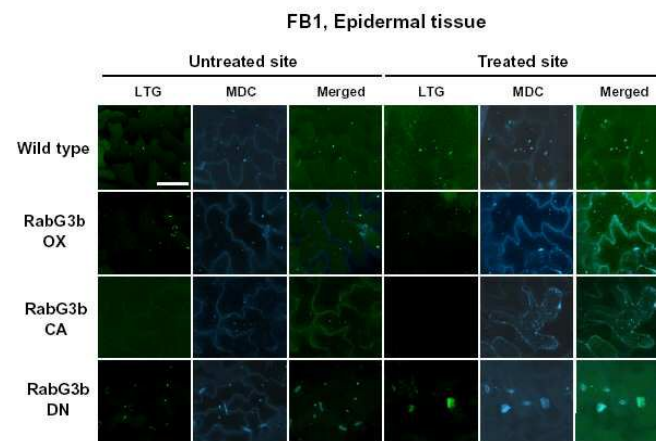
도면8



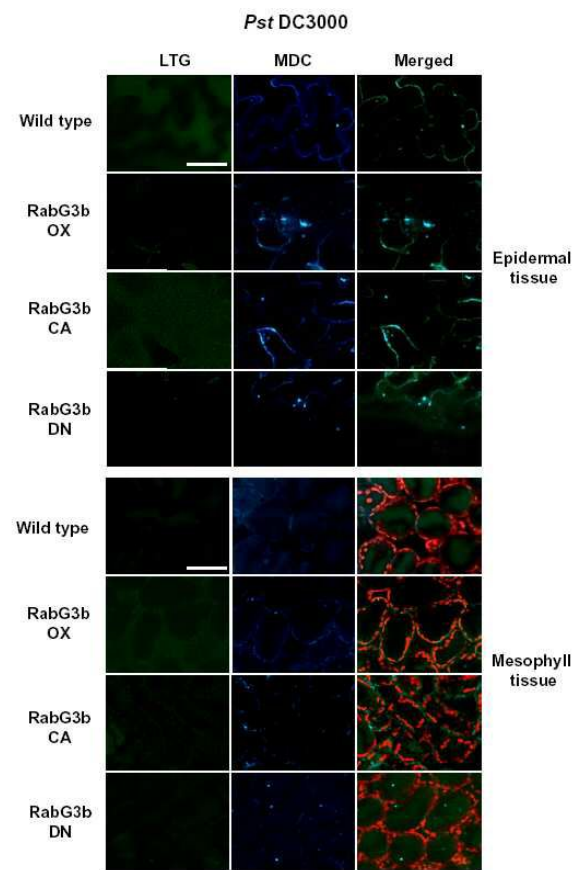
도면9



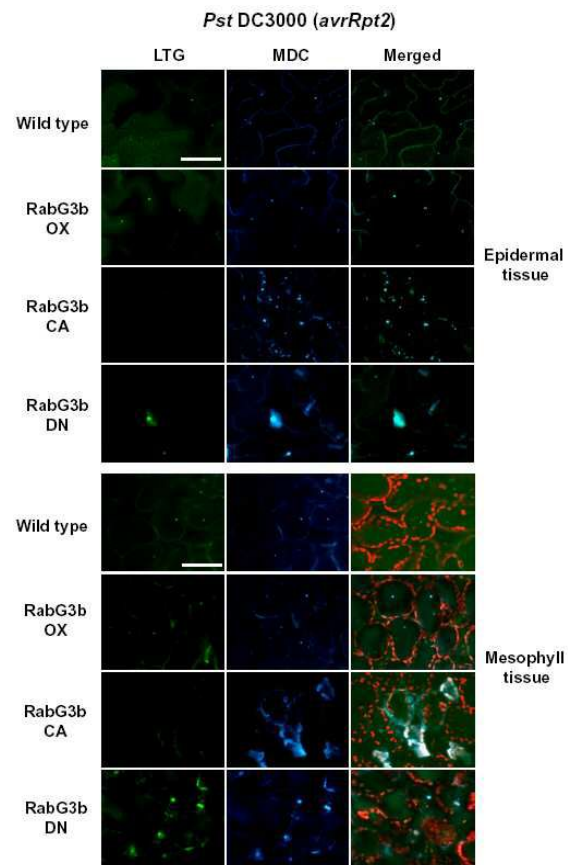
도면10



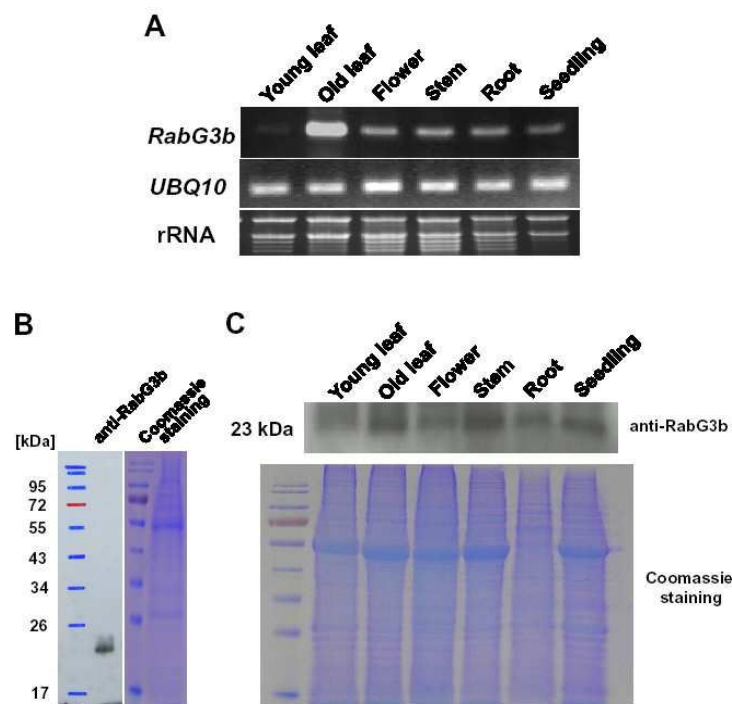
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
 <120> Protein and its gene having plant resistance to pathogens

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RabG3b

<400> 1
 Met Ser Thr Arg Arg Thr Leu Leu Lys Val Ile Ile Leu Gly Asp
 1 5 10 15

Ser Gly Val Gly Lys Thr Ser Leu Met Asn Gln Tyr Val Asn Asn Lys
 20 25 30

Phe Ser Gln Gln Tyr Lys Ala Thr Ile Gly Ala Asp Phe Val Thr Lys
 35 40 45

Glu Leu Gln Ile Asp Asp Arg Leu Val Thr Leu Gln Ile Trp Asp Thr
 50 55 60

Ala Gly Gln Glu Arg Phe Gln Ser Leu Gly Val Ala Phe Tyr Arg Gly
 65 70 75 80

Ala Asp Cys Cys Val Leu Val Tyr Asp Val Asn His Leu Lys Ser Phe
 85 90 95

Glu Ser Leu Asp Asn Trp His Asn Glu Phe Leu Thr Arg Ala Ser Pro
 100 105 110

Arg Asp Pro Met Ala Phe Pro Phe Ile Leu Leu Gly Asn Lys Val Asp
 115 120 125

Ile Asp Gly Gly Asn Ser Arg Val Val Ser Glu Lys Lys Ala Arg Glu
130 135 140

Trp Cys Ala Glu Lys Gly Asn Ile Val Tyr Phe Glu Thr Ser Ala Lys
145 150 155 160

Glu Asp Tyr Asn Val Asp Asp Ser Phe Leu Cys Ile Thr Lys Leu Ala
165 170 175

Leu Ala Asn Glu Arg Asp Gln Asp Ile Tyr Phe Gln Pro Asp Thr Gly
180 185 190

Ser Val Pro Glu Gln Arg Gly Gly Cys Ala Cys
195 200

<210> 2
<211> 612
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RabG3b

<400> 2
atgtcgacgc gaagacgaac ttactcaaa gttataattc ttggagacag cggggttggc 60

aaaacatcgt tgatgaatca atatgtgaat aacaagtta gtcaacagta caaagctacg 120

atcggagctg atttgtcac taaggagctt caaattgatg acaggcttgt cacattgcaa 180

atatgggaca ctgctgggca agagagggtt caaagtcttg gtgttgcttt ctatagaggt 240

gcagattgtt gtgttcttgt ctatgatgtg aatcacttga agtcatttga atctctcgac 300

aattggcaca acgagtttct tacacgggct agtccacgtg acccaatggc attccctttt 360

atacttcttg gtaataaggt tgatattgat ggaggaaata gccgagtggg atctgagaag 420

aaggctagag aatggtgtgc tgaaaaggga aacatagtct atttcgagac atcggctaaa 480

gaagattaca atgtcgatga ctctttcttg tgcattcaca aacttgcct tgcaaatgaa 540

cgcgaccaag atatataatt ccagccagat actggttcgg tgcctgagca aagaggaggt 600

tgtgcttgct ga 612

<210> 3
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
caaatatggg acactgctgg gctagagagg ttcaaagtc ttg 43

<210> 4
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
caagactttg aaacctctct agcccagcag tgcctccatat ttg 43

<210> 5
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5

gagacagcgg ggttggcaaa aactcgttga tgaatcaata tgtg 44

<210> 6
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 6
 cacatattga ttcatcaacg agtttttgcc aaccccgctg tctc 44

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 7
 ccccccgggc aatgtcgacg cgaagacgaa 30

<210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 8
 ccgctcgagt cagcaagcac aacctcct 28