



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년03월06일
(11) 등록번호 10-1369660
(24) 등록일자 2014년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0096181
(22) 출원일자 2012년08월31일
심사청구일자 2012년08월31일
(56) 선행기술조사문헌
Plant Molecular Biology 55: 61-81, 2004
Journal of Ecology, Volume 99, Issue 1, pages
46-56, January 2011
MPMI Vol. 15, No. 10, 2002, pp. 983-989

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울시 성북구 안암로 145 (안암동)
(72) 발명자
황병국
서울 서초구 사임당로17길 116, 103동 1405호 (서
초동, 서초삼성래미안)
김낙현
서울 서대문구 독립문로 10, 105동 603호 (영
원동, 삼호아파트)
(74) 대리인
김선애

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 병 저항성 관련 유전자 CaPI1, 및 이를 이용한 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 프로테아제 저해 활성을 갖는 신규 식물병 저항성 관련 유전자인 *CaPI1*(*Capsicum annuum* Protease Inhibitor 1) 유전자 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 상기 유전자는 프로테아제 활성을 조절할 수 있고, 병원균의 공격에 대한 식물체의 방어 반응 및 병저항성 식물체의 효율적이고 효과적인 분자적 육종을 위한 유전체로서 유용하게 사용될 수 있어, 저항성 식물 품종 개발 및 형질전환 식물체 제작에 기여할 수 있다.

대표도 - 도1

```

ctagagaacccactgcttactggcttatcgaaattaatacgactcactat 50
aggggaattcactgttggcctactggacagaaatccacaagaattacaattacaatc 120
ATGGAGAGTGTTAAAGTTGTGTAGCATTTTTATCATCAGCATGATGGTGGCGATG 170
M E S V N K L C V A F F I I S M M V A M
GCCGCGGCGCAGAGTGCTACGAACGTGAGGTCAACATACCATCTGTACAACCCGAGAAC 230
A A A Q S A T N V R S T Y H L Y N P Q N
ATCAACTGGGATTTGAGAACTGCCAGCGCTTACTGCGCTACTTGGGATGCTGACAAGCG 290
I N W D L R T A S A Y C A T W D A D K P
CTCGAGTGGCGCCAAAGGTATGGCTGGACTGCTTTTGTGTCCTGCTGGACCTACTGGC 350
L E W R Q R Y G W T A F C G P A G P T G
CAAGCTGCTTGGGTAGATGCTTGAGGGTGACAAACACAGGAACGGGAACACAAAGCAAC 410
Q A A C G R C L R V T N T G T G T Q A T
GTGAGAATAGTAGATCAATGCAGCAATGGAGGGCTTGATTGGATGTGAACGTGTTAAC 470
V R I V D Q C S N G G L D L D V N V F N
CAATTGGACACTGATCGACGGGGCTACCAGCAGGGCCACCTTATAGTCAACTATGAATT 530
Q L D T D R R G Y Q Q G H L I V N Y E F
GTCAACTGCTAAtgactaagctggttagcttagctctgcttaacaaagtgcacatattatgt 590
V N C *
catcaataataaacacgatcgagattgatttcatactattatcgagattgatgtttaga 650
ataaaagggactgagcttttaattaatagtataaacaattatattatctggaagctctat 710
atgtaccttggaactcttttaagattaataaaagaatgtcacttagtactaaaaaaaaa 770
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 780

```

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008027
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	고추에서 병저항성관련유전자의 분리와 기능분석
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖는 고추 유래의 프로테아제 억제 1 유전자 (*Capsicum annuum* Protease Inhibitor 1, *CaPI1*).

청구항 2

제1항 기재의 유전자에 의해 코딩되는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 고추 유래의 프로테아제 억제 1 단백질 (*Capsicum annuum* Protease Inhibitor 1, *CaPI1*).

청구항 3

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항 기재의 유전자 또는 제3항 기재의 재조합 벡터가 도입된 형질전환 식물체.

청구항 5

제 1항 기재의 *CaPI1* 유전자를 pET22b 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 pET22b:*CaPI1*.

청구항 6

제1항 기재 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계; 및

상기 발현 벡터를 식물세포에 도입하는 단계를 포함하는 프로테아제 활성이 저해된 형질전환 식물체를 제조하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 병 저항성 관련 유전자 *CaPI1*(*Capsicum annuum* Protease Inhibitor 1), 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang) 식물이 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되는 프로테아제 억제 활성을 갖는 신규 저항성 관련 유전자인 *CaPI1* 유전자, 및 이를 이용한 형질전환 식물체와 프로테아제 활성이 억제된 형질전환 식물체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 담배, 토마토와 함께 대표적인 가지과 식물인 고추 (*Capsicum annuum* L.)는 우리 식생활에 가장 많이 사용되는 채소류의 하나로 주요한 경제작물이다. 그러나 고추 식물은 바이러스병, 세균병, 진균병 등에 의해 큰 피해를 입고 있다. 병에 의한 피해는 수량감소, 품질 저하, 농약 살포에 따른 비용 및 환경부담 등 다양하다. 설상가상으로 환경은 온난화 현상으로 홍수, 폭염, 가뭄 등의 자연재해가 더욱 빈번하게 발생하고 있고 병해충의 발생이 증가하여 인간 및 자연환경에 유해한 화학농약에 대한 의존도가 더욱 증가하고 있는 상황이다.

[0003] 농업에 있어서 생산비용을 줄이고 친환경 녹색성장을 이룩하기 위해서는 농약과 같은 화학적 방제가 필요하지 않은 병저항성 품종의 개량 및 육종 방법을 찾는 것이 절실하다. 식물의 병 저항성 반응 또는 환경적 스트레스에 대한 내성을 가지는 식물의 방어관련 기작 연구는 지금까지 알려져 있지 않은 생체 내 기작을 규명하는 과학 기술적 가치를 지닌다. 또한 식물 저항성 관련 유전자의 정보는 작물의 분자적 유전육종의 직접적 재료로서 제공될 수 있을 뿐 아니라 전통적 유전육종에도 사용될 수 있는 장점을 지니고 있다.

[0004] 고추 세균성 점무늬 병원균과 고추와의 상호작용에서 방어반응에 관여하는 유전자를 분자적으로 클로닝하고 기

능 분석하는 것은 고추의 병방어 반응 경로의 이해를 증진시키고, 저항성관련 유전자를 고추식물에서 발현시킨 병저항성 형질전환식물의 개발을 위한 유전자원의 토대가 된다. 식물체가 병원균에 감염되면 여러 가지 세포내 대사 시스템을 작동시켜 방어기작을 활성화하는데, 이러한 방어기작은 병원체에 대한 기주세포의 인식을 시발점으로 국부적 세포 죽음과 같은 과민성 반응, 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 여러 종류의 2차 대사산물과 항균성 물질을 생성하고, 병방어관련 단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다. 그러나 현재 과민성 반응을 조절하는 인자와 그것의 메커니즘에 대한 연구가 매우 미흡한 실정이다.

[0005] 한편, 프로테아제 저해제 (Protease Inhibitor; PI)는 단백질의 펩타이드 결합을 가수분해하는 효소인 프로테아제(protease)의 활성을 저해하는 물질로서, 동식물에 널리 분포하고 그 종류와 특성이 다양하다고 보고되어 있다 (Mazal Solomon et al., The Plant Cell, Vol. 11, 431-443, March 1999; Clarence A. Ryan, Annu.Rev.Phytopathol. 1990. 28 :425-49). 또한, 시스테인 프로테아제 저해제(cysteine protease inhibitor)는 세포 내부 또는 외부로부터 시스테인 프로테아제에 의한 비우호적인 단백질 분해 활성으로부터 세포를 보호하며, 침략자에 대한 생물학적 방어 체계로서 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다.

[0006] 본 발명의 배경이 되는 기술로서 대한민국 공개특허 10-2011-0051578 (2011.05.18)에 비생물학적 스트레스에 대한 식물 저항성을 증가시키는 BrCPI 유전자 및 이의 용도에 대해 기재되어 있으나, 세포사멸과 관련된 고추 유래 프로테아제 저해제(protease inhibitor) 유전자에 대해서는 개시되어 있지 않다. 또한, K. K. Ussuf 등은 PI 유전자를 이용한 곤충, 곰팡이, 바이러스 병원균에 저항성을 갖는 형질전환 작물의 제작에 대해 연구하였으나, 고추 유래 PI(protease inhibitor)에 대해서는 개시되어 있지 않다(K. K. Ussuf et al., CURRENT SCIENCE, VOL. 80, NO. 7, 10 APRIL 2001). 한편, NCBI accession no. AAR97870 (PLN 21-JAN-2004)에는 고추 유래 프로티나제 제해제에 대한 기재가 있으나, 부분서열만이 기재되어 있고 그 부분만으로는 프로테아제 저해제 활성이 있다고 할 수 없어 실질적으로 병저항성 작물 육종에 이용되기 어렵고 세포사멸 등에 대한 기재도 없다. 또한, NCBI accession no. JX030397 (PLN 10-JUL-2012)에는 고추 역병균을 접종한 경우 특이하게 발현되는 유전자 PR4에 대개 기재되어 있으나, 프로테아제 제해 활성에 대한 보고는 없다.

[0007] 따라서, 본 발명에서 제시된 프로테아제 저해 활성을 갖는 신규 저항성 관련 유전자인 *CaPII*는 고추 식물에서 과발현시켰을 때 주요 방어기작을 활성화시키며 세포사멸을 일으키는 유전자로서 본 유전자를 동정하고 클로닝하여 분석하는 것이 병저항성 작물 품종을 육종하는데 실질적으로 기여할 것으로 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2011-0051578 (2011.05.18)

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) K. K. Ussuf et al., CURRENT SCIENCE, VOL. 80, NO. 7, 10 APRIL 2001

(비특허문헌 0002) Mazal Solomon et al., The Plant Cell, Vol. 11, 431-443, March 1999,

(비특허문헌 0003) Clarence A. Ryan, Annu.Rev.Phytopathol. 1990. 28 :425-49

(비특허문헌 0004) NCBI accession no. JX030397 (PLN 10-JUL-2012)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기 종래 기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 감염된 식물에서의 방어반응 동안에 일어나는 저항성 및 세포 사멸에 관련하는 유전자 중 하나인 *CaPII*를 분리하고 해독함으로써 얻어진 염기서열 및 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.

- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자를 이용하여 프로테아제 활성이 저해된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적과 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 (*CaPII*)를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 본 발명에 의한 유전자에 의해 코딩되는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질 (*CaPII*)을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터가 도입된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 본 발명의 *CaPII* 유전자를 pET22b 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합 벡터 pET22b:*CaPII*를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 본 발명의 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계; 및 상기 발현 벡터를 식물세포에 도입하는 단계를 포함하는 프로테아제 활성이 저해된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0020] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0021] 본 발명은 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang) 식물이 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되는 신규 저항성 관련 유전자인 *CaPII* (*Capsicum annuum* *Protease Inhibitor 1*)을 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 병원균 처리를 통하여 *CaPII*의 발현여부를 조사하고, 고추식물과 형질전환 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaPII* 유전자의 식물병 저항성 유도 기능을 확인하여 달성하였다.
- [0022] 따라서 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균의 비병원성 균주 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하여 병저항성에 관련될 것으로 추정되는 클론을 선별하여, 이들 중 프로테아제 저해 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독함으로써, *CaPII*으로 명명된 고추 녹광품종의 *CaPII* 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그에 따른 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).
- [0023] 본 발명의 *CaPII* 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 아민기 말단에는 시그널 펩타이드와 카르복실기 말단에 barwin 도메인이 있었다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 유전자(*CaPII*)를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 상기 재조합 벡터는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 pBIN35S:*CaPII*, pBIN35S:*CaPII*:GFP 또는 pTRV2:*CaPII*이다. 바람직하게는 상기 재조합벡터는 상기 유전자(*CaPII*)를 바이러스-유도 유전자 사일런싱(virus-induced gene silencing, VIGS)을 위한 벡터인 TRV2(Tobacco Rattle Virus 2) 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 TRV2:*CaPII*이다(도 9 참조). 또한 본 발명은 본 발명의 단백질 (*CaPII*)의 *E.coli* 단백질 과발현을 위한 벡터인 pET22b 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합 벡터 pET22b:*CaPII*를 제공한다.
- [0025] 나아가, 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터를 이용하여 제조한 형질전환된 식물체를 제공한다. 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종

DNA를 적당한 식물세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법 (Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법 (Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미 주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소 포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.

[0026] 또한, 본 발명은 생물적, 화학적 또는 환경스트레스 처리를 한 식물체로부터 mRNA를 분리하여 *CaPII* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병의 병원성, 비병원성 세균 그리고 고추 역병의 난균 등의 병원균을 예로 들 수 있다. 상기 화학적 처리는 식물 호르몬인 에틸렌 또는 살리실산(salicylic acid)을 예로 들 수 있다. 상기 환경스트레스 처리는 건조 또는 염을 예로 들 수 있다. 상기 *CaPII* 유전자 발현 여부 확인은 노던 블롯, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 바람직하게 본 발명은 식물체의 병저항성 탐색 방법에 있어서, 생물적, 화학적, 또는 환경스트레스를 처리한 식물 잎에서 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나이론막(Hybond N+)으로 전이시키고, ³²P-dCTP로 처리한 본 발명의 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공한다. 본 발명에 의한 *CaPII* 유전자가 식물 병원균 접종에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 3 참조). 따라서 본 발명에 의한 *CaPII* 유전자는 식물체의 병저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기의 *CaPII* 유전자 발현을 억제하는 재조합 벡터를 이용하여 고추식물에서 특이적으로 *CaPII* 유전자가 억제된 식물체를 제작하고 병 저항성이 감소하는 것을 확인하고, *CaPII* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성 증대를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 *CaPII* 유전자 발현을 유도하는 재조합 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체에 병 저항성을 부여하는 방법도 제공한다.

[0028] 보다 구체적으로 본 발명은 바이러스 유도 유전자 사일런싱 기술(virus-induced gene silencing (VIGS))에 이용되는 TRV(Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaPII* 유전자를 TRV2 벡터(참고문헌: Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2:109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2:*CaPII*를 제작하였다. 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 *CaPII*의 발현이 억제된 VIGS 식물체를 제조하여 저항성이 감소하는 것을 확인하고 형질전환 식물체를 제공할 수 있었다 (도 9 및 도 10 참조).

[0029] 나아가 본 발명에 의한 *CaPII* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S:*CaPII*)와 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여, 애기장대 식물에서의 형질전환 발현(transgenic expression)을 통한 *CaPII* 유전자의 식물체 병저항성 증가 기능을 확인하였다(도 11 ~ 도 13 참조).

[0030] 본 발명은 본 발명의 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계; 및 상기 발현 벡터를 식물세포에 도입하는 단계를 포함하는 프로테아제 활성이 저해된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0031] 또한 본 발명은 본 발명의 유전자의 발현을 억제하는 발현 벡터를 제조하는 단계; 및 상기 발현 벡터를 식물세포에 도입하는 단계를 포함하는 프로테아제 활성이 증가한 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0032] 상기 발현 벡터의 제조 및 상기 발현 벡터의 식물세포로의 도입은 상술한 바와 같이, 당업자에게 공지된 형질전환 방법을 이용할 수 있고, 본 발명의 실시예에서는 pBIN35S 벡터 (또는 pTRV2 벡터)에 *CaPII* 유전자를 삽입하여 만든 pBIN35S:*CaPII* (또는 pTRV2:*CaPII*)를 아그로박테리움에 형질전환시킨 후, 플로랄 덤핑 방법으로 통하여 식물체에 도입하였다. 상기 형질전환 식물체 방법은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 역전사 중합효소연쇄 반응 등 공지의 방법에 의해 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명에 의한 *CaPII* 유전자는 프로테아제를 저해하는 활성이 있으므로, 본 발명의 유전자를 이용하여 식물체의 프로테아제 활성을 조절할 수 있어, 필요한 모델식물을 제작할 수 있다.

[0034] 상술한 바와 같이 본 발명에서 *CaPII*가 식물체의 병저항성 조절에 중추적 역할을 한다는 것을 확인하고 *CaPII*의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 병생성 관련 단백질 (PR protein)의 유전자 정보를 축적할 수 있게 되어 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병저항성이 증진되는 생명공학작 식물체를 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0035] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 고추식물의 세균병인 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주와 비병원성균주에 감염될 때 특이적으로 유도되는 신규 유전자인 *CaPII*의 염기서열 및 아미노산 서열을 제공할 수 있고, 병원균 접종에 의한 차별적인 발현은 확인함으로써 저항성 식물 품종 개발 및 프로테아제 활성이 조절된 형질전환 식물체 제작에 기여하는 효과를 기대할 수 있게 된다.

[0036] 따라서 본 발명은 저항성 품종 개발에 있어 신규 유전자원을 제공하는 효과가 있어 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 *CaPII* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,

도 2는 본 발명에 의한 *CaPII*의 프로테아제 저해 효과를 나타낸 도면이고,

도 3은 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 및 비병원성 균주를 접종하였을 때 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 *CaPII* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

도 4는 *N. benthamiana* 세포에서 *CaPII*의 세포내 위치를 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 5는 재조합 벡터 pBIN35S:*CaPII*와 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 균주를 이용하여 고추 식물에서 *CaPII* 유전자를 과발현하였을 때 과민성세포사멸을 포함하는 저항성 반응이 유도되는 결과를 나타낸 도면이고,

도 6은 재조합벡터 pBIN35S:*CaPII*와 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 균주를 이용하여 고추 식물에서 *CaPII* 유전자를 과발현하였을 때 세포사멸을 트리판 블루(trypan blue) 염색과 전도율로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 7은 재조합벡터 pBIN35S:*CaPII*와 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 균주를 이용하여 고추 식물에서 *CaPII* 유전자를 과발현하였을 때 활성산소 발생을 확인한 결과를 나타내는 도면이고,

도 8은 재조합벡터 pBIN35S:*CaPII*와 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 균주를 이용하여 고추 식물에서 *CaPII* 유전자를 과발현하였을 때 저항성 관련 유전자 발현을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 9는 VIGS (virus-induced gene silencing)의 방법을 사용하여 *CaPII* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)의 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때 감염 고추 잎 조직에서의 세균 생장을 나타낸 그래프이고,

도 10은 *CaPII* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, *CaPII*의 효과적인 발현 억제와 저항성 관련 유전자의 발현 차이를 나타낸 결과를 나타낸 그래프이고,

도 11은 형질전환 애기장대 식물에서 *CaPII* 유전자가 과다발현되는 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 12는 *CaPII* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 균주 접종시 식물체 내에서 병원균 생장을 검

정한 결과를 나타낸 그래프이고,

도 13은 *CaPI1* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 노균병균 하이알로페로노스포라 아라비돕시 디스 노코2 (*Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2) 균주 접종시 식물체 내에서 병원균 생장을 검정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1] *CaPI1* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정

[0040] 고추 세균성 점무늬병에 대한 병저항성 관련 단백질 중 하나인 *CaPI1* (*Capsicum annuum* Protease Inhibitor 1) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0041] 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성 세포사멸반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.

[0042] 다음에, 이 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로부터 개개의 cDNA 클론을 제조하여 나이론막(Hybond N+)에 일정하게 흡착시킨 후, 각각 고추 세균성 점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접촉하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하였다.

[0043] 하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주 접종된 식물체의 mRNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 유전자를 병저항성에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 수득하였다.

[0044] 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 *CaPI1* 단백질 코딩 유전자를 확인하고 *CaPI1*(*Capsicum annuum* Protease Inhibitor 1) 유전자로 명명하였다. *CaPI1* 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 아민기 말단에는 시그널 펩타이드와 카복실기 말단에 barwin 도메인을 가지며 고추의 PR4 단백질 유전자 (accession no. AAF63520)과 94% 그리고 프로테아제 저해 단백질 유전자 (accession no. AAR97870)과 98%의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, nucleotide blast program). 확인된 *CaPI1*의 유전자 염기서열(서열번호 1)과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 도 1에 나타내었다.

[실시예 2] *CaPI1* 단백질의 프로테아제 저해 활성 탐색 방법

[0046] 상기 실시예 1에서 수득한 *CaPI1* 유전자의 프로테아제 저해 활성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[단계 1]

[0048] 프로테아제 저해 활성이 있는지 알아보기 위하여 *CaPI1* 단백질을 얻기 위하여 실시예 1에서 수득한 *CaPI1* 유전자를 *E. coli*의 6x His 퓨전 단백질 발현 벡터인 pET22b 벡터에 삽입하였다.

[0049] 보다 상세하게는, pET22b vector는 제한효소 *Bam*HI/*Nco*I로 자른 후 에탄올 침전 (ethanol precipitation)을 수행하고 살균수에 녹여 다시 DNA를 회수하였다. *CaPI1*의 말단에 6xHis 퓨전 단백질이 생성될 수 있도록 염기서열 전체에서 종결 코돈(TAA)만 빼고 양쪽에 제한효소 *Bam*HI (GGATCC) / *Nco*I (CCATGG) 서열을 붙여 증합효소연쇄반응 (PCR)를 통해 증폭시키고 Invitrogen에서 제공하는 pCR2.1-TOPO vector에 삽입시켰다. 이 TOPO vector를 제한효소 *Bam*HI/*Nco*I로 자른 후 나온 절편을 ligase를 이용하여 pET22b vector에 삽입하여 pET22b:*CaPI1* 재조합 벡터를 생성하였다.

[0050] 이렇게 제작된 재조합 벡터 pET22b:CaPII을 *E. coli* BL21 균주에 도입하여 isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside로 단백질 발현을 유도하여 CaPII:6xHis 퓨전 단백질을 과발현 시켰다. CaPII:6xHis 퓨전 단백질의 발현을 유도시킨 후 세포를 고주파음으로 분해 시킨 후 His에 결합성이 강한 니켈-NTA 레진에 통과시켜 과발현된 단백질을 순화하였다. 순화된 CaPII:6xHis 퓨전 단백질은 SDS-PAGE 겔 상에 예상된 크기인 16.7 kDa 에 위치하였다 (도 2).

[0051] [단계 2]

[0052] 단계 1에서 수득한 단백질을 정량하여 대표적인 프로테아제인 트립신에 대한 저해 활성을 시험해 보았다. 트립신 100 ng이 형광표지된 기질인 카제인-fluorescein isothiocyanate과 암조건에서 37℃에서 반응시켜 분해시킨 후 카제인을 침전시킨 후 상등액에 존재하는 fluorescein isothiocyanate을 형광 측정기로 측정하여 프로테아제 활성을 측정하였다. 여기에 CaPII:6xHis 단백질을 10, 100, 500 ng을 추가하여 프로테아제 활성을 비교하고, 대조군으로 복합 프로테아제 저해 화합물을 첨가한 것과도 비교하였다 (도 2). 복합 프로테아제 저해 화합물이 첨가된 곳에서는 프로테아제 활성이 완전히 저해되어 프로테아제를 첨가하지 않은 곳과 비슷한 정도의 형광량이 측정되었다. CaPII:6xHis는 10 ng에서는 효과가 전혀 없다가, 100 ng부터 90분부터 유의적으로 프로테아제 저해 효과를 보였고, 500 ng의 CaPII:6xHis는 60분부터 약 50% 프로테아제 저해 효과를 보였다.

[0053] [실시예 3] 병원균 접종 후 식물체에서의 CaPII 유전자의 발현 탐색 방법

[0054] 상기 실시예 1에서 수득한 CaPII 유전자의 병저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[0055] [단계 1]

[0056] 먼저 저항성 탐색 방법을 구체적으로 제시하기 위하여, 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬병 원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10^8 cfu/ml의 농도로 4엽기의 고추 녹광 품종 1, 2엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 인필트레이션(Infiltration)하여 접종하고, 접종 후에는 28℃, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실 처리하였다. 접종 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 각각 1, 2엽을 샘플링 하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

[0057] 다음으로 실시예 1에서 수득한 CaPII유전자를 Klenow enzyme을 이용하여 동위원소가 붙은 α - 32 P[dCTP] 을 표지한 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 텍스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65℃로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다. 이렇게 동위원소가 표지된 상기의 DNA 프로브는 나이론막(Hybond N+)에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 (Hybond N+) 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 동위원소가 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 발현 유무와 정도를 알아볼 수 있게 하였다. 상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일 량의 RNA 시료가 로딩 되었음을 확인하였다.

[0058] 이상의 실험결과를 도 3에 나타내었으며 실험의 결과 CaPII 유전자는 비병원성 고추 세균성 점무늬병 접종 후 빠른 시간에 발현이 시작되어 강하고 오랫동안 지속되었다. 즉, 불친화적 반응에서는 접종 후 5시간에 발현이 시작되어 25시간까지 지속적으로 그 량이 증가하였다.

[0059] [실시예 4] CaPII의 세포내 위치 분석

[0060] 실시예 1에서 수득한 CaPII의 아미노산 서열을 분석한 결과 아민기 말단에 단백질의 세포내 위치를 결정하는 시그널 펩타이드를 발견하였다. 이 시그널 펩타이드로 CaPII의 세포내 위치가 어떻게 되는지 알아보기 위하여 CaPII에 녹색형광단백질(GFP)을 퓨전 하여 *Nicotiana benthamiana*에 일시적으로 발현시켜 공초점 레이저 주사 현미경으로 그 위치를 확인하였다.

[0061] [단계 1]

[0062] 실시예 1에서 수득한 CaPII 유전자와 시그널 펩타이드를 제거한 CaPIIΔSP를 pBIN35S:GFP 벡터에 삽입하여 pBIN35S:CaPII:GFP 와 pBIN35S:CaPIIΔSP:GFP 벡터를 제작한 후 이 재조합 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens*

strain GV3101에 electroporation 방법을 통하여 도입하고 이를 *N. benthamiana* 잎에 접종한 후 48시간 후 공 초점 레이저 주사 현미경으로 관찰하였다 (도 4). CaPI1:GFP의 신호가 세포막 형태를 따라서 나왔기 때문에 세포막에 위치할 것으로 생각되어 빨간 형광 세포막 마커와 동시에 발현시켜 이미지를 겹쳐 비교해 보았다. 그 결과 온전한 CaPI1:GFP는 세포막 마커와 완벽히 겹쳐 주황색으로 나타났으나, CaPI1ΔSP:GFP의 경우 세포막 마커와 겹치지 않았다. 이는 CaPI1이 시그널 펩타이드에 의해 세포막에 위치함을 나타낸다.

[실시예 5] *CaPI1* 유전자 과발현에 의한 식물체의 병저항성 변화

고추식물에서 CaPI1 유전자가 과발현되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaPI1* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN35S 벡터에 도입시켜 pBIN35S:*CaPI1*, pBIN35S:*CaPI1ΔSP* 그리고 발현 확인용 pBIN35S:*CaPI1:HA* 및 pBIN35S:*CaPI1ΔSP:HA*를 제조한 후 이렇게 제작된 재조합 벡터들을 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101에 electroporation 방법을 통하여 도입하고 이를 고추 잎에 접종하여 *CaPI1*을 과다 발현하는 고추식물의 병저항성 변화 여부를 관찰하였다.

[단계 1]

*CaPI1*을 과발현하는 재조합벡터 35S:*CaPI1*, 35S:*CaPI1ΔSP*와 35S:*CaPI1:HA*, 35S:*CaPI1ΔSP:HA* 그리고 *CaPI1*을 과발현하지 않는 대조구 벡터 35S:00를 이용하여 형질전환 시킨 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101을 Yeast-Peptone (YEP: yeast extract 10g, peptone 10g, sodium chloride 5g/L) 배지에서 진탕배양 한 뒤 spectrophotometer를 이용하여 균주현탁액농도를 optical density 600 (OD₆₀₀) 에서 0.5, 1.0으로 맞추고 이를 고추 잎의 엽맥을 경계로 하여 각각 접종하고 그 결과를 도 5에 나타내었다. 35S:*CaPI1:HA*, 35S:*CaPI1ΔSP:HA*를 접종한 잎에서 24, 48시간 후 단백질 발현을 immunoblot으로 검정하여 모두 정상적으로 발현이 된 것을 확인하였다. 접종 5일째, *CaPI1*을 과발현하는 *Agrobacterium*을 접종한 부위에서 세포사멸이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 CaPI1ΔSP의 경우 세포사멸이 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 접종부위에서 세포사멸이 일어나는 것을 더 자세히 관찰하기 위해 고추 잎을 트리판 블루(trypsin blue) 시약으로 염색한 결과 세포사멸이 일어난 부위가 푸른색으로 염색되어 더욱 뚜렷하게 관찰할 수 있었고, 세포사멸에 의한 전해질 방출로 인한 전도율 증가도 CaPI1을 발현시켰을 때가 가장 높았다 (도 6). 접종 후 2일째 병저항성의 신호전달 물질로 알려진 활성산소의 발생량을 알아보기 위해 DAB (3,3'-diaminobenzidine) 염색을 수행하였고 그 결과를 도 7에 나타내었다. 그 결과, *CaPI1*을 과발현 하는 *Agrobacterium* 균주를 접종한 부위에서 활성산소의 축적이 강하게 일어나는 것을 관찰할 수 있었다.

[단계 2]

*CaPI1*이 과발현된 고추 잎에서 저항성 관련 유전자의 발현을 관찰하기 위해 식물을 수거하여 RNA를 추출하고 알티-피시알(RT-PCR)을 수행하고 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에서와 같이 *CaPI1*을 과발현하는 *Agrobacterium*을 접종한 잎에서 병저항성 관련 유전자로 보고된 *CaPRI* (*Capsicum annuum* pathogenesis-related protein 1), *CaSAR82A* (*Capsicum annuum* systemic acquired resistance 8.2), *CaDEF1* (*Capsicum annuum* defensin 1), *CaPO2* (*Capsicum annuum* peroxidase 2), 그리고 *CaPOA1* (*Capsicum annuum* ascorbate peroxidase 1)의 발현도 함께 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 반면 *CaPI1ΔSP*를 과발현하는 *Agrobacterium*을 접종한 잎에서는 병저항성 관련 유전자들이 현저하게 적게 발현되었다.

[실시예 6] *CaPI1* 유전자 발현 억제에 의한 병 저항성의 변화

고추식물에서 *CaPI1* 유전자의 발현이 특이적으로 억제되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 발현감소 여부 및 병에 대한 감수성의 증가 여부를 알아보기 위하여 실시예 1에서 수득한 *CaPI1* 유전자를 Virus-induced gene silencing (VIGS)에서 이용되어지는 TRV (Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaPI1* 유전자를 TRV2 벡터에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2:*CaPI1*을 제조하였다.

TRV2 vector는 제한효소 *EcoRI*로 자른 후 에탄올 침전 (ethanol precipitation)을 수행하고 살균수에 녹여 다시 DNA를 회수한 후에 alkaline phosphatase로 탈인산화시켰다. *CaPI1*의 전체 염기서열 부위 양쪽에 제한효소 *EcoRI* (GAATTC) 서열을 붙여 중합효소연쇄반응 (PCR)를 통해 증폭시키고 Invitrogen에서 제공하는 pCR2.1-TOPO vector에 삽입시켰다. 이 TOPO vector를 제한효소 *EcoRI*로 자른 후 나온 절편을 ligase를 이용하여 TRV2

vector에 삽입하여 TRV2:CaPII 재조합 벡터를 생성하였다. 유전자가 삽입되지 않은 공벡터인 TRV2는 대조구로 이용하였다.(참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113).

[0072] 이렇게 제조한 재조합벡터 TRV2:CaPII을 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101에 전기천공법을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 고추 유묘 (seedling)의 떡잎에 주사기를 이용, infiltration 방법으로 접종하여 고추식물에 도입함으로써 CaPII 유전자의 발현의 억제를 유도시켰다.

[0073] [단계 1]

[0074] CaPII의 발현이 억제된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성의 변화를 알아보기 위하여, 상기의 CaPII의 유전자의 발현이 억제된 고추 식물과 대조구로서 TRV2:00 벡터를 접종한 고추 녹광품종에 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)를 10^8 cfu ml⁻¹의 농도로 접종한 후 2일 이후 접종 잎의 병징을 관찰하였고, 5×10^4 cfu ml⁻¹로 접종하여 접종 후 0, 3일에 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하였다 (도 9). 그리고 병원균을 10^7 cfu ml⁻¹로 접종하여 접종 이후 24, 48시간 후에 실험구와 대조구의 감염 잎을 잎에서 RNA를 추출하여 양적 실시간 알티-피시알 (quantitative realtime RT-PCR)을 통해 CaPII의 특이적인 유전자 억제 효과와 함께 병 접종시 대조구 식물과 비교하여 병 저항성 관련 유전자의 발현 차이를 관찰하였다 (도 10).

[0075] 도 9에서와 같이 감염조직에서 병원성 균과 비병원성 균의 세균 생장을 측정한 결과 대조구에 비교하여 CaPII의 발현이 억제된 식물에서 비병원성 세균의 생장이 유의적으로 증가하였다. 알티-피시알 시험 결과 도 10과 같이, CaPII이 억제된 식물에서 효과적으로 유전자의 억제가 나타나는 것이 관찰되었고, CaPR10 같은 병 저항성 마커 유전자의 발현이 줄어든 것으로 나타났다.

[0076] [실시예 7] CaPII 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 병저항성 변화

[0077] 모델식물로 사용되는 애기장대 식물체에 CaPII 유전자를 도입하여 형질전환 식물체를 제조하고, CaPII 유전자의 과다발현시 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 5에서 제작한 pBIN35S:CaPII이 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 균주를 floral dipping 방법을 통하여 애기장대식물에 도입함으로써 CaPII 유전자의 과다발현을 유도시킨 형질전환 애기장대를 제작하고 아래와 같은 시험을 수행하였다.

[0078] CaPII 유전자가 과다 발현된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여, 상기 CaPII 유전자가 과다 발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에서 CaPII 유전자의 발현을 관찰하였으며 그 결과를 도 11에 나타내었다. #2, #3, #4는 사용된 형질 전환 식물의 계통번호를 나타내고, 실험결과 CaPII 유전자가 과다 발현됨을 관찰할 수 있었다.

[0079] 상기와 같이 CaPII이 과다 발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주를 접종하고 감염조직에서 세균생장을 관찰한 결과 CaPII 유전자가 과다발현된 식물에서 세균 생장이 야생형 식물 감염조직에서의 세균생장보다 적은 것을 알 수 있었다 (도 12).

[0080] 상기와 같이 CaPII이 과다 발현된 식물에 하이알로페로노스포라 아라비돕시디스 노코2 노균병 균주를 접종하고 감염조직에서 노균병 생장을 관찰한 결과 CaPII 유전자가 과다발현된 식물에서 노균병 생장이 야생형 식물 감염조직에서의 세균생장보다 적은 것을 알 수 있었다 (도 13).

[0081] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

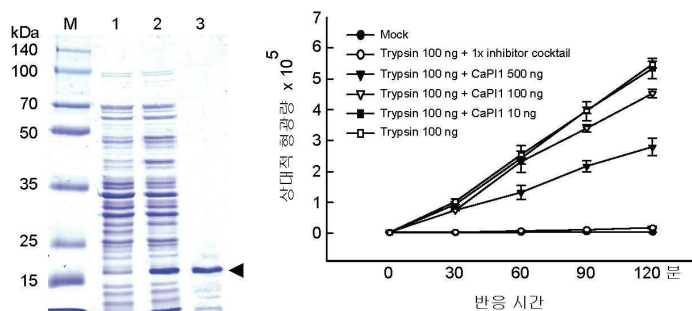
도면1

```

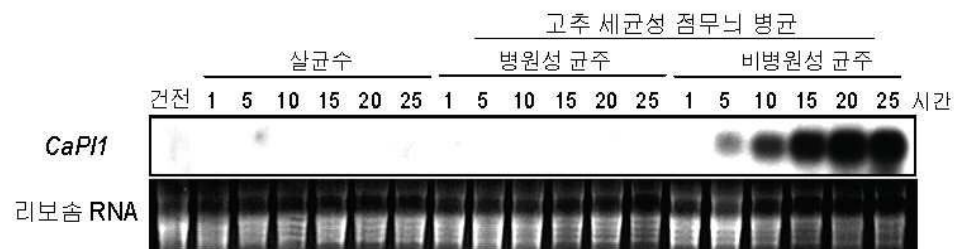
ctagagaaccactgcttactggcttatcgaaattaatacgactcactat 50
agggaattcactggttgccactggacagaaatccacagaattacaattacaatatc 120
ATGGAGAGTGTTAACAAGTTGTGTGTAGCATTTTTTATCATCAGCATGATGGTGGCGATG 170
M E S V N K L C V A F F I I S M M V A M
GCCGCGGCGCAGAGTGCTACGAACGTGAGGTCAACATACCATCTGTACAACCCGAGAAC 230
A A A Q S A T N V R S T Y H L Y N P Q N
ATCAACTGGGATTTGAGAACTGCCAGCGCTTACTGCGCTACTTGGGATGCTGACAAGCCG 290
I N W D L R T A S A Y C A T W D A D K P
CTCGAGTGGCGCCAAAGGTATGGCTGGACTGCTTTTTGTGGTCCTGCTGGACCTACTGGC 350
L E W R Q R Y G W T A F C G P A G P T G
CAAGCTGCTTGCGGTAGATGCTTGAGGGTGACAAACACAGGAACGGGAACACAAGCAACG 410
Q A A C G R C L R V T N T G T G T Q A T
GTGAGAATAGTAGATCAATGCAGCAATGGAGGGCTTATTGGATGTGAACGTGTTAAC 470
V R I V D Q C S N G G L D L D V N V F N
CAATTGGACACTGATCGACGGGGCTACCAGCAGGGCCACCTTATAGTCAACTATGAATTT 530
Q L D T D R R G Y Q Q G H L I V N Y E F
GTCAACTGCTAAtgactaagctggtagctagctctgcctaacaagtgccatatttatgt 590
V N C *
catcaataataaaccacgatcgagattgatttcatactattatcgagattgatgtttaga 650
ataaaagggactgagcttttaattaatagtataaacaattatattatctggaagctctat 710
atgtaccttggatactcttttaagattaataaaagaatgtcacttagtactaaaaaaaaa 770
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 780

```

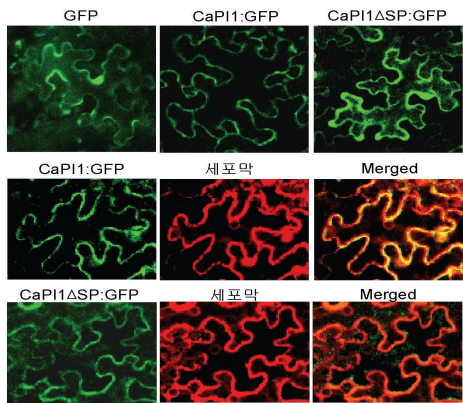
도면2



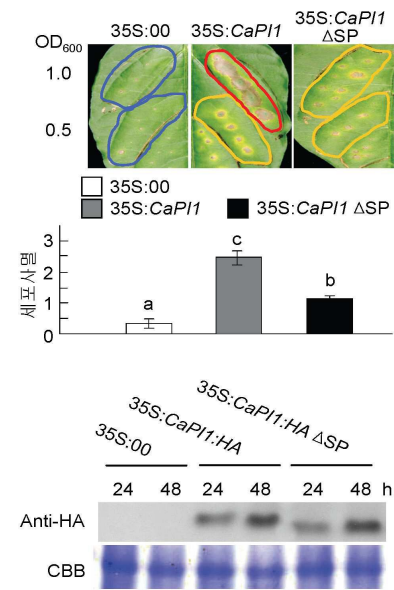
도면3



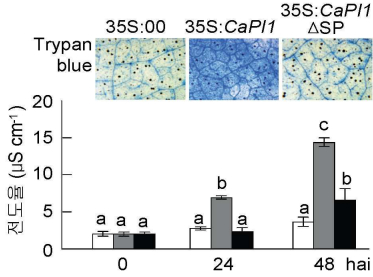
도면4



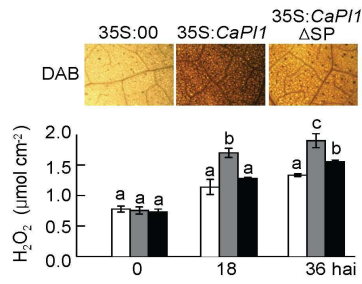
도면5



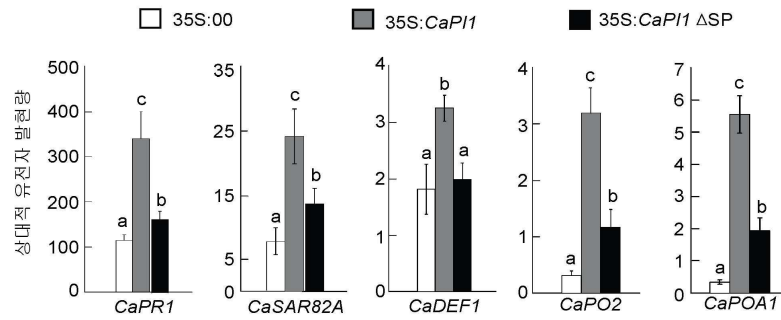
도면6



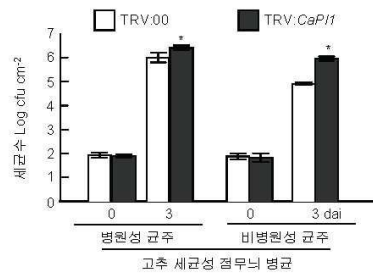
도면7



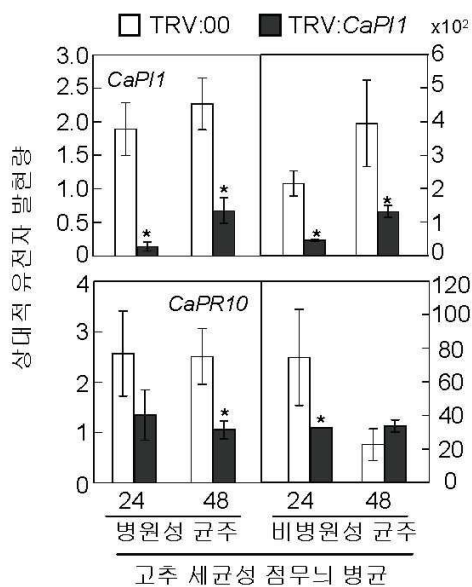
도면8



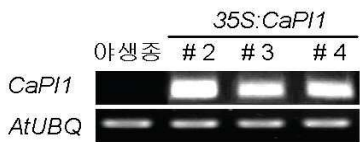
도면9



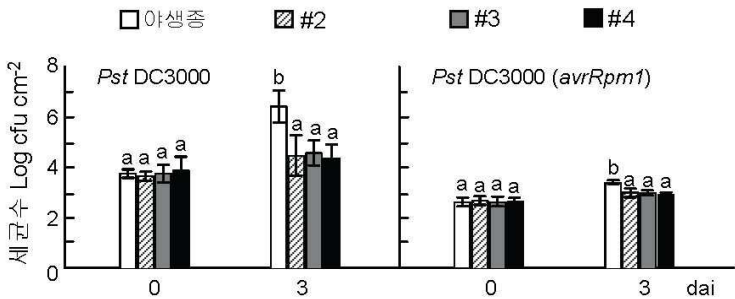
도면10



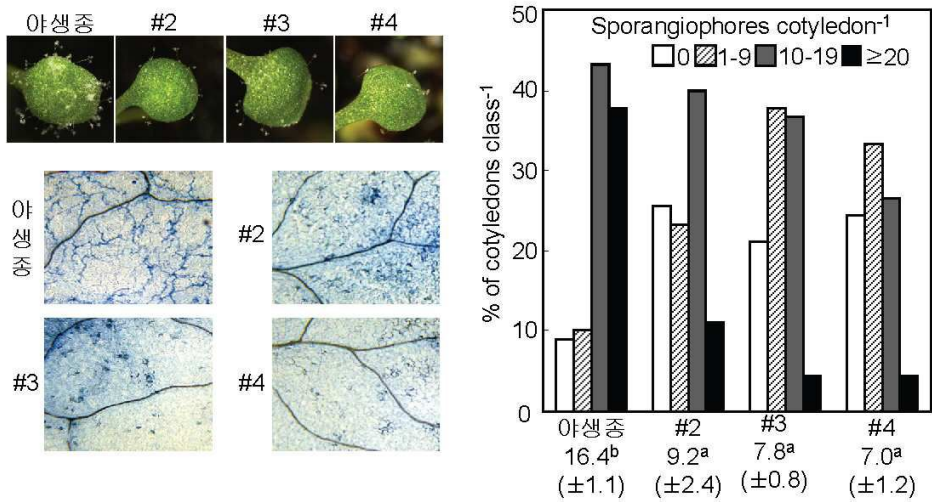
도면11



도면12



도면13



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)