(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0073078
(43) 공개일자 2013년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0140735
(22) 출원일자 2011년12월23일
심사청구일자 2011년12월23일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
황병국
서울특별시 서초구 사임당로17길 116, 103동 1405호 (서초동, 서초삼성래미안)
김대성
광주광역시 동구 중앙로290번길 20 (계림동)
(74) 대리인
김선애

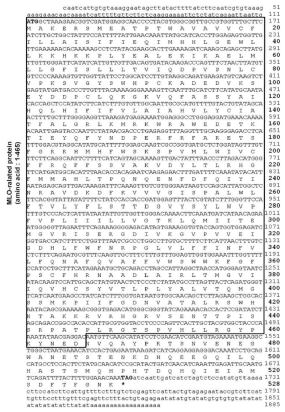
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **병저항성 관련 유전자 CaMLO2, 이를 이용한 식물병 저항성 탐색 및 형질전환 식물체**

(57) 요 약

본 발명은 병저항성 관련 유전자 *CaMLO2* (*Capsicum annuum mildew resistance locus O 2*), 이를 이용한 식물병 저항성 탐색방법 및 형질전환 식물체에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 상기 유전자는 병원균의 공격에 대한 식물체의 방어 반응 및 병저항성 식물체의 효율적이고 효과적인 분자적 육종을 위한 유전재료로서 유용하게 사용될 수 있으며, 식물병 저항성에 대한 탐색 및 작용 기작을 규명하는 도구로 이용될 수 있는 이점이 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ008027
부처명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21사업
연구과제명 고추에서 병저항성관련유전자의 분리와 기능분석
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2011.05.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자(*CaMLO2*).

청구항 2

서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자(*CaMLO2*).

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(CaMLO2).

청구항 4

제2항 기재의 유전자(*CaMLO2*)를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 6

식물체로부터 mRNA 분리하여 제2항 기재의 유전자(*CaMLO2*)의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병 또는 화학물질 저항성을 탐색하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물병 저항성에 관련된 신규 유전자인 *CaMLO2* 유전자 (*CaMLO2*: *C*apsicum *a*nnuum *M*ildew resistance *L*ocus *O* 2), 이를 이용한 식물병 저항성 탐색 및 형질전환 식물체에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 고추식물의 세균병인 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되는 식물병 저항성 관련 신규 유전자인 고추 유래의 *CaMLO2* 유전자의 염기서열 및 그에 따른 아미노산 서열을 제공하며, 이를 이용하여 생물적(biotic) 또는 비생물적 (abiotic) 처리시 저항성 관련 유전자 *CaMLO2*의 차별적인 발현 여부를 확인하는 식물체의 저항성 탐색방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 고추 식물에서 바이러스 유도 유전자 억제(VIGS, Virus-Induced Gene Silencing) 기술을 이용하여 상기 *CaMLO2* 유전자의 발현을 억제시키거나, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물에 이 유전자를 도입, 과발현 (overexpression)하여 *CaMLO2* 유전자의 식물체 병저항성 효과를 제공하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물은 세균, 곰팡이, 바이러스와 같은 식물병원체의 침입으로부터 자신을 보호하기 위하여 빠르고, 효과적인 병 저항성(방어)기작을 가지고 진화해왔다. 이 저항성반응은 병원균 침입에 대한 인식(recognition)과 침입한 병원균을 식물이 가지고 있는 방어(defense) 기작을 이용하여 더 이상의 진전을 억제하는 것으로 볼 수 있다.

[0003] 식물이 가지고 있는 선천적 면역성(innate immunity)에 대한 연구는 식물의 병방어반응과 신호전달경로를 구명하기 위한 흥미로운 주제이며 진핵생물 전반의 저항성반응을 이해하는데 크게 기여하게 될 것이다. 또한, 이 병저항성 유전자 기능연구는 응용적 측면에서도 중요한 의미를 가지게 되어, 고질적 식물병을 효율적으로 방제하기 위하여 이들 병저항성 유전자를 분자육종(molecular breeding)을 통하여 형질전환된 병저항성 식물(transgenic resistant plants)을 개발할 수 있다.

[0004] 우리나라에서 집약적으로 재배되고 있고 경제적으로 중요한 고추 (*Capsicum annuum* L.)는 식물병에 대한 저항성의 신호전달경로를 연구하기 위한 훌륭한 실험시스템을 제공해 주고 있다. 또한, 고추 병원 세균, 바이러스, 진균과 고추와의 상호작용은 널리 알려진 병태계(pathosystem)로 병저항성 반응 연구에 좋은 재료가 되어왔다. 따

라서 고추식물에서 저항성에 관여하는 주요 유전자들을 분자적으로 클로닝하고 기능 분석 (functional analysis)하는 것은 이들 유전자의 발현을 조절하는 다양한 식물방어신호전달경로 (signal transduction pathway)를 규명할 수 있고 이들 병저항성 유전자는 고추식물이나 다른 작물에 발현시켜 병저항성 형질전환식물을 개발하여 이들 저항성 식물이 실제 재배에 상용화될 경우 고추 등의 환경친화적 작물재배에 크게 기여할 수 있어 중요한 유전자원이 될 수 있다.

[0005] 식물은 다양한 미생물 병원체에 대항하기 위하여 복잡한 방어 기작을 개발하여 왔다. 강하고, 넓은 범위(broad-spectrum)의 저항성은 기주식물의 단일 유전자의 돌연변이에 의해 부여될 수 있다. 특히, 대부분 레이스의 보리 흰가루병원균 (powdery mildew fungus, *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*)에 대한 넓은 범위의 저항성은 보리의 *mildew resistance locus O* (*MLO*) 유전자의 돌연변이에 의한 것이다. 동물에는 존재하지 않고, 대부분의 식물종에만 특이적으로 존재하는 *MLO* 유전자들은 7-트랜스멤브레인을 갖는 칼모듈린 (calmodulin)을 결합하는 프로테인을 코딩한다. *MLO* 유전자의 돌연변이는 보리 흰가루병원균에 대항하여 오랜 기간 세포벽에서 침입전 (pre-invasive) 저항성을 제공한다고 알려져 있다. 병원체의 침입에 유도발현되는 *MLO* 유전자에 의한 세포사멸 신호전달이 식물의 세포 사멸을 조절하는 것으로 예상되고, 일시적으로 발현되는 *MLO*에 의해 계속적으로 이루어지는 병원체 공격에 대한 세포수준의 반응이 조절되는 것으로 알려져 있다. MLO 단백질은 7-트랜스멤브레인 도메인 (7-transmembrane domains)에 의해 세포막 (plasma membrane)에 위치하며 Ca^{2+}에 의존적인 방법으로 칼모듈린과 상호작용한다. 칼모듈린과 칼슘 이온의 상호작용이 식물의 방어와 세포사멸에 영향을 미치기 때문에 MLO의 칼모듈린 결합 기능은 중요한 역할을 한다. 칼슘 이온이 부착된 칼모듈린이 MLO의 칼모듈린 바인딩 도메인과 상호작용하는 것은 MLO 단백질들의 일반적인 특징이다. MLO의 돌연변이에 의한 광범위하고 강한 식물 병저항성은 널리 보고되어 있으나, Ca^{2+}-loaded 칼모듈린을 조절하는 MLO의 기능은 아직 확실하게 밝혀지지 않다. 그러므로 MLO 단백질의 생리적이고 생화학적인 역할을 연구하는 것은 식물방어와 세포사멸을 조절하는 MLO의 기능을 완전하게 밝히기 위하여 필수적이다.

[0006] 특히 보리 흰가루병의 저항성에 MLO가 관여한다는 것은 많이 연구되어 왔지만, 식물세균병원균에 대한 MLO의 기능은 아직 보고된 바가 없다. 고추 식물에서 세균 병원균에 대한 MLO의 기능을 밝히는 것은 고추식물의 병저항성 기작을 이해하는데 필요하고, 나아가 병저항성 형질전환 식물체 제작을 위한 주요한 유전자원으로 이용될 수 있을 것이다.

[0007] 본 발명의 배경이 되는 기술로서 대한민국 공개특허공보 10-2001-0041943 (2001.05.25)에 MLO 단백질을 암호화하며 식물에 진균 내성을 부여하는 유전자에 대해 기재되어 있으나, 식물세균병원균에 대한 저항성을 가진 고추 유래 MLO 유전자에 대해서는 개시되어 있지 않다. 또한, 김민철의 경상대학교 대학원 생화학과 2002 박사 학위 논문에는 쌀에서 분리된 OsMlo 유전자 등을 이용하여 식물 생체 방어 기작에 있어서의 CaM과 Mlo 단백질간의 상호작용에 대해 기재되어 있으나, 식물세균병원균에 대한 저항성을 가진 고추 유래 MLO 유전자에 대해서는 개시되어 있지 않다. 고추 유래 MLO 유전자에 관련해서는 NCBI GenBank Accession No. AY934528(CaMLO1) 및 Ralph Panstruga, Plant Molecular Biology (2005) 59:485-500에 공개되어 있는 정도이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 10-2001-0041943 (2001.05.25)

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 김민철, 경상대학교 대학원 생화학과 2002 박사 학위 논문

(비특허문헌 0002) NCBI GenBank Accession No. AY934528 (2005)

(비특허문헌 0003) Ralph Panstruga, Plant Molecular Biology (2005) 59:485-500

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자의 하나인 MLO (*CaMLO2: Capsicum annuum mildew resistance locus O 2*) 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 목적은 상기 *CaMLO2* 유전자를 이용하여 식물병 또는 화학물질에 대한 저항성 존재 여부를 탐색하는 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0012] 더 나아가, 본 발명은 상기 *CaMLO2* 유전자를 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제작하는데 그 목적이 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 상기 목적은, 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strain Bv5-4a)을 접종한 후, 과민성 세포사멸을 일으킨 녹광 고추 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)으로부터 분리한 신규 저항성 관련 유전자 *CaMLO2*을 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 생물적/화학적 처리를 통하여 *CaMLO2*의 발현 여부를 조사하고, VIGS를 통한 *CaMLO2*의 유전자가 억제된 고추식물과 이 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaMLO2* 유전자의 식물병 저항성 관련 기능을 확인하여 달성하였다.

[0015] 따라서 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자(*CaMLO2*)를 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자(*CaMLO2*)를 제공한다.

[0017] 나아가 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(CaMLO2)을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 유전자(*CaMLO2*)를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 상기 재조합 벡터는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 pBIN35S:*CaMLO2*, pBIN35S:CaMLO2:GFP 또는 pTRV2:*CaMLO2*이다. 바람직하게는 상기 재조합벡터는 상기 유전자(*CaMLO2*)를 바이러스-유도 유전자 사일런싱(virus-induced gene silencing, VIGS)을 위한 벡터인 TRV2(Tobacco Rattle Virus 2) 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 TRV2:*CaMLO2*이다.

[0019] 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 현미주사법(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 소포자의 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.

[0020] 또한, 본 발명은 식물체로부터 mRNA 분리하여 *CaMLO2* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병 또는 화학물질 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다.

[0021] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0022] 먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 Bv5-4a 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광 고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하

고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxygenin)으로 표지하여 프로브(Probe)를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용한 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization) 과정을 수행하여 병저항성과 관련이 있을 것으로 예상되는 클론을 선발하여, 유전자의 염기서열을 해독하여, *CaMLO2* 로 명명된 고추 녹광 품종의 MLO 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그에 따른 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 및 도 2 참조).

[0023] 본 발명의 CaMLO2 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 CaMLO2의 단백질에서 식물의 MLO 단백질에서 전형적으로 나타나는 MLO 관련 단백질 (MLO-related proetin) 도메인을 갖고 있고 (도 1), 세부적으로 7개의 트랜스멤브레인 도메인 (transmembrane domain; TMD 1 - TMD7) 과 아미노산 서열의 C-말단에 칼모듈린 바인딩 도메인 (calmodulin binding domain; CaMBD)을 가지고 있었다.

[0024] *CaMLO2* cDNA의 코딩 리전(coding region, ORF)은 528 개의 아미노산을 암호화하는 1587 개의 염기서열로 이루어져 있고, CaMLO2 단백질의 칼모듈린 바인딩 도메인에는 보존된 라이신 (L), 트립토판 (W), 알라닌 (A) 그리고 히스티딘 (H)이 존재하는 것이 확인되었다. 확인된 *CaMLO2*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1 및 도 2에 나타내고, 기존에 보고된 다른 식물의 MLO 단백질들과의 관계를 계통도 제작을 통한 비교와 보존된 모티프와 기존에 보고된 다른 식물의 비교를 도 3에 나타내었다.

[0025] 다음에, 본 발명은 CaMLO2 단백질의 칼슘이온 의존적인(Ca^{2+}-dependent) 칼모듈린 바인딩을 확인하여 도 4에 나타내었다. CaMLO2 단백질의 C-말단에 존재하는 칼모듈린바인딩 도메인(CaMBD)을 코딩하는 염기서열부분만을 클로닝하여 GST 재조합 대장균 발현 시스템을 통하여 재조합 단백질을 발현시킨 후, 바이오틴이 부착된 칼모듈린(Biotin-CaM)을 이용하여 칼슘 이온 (Ca^{2+})의 유무상황에서 GST-CaMBD 재조합 단백질과 Biotin-CaM의 상호작용을 확인한 결과 칼슘 이온 (Ca^{2+})이 존재할 때만 CaMBD와 CaM이 상호작용함을 확인하였다. 칼슘 이론의 제거제인 EGTA를 처리하였을 때에는 CaMBD와 CaM은 상호작용하지 않았다.

[0026] 다음에, 본 발명은 CaMLO2 단백질의 형광단백질인 GFP (green flourescent protein)을 CaMLO2의 C-말단에 부착하여 식물발현용 벡터인 *pBIN35S* 벡터에 삽입한 재조합벡터를 제작하여 양파의 표피세포와 *Nicotinan benthamiana*의 표피세포를 이용하여 CaMLO2 단백질의 식물 세포 내 위치를 확인한 결과를 도 5a ~ 도 5d에 나타내었다.

[0027] 다음에, 본 발명은 생물적/화학적 처리를 한 식물체로부터 mRNA를 분리하여 *CaMLO2* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병 또는 화학물질 저항성을 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 살리실산(salicylic acid)을 예로 들 수 있다. 상기 *CaMLO2* 유전자 발현 여부 확인은 노던 블럿, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자가 식물 병원균 또는 식물 호르몬 처리에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 6a 내지 도 6b 참조). 따라서 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자는 식물체의 병 또는 화학물질 저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기의 *CaMLO2* 유전자 발현을 억제하는 재조합 벡터를 이용하여 고추식물에서 특이적으로 *CaMLO2* 유전자가 억제된 식물체를 제작하고 병 저항성이 증대되는 것을 확인하고, *CaMLO2* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성 감소를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자육종의 재료를 제공할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 *CaMLO2* 유전자 발현을 억제하는 재조합 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체에 병 저항성을 부여하는 방법도 제공한다.

[0029] 보다 구체적으로 본 발명은 바이러스 유도 유전자 억제 기술(virus-induced gene silencing (VIGS))에 이용되어지는 TRV(Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaMLO2* 유전자를 TRV 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 TRV:*CaMLO2*를 제작하였다. 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 *CaMLO2*의 발현이 억제된 VIGS 식물체를 제조하여 저항성이 증대되는 것을 확인하고 병저항성 형질전환 식물체를 제공할 수 있었다 (도 7a 내지 도 8d 참조).

[0030] 나아가 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S:*CaMLO2*)와 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여, 애기장대 식물에서의 형질전환 발현(transgenic expression)을 통한 *CaMLO2* 유전자의 식물체 병저항성 감소 기능을 확인하였다(도 9a 내지 도 12d 참조).

[0031] 상술한 바와 같이 본 발명에서 *CaMLO2*가 고추 식물의 병저항성 조절에 중추적 역할을 한다는 것을 확인하고 *CaMLO2*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 생명공학적 식물을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0032] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 고추 식물 세균병인 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자인 *CaMLO2* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공함과 동시에, 이 유전자를 이용하여 식물병 저항성 탐색방법을 제공할 수 있게 되었다.

[0033] 아울러 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자 억제를 통한 저항성 증가를 확인하고, 유전자를 애기장대에 과발현시켜 식물병 저항성의 차이를 확인함으로써 본 발명에 의한 *CaMLO2*는 병 저항성 식물체의 육종을 위한 재료로서 제공되어 질 수 있다. 이러한 본 발명은 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있는 효과가 있으므로 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종 (*Capsicum annnuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 *CaMLO2* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,

도 2는 본 발명에 의한 CaMLO2와 다른 식물의 MLO 아미노산 서열을 비교한 결과를 나타내고,

도 3은 본 발명에 의한 고추 CaMLO2의 아미노산 서열과 모델식물인 애기장대와 기존에 보고된 다른 작물의 MLO 단백질들의 관계를 나타낸 계통도와 칼모듈린 바인딩 도메인을 비교한 것이고,

도 4는 칼슘이온에 의존적인 칼모듈린 바인딩 도메인과 칼모듈린의 상호작용을 확인한 것이고,

도 5a ~ 도 5d는 *CaMLO2*와 형광단백질을 암호화하는 재조합 벡터의 제작을 통해, CaMLO2 단백질의 세포 내 위치를 확인한 것이고,

도 6a는 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 및 비병원성 균주를 접종하였을 때, 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 *CaMLO2* 유전자의 발현차이를 나타낸 도면이고,

도 6b는 살리실산(Salicylic acid; SA)과 메칠자스모네이트(Methyl jasmonate; MJ) 을 처리한 후 시간별로 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

도 7a는 바이러스 유도 유전자 억제(virus-induced gene silencing; VIGS)의 방법을 사용하여 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자의 발현이 억제된 것을 확인한 도면이고,

도 7b는 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자의 발현이 억제된 식물 내 세균생장이 감소됨을 나타낸 도면이고,

도 7c는 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 병징을 비교한 것을 나타낸 도면이고,

도 7d 및 도 7e는 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 각각 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, *CaMLO2* 의 발현 억제와 저항성 관련 유전자의 발현 차이를 나타낸 결과를 보인 도면이고,

도 8a 및 도 8b는 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 감염 고추 잎 조직에서의 H_2O_2의 변화를 각각 댑(DAB) 염색(3,3'-diaminobenzidine staining)과 정량을 통해 나

타낸 도면이고,

도 8c 및 도 8d는 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 감염 고추 잎 조직에서의 세포사멸을 각각 트리판(Trypan) 염색과 이온전도도의 측정을 통해 정량화한 도면이고,

도 9a는 재조합벡터 pBIN35S:*CaMLO2*을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여 *CaMLO2* 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 *CaMLO2* 유전자가 과발현 되는 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 9b 및 도 9c는 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)의 병원성 균주 (DC3000)와 비병원성 균주(DC3000 avrRpm1)를 접종하였을 때, 각각 병징의 차이와 세균생장의 차이를 확인한 결과이고,

도 10a는 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 병원성 균주 DC3000 과 비병원성 균주 DC 3000 avrRpm1의 세균성 흑반병 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)의 병원성 균주 (DC3000)와 비병원성 균주(DC3000 avrRpm1)를 접종하였을 때, 감염 잎 조직에서의 H_2O_2의 변화를 정량을 통해 나타낸 도면이고,

도 10b는 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 병원성 균주 DC3000 과 비병원성 균주 DC 3000 avrRpm1의 세균성 흑반병 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)의 병원성 균주 (DC3000)와 비병원성 균주(DC3000 avrRpm1)를 접종하였을 때, 감염 조직에서의 세포사멸을 이온전도도의 측정을 통해 정량화한 도면이고,

도 11은 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 병원성 균주 DC3000 과 비병원성 균주 DC 3000 avrRpm1의 세균성 흑반병 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)의 병원성 균주 (DC3000)와 비병원성 균주(DC3000 avrRpm1)를 접종하였을 때, 병방어 관련 유전자의 변화를 리얼타임 알티 피시알 (Real time-RT PCR)을 통해 나타낸 결과이고,

도 12a는 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 노균병 (*Hyaloperonospora parasitica*)에 대한 병저항성이 감소된 것이 나타난 사진이고,

도 12b는 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 노균병 (*Hyaloperonospora parasitica*) 접종 후 균사의 생장을 트리판 블루 염색(trypan blue staining)을 통해 살펴본 결과를 나타낸 도면이고,

도 12c 및 도 12d는 본 발명에 의한 *CaMLO2* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 노균병 (*Hyaloperonospora parasitica*)에 대한 병저항성이 붕괴된 것을 포자경수 및 포자수를 측정함으로써 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 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.

[0036] **[실시예 1] *CaMLO2*유전자의 염기/아미노산 서열 결정**

[0037] 고추 세균성 점무늬병에 대한 병저항성 관련 단백질 중 하나인 MLO(*CaMLO2*: *C*apsicum *a*nnuum *m*ildew *r*esistance *l*ocus *O* *2*) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0038] 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성세포사멸반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.

[0039] 다음에, 이 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 이용하여 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로부터 개개의 cDNA 클론을 제조하여 나이론막(Hybond N+)에 일정하게 흡착시킨 후, 각각 고추세균성점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxygenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하였다.

[0040] 하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주 접종된 식물체의 mRNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 유전자를 병저항성에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 수득하였다.

[0041] 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 CaMLO2 단백질 코딩 유전자를 확인하고 고추 MLO (*CaMLO2*) 유전자로 명명하였다. CaMLO2 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 식물의 MLO 그룹에 속함을 알 수 있었다(도 1 내지 도 3 참조). 확인된 *CaMLO2*의 유전자 염기서열(서열번호 1)과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0042] **[실시예 2] CaMLO2 의 칼모듈린 바인딩 활성 확인**

[0043] 상기 실시예 1에서 수득한 CaMLO2 유전자가 코딩하는 CaMLO2 단백질의 칼모듈린 바인딩의 활성을 검정하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[0044] **[단계 1]**

[0045] 대장균의 재조합 단백질 발현 시스템을 이용하였다. CaMLO2의 C-말단에 위치한 칼모듈린 바인딩 도메인(Calmodulin binding domain; CaMBD)을 암호화하는 염기서열을 재조합 GST 벡터에 삽입하고, 대장균 BL21 균주에 형질전환하여 재조합 단백질을 발현시켰다.

[0046] **[단계 2]**

[0047] 대장균 단백질 발현 시스템을 이용하여 순화된 단백질의 칼모듈린 바인딩 능력 (Camodulin binding ability)은 어피니티 씨비피 퓨전 프로테인 디텍션 키트 (Stratagene 판매, La Jolla, CA)를 이용하여 검정되었다. 바이오틴이 부착된 칼모듈린이 1차 탐지자 (primary probe)로 사용되고, 바이오틴을 탐지하기 위한 2차 탐지로 스트렙타비딘 알칼라인 포스파테이즈 (Streptavidin alkaline phosphatase)가 이용되었고, 상호작용의 결과 부착되어진 바이오틴은 화학발광기질은 씨디피-스타 (Sigma-Aldrich 판매, St. Louis, MO)에 의해 발광되어 X-ray 필름을 통해 확인 할 수 있었다. 이를 통해 확인된 결과가 도 4에 나타내어져 있다.

[0048] **[실시예 3] CaMLO2 의 형광단백질 부착을 통한 세포내 위치 확인**

[0049] *CaMLO2* 유전자를 녹색형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)이 표지되어 있는 재조합 벡터를 이용하여 식물 내에서 CaMLO2 의 발현위치를 탐색하기 위하여 CaMBL1 유전자를 326GFP 벡터에 도입시켜 재조합 벡터인 smGFP:CaMLO2을 제조하였다(도 5a).

[0050] **[단계 1]**

[0051] CaMLO2가 식물에서 발현되는 위치를 알아보기 위하여 입자탄이용 DNA 전이술을 이용하여 양파식물에 녹색형광 단백질이 표지되어 있는 CaMLO2를 도입시켜서 공초점현미경을 이용하여 관찰하였다. 도 5b는 그 결과를 나타내고 있다.

[0052] **[단계 2]**

[0053] 상기 제조된 재조합벡터를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumafeciens*) GV3101 스트레인을 이용하여 *Nicotiana benthamiana* 에 일시적으로 발현 시켜 역시 공초점레이져현미경을 이용하여 관찰하였다. 발현된 식물조직에서 단백질을 추출하고 울트라 원심분리를 통해 식물세포의 원형질부분과 멤브레인 층을 분리한 이후 GFP 안티바디를 이용한 웨스턴 블라팅을 통해 CaMLO2의 식물세포 내 위치를 재확인할 수 있었다. 도 5c와 5d가 이 결과를 보여주고 있다.

[0054] **[실시예 4] 병원균 접종에 의한 고추식물에서의 *CaMLO2* 유전자의 발현 탐색**

[0055] 상기 실시예 1에서 수득한 *CaMLO2* 유전자의 저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[0056] **[단계 1]**

[0057] 먼저 저항성 탐색 방법을 구체적으로 제시하기 위하여, 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 YN(Yeast- Nutrient) 배지에서 배양한 후, 10^8 cfu/㎖의 농도로 6엽기의 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)의 5, 6엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 침투시켜 접종하고, 접종 후에는 28℃, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실 처리 하였다. 접종 후 시간대별로 잎을 샘플링하여 RNA를 분리하고, 포름알데하이드 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N)으로 전이시켰다.

[0058] 다음으로 실시예 1에서 수득된 *CaMLO2* 유전자에 클레나우 효소(Klenow enzyme)를 이용하여 동위원소가 붙은 α-^{32}P[dCTP] 을 표지한 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65℃로 24 시간 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.

[0059] 이상의 실험결과를 도 6a에 나타내었으며 실험의 결과 *CaMLO2* 유전자는 병원성 고추 세균성 점무늬병 접종 후 20시간 이후에, 비병원성 고추 세균성 점무늬병 접종 10시간 후 강하게 발현하였다(도 6a).

[0060] **[실시예 5] 식물 호르몬에 의한 *CaMLO2* 유전자의 유도 발현**

[0061] 본 발명의 *CaMLO2* 유전자가 통상 세균성 병원균에 대해 저항성 유도에 사용되는 식물 호르몬인 살리실산과 메칠자스모네이트에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0062] **[단계 1]**

[0063] 먼저, *CaMLO2* 유전자의 발현 유도에 유용한 유도체를 탐색하기 위하여, 식물병 저항성 발현의 유도에 관여한다고 알려진 화학물질들 중 살리실산(salicylic acid)과 메칠자스모네이트(methyl jasmonate)를 사용하여 저항성 유도 시험을 실시하였다. 모든 실험에 6엽기의 고추 잎이 이용되었다.

[0064] 살리실산은 5 mM의 농도로 고추 잎에 스프레이 하는 방법으로 처리하였으며, 메칠자스모네이트는 100 μM의 농도로 처리하였다. 각각의 식물들은 처리 1, 5, 10, 15, 20, 25시간 후에 잎을 수거하였고 각각의 샘플에서 RNA를 추출하였고 추출된 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시킨 후 다음과 같이 노던블러팅을 수행하였다. 시험방법은 실시예 2에 기술한 것과 동일하다.

[0065] 실험의 결과 *CaMLO2* 유전자는 도 6b에서 보이는 것과 같이 살리실산을 처리한 후 발현이 5시간부터 유도되어 25시간까지 발현이 강하게 유지되는 것을 관찰할 수 있었고, 메칠자스모네이트를 처리시 살리실산에 비해 약하게 발현이 유도되면 유지되는 것을 관찰할 수 있었다 (도 6b).

[0066] **[실시예 6] *CaMLO2* 유전자 발현의 억제에 의한 병 저항성의 변화**

[0067] 고추식물에서 *CaMLO2* 유전자의 발현이 특이적으로 억제되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 붕괴 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaMLO2* 유전자를 바이러스 유도 유전자 억제(VIGS, virus-induced gene silencing)에서 이용되어지는 TRV (Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaMLO2* 유전자를 TRV 벡터에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV:*CaMLO2*를 제조하였다 (참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113).

[0068] 이렇게 제조한 재조합벡터 TRV:*CaMLO2*를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법 (electrophoration)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 고추

유묘 (seedling)의 떡잎에 주사기를 이용, 엽육주사 (infiltration) 방법으로 접종하여 고추식물에 도입함으로써 *CaMLO2* 유전자의 발현의 억제를 유도시켰고, 유전자 발현 억제의 효과는 역전사효소 피씨알 (RT-PCR) 및 실시간 RT-PCR (real-time RT-PCR)을 통하여 확인하였다 (도 7a 참조).

[0069] **[단계 1]**

[0070] *CaMLO2*의 발현이 억제된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성의 변화를 알아보기 위하여, 상기의 *CaMLO2*의 유전자의 발현이 억제된 고추 식물과 대조구로서 TRV2:00 벡터를 접종한 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 10^7 과 10^8 cfu ml^{-1}의 농도로 접종한 후 접종 잎의 병징을 관찰하였고, 5 x 10^4 cfu ml^{-1}로 접종하여 접종 후 0, 3일에 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하였다(도 7b 및 도 7c).

[0071] 또한, 병원균 10^7 cfu ml^{-1} 농도로 접종 후 18, 36시간 후에 실험구와 대조구의 감염 잎에서 RNA를 추출하여 실시간 알티-피시알 (real-time RT-PCR)을 통해 *CaMLO2* 의 특이적인 유전자 억제 효과와 함께 병 접종 시 대조구 식물과 비교하여 병저항성 관련 유전자의 발현 차이를 관찰하였다 (도 7d 및 도 7e).

[0072] 그 결과, 도 7b에서와 같이 감염조직에서 병원성 균과 비병원성 균의 세균 생장을 측정한 결과 대조구에 비교하여 병원성 균을 접종한 식물에서만 *CaMLO2*의 발현이 억제된 식물에서 더 적은 세균생장을 나타냈다.

[0073] 그리고 도 7c에 나타난 바와 같이 실험결과 VIGS로 *CaMLO2*의 발현이 억제된 식물에서 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 접종 후 병징을 관찰한 결과, 병원성 균주 접종시 대조구에 비하여 접종 후 6일 이후에도 황화와 괴저 현상이 지연되는 것이 관찰되었고, 비병원성 균주 접종시 대조구 식물과 별다른 차이가 없었다.

[0074] 또한 실시간 알티-피시알 시험 결과 도 7d 및 도 7e와 같이, *CaMLO2*가 억제된 식물에서 효과적으로 *CaMLO2* 유전자의 억제가 나타나는 것이 관찰되었고, 병원성 균주 접종시 살리실산에 의존적인 대표적 저항성 관련 유전자인 *CaPR1* 유전자(Choi et al. (2007) Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens)의 발현이 증가한 것을 확인하였다.

[0075] 그리고 병원균 10^7 cfu ml^{-1}로 접종하여 접종 이후 시간대 별로 식물저항성 신호전달 관련 물질인 H_2O_2를 정량하고, 저항성 반응의 표현인 식물조직의 세포사멸을 이온전도도 측정을 통해 정량화하였다 (도 8a ~ 도 8d).

[0076] 도 8a ~ 도 8d에 나타난 바와 같이 대조구 식물에 비해 *CaMLO2*가 억제된 식물에서 H_2O_2의 축적과 이온전도도가 병원성 식물을 접종하였을 때에만 증가함을 알 수 있었다.

[0077] **[실시예 7] *CaMLO2* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 *CaMLO2* 유전자의 과다발현에 의한 애기장대 식물의 병 저항성 변화**

[0078] 모델식물로 사용되는 애기장대 식물체에서 *CaMLO2* 유전자의 과다발현시 다른 병 발생과 관련된 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaMLO2* 유전자를 pBIN35S 벡터에 도입시켜 pBIN35S:*CaMLO2*를 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S:*CaMLO2*를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법 (electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물에 도입함으로써 *CaMLO2* 유전자의 과다발현을 유도시킨 형질전환 애기장대를 제작하고 아래와 같은 시험을 수행하였다.

[0079] **[단계 1]**

[0080] 상기와 같이 *CaMLO2*가 과다 발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 병원성 및 비병원성 균주를 5 x 10^4 cfu / ml 농도로 접종하고 식물체의 변화를 관찰하였다. 도 9b에 나타난 바와 같이, *CaMLO2*가 과다 발현된 식물체에서 야생형에 비하여 병원성의 세균성 병에 대하여 감수성을 나타내고 있음이 관찰되었고, 도 9c에

나타난 바와 같이, 감염조직에서 세균생장을 관찰한 결과 *CaMLO2* 유전자가 과다발현된 식물에서 병원성 세균 생장이 야생형 식물 감염조직에서의 세균생장보다 높은 것을 알 수 있었다. 도 10a 및 도 10b에 나타난 바와 같이, H_2O_2의 축적은 병원성 세균 접종 초기에 대조구에 비해 낮고, 이온전도도는 병원성 세균 접종후 후기 시간대에 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 병원성 세균 접종시 초기시간에 방어 반응이 대조구에 비해 붕괴되었으나, 후기시간 병원균 생장에 의한 괴저반응의 증가로 이온 전도도가 증가함을 시사한다. 비병원성 세균 접종시에는 대조구와 비교하여 별다른 변화가 없었다.

[0081] **[단계 2]**

[0082] 병원성 및 비병원성 세균 10^7 cfu ml^{-1} 농도로 접종 후 24, 48시간 후에 실험구와 대조구의 감염 잎에서 RNA를 추출하여 실시간 알티-피시알 (real-time RT-PCR)을 통해 병 접종 시 대조구 식물과 비교하여 병저항성 관련 유전자의 발현 차이를 관찰하였고, 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0083] **[단계 3]**

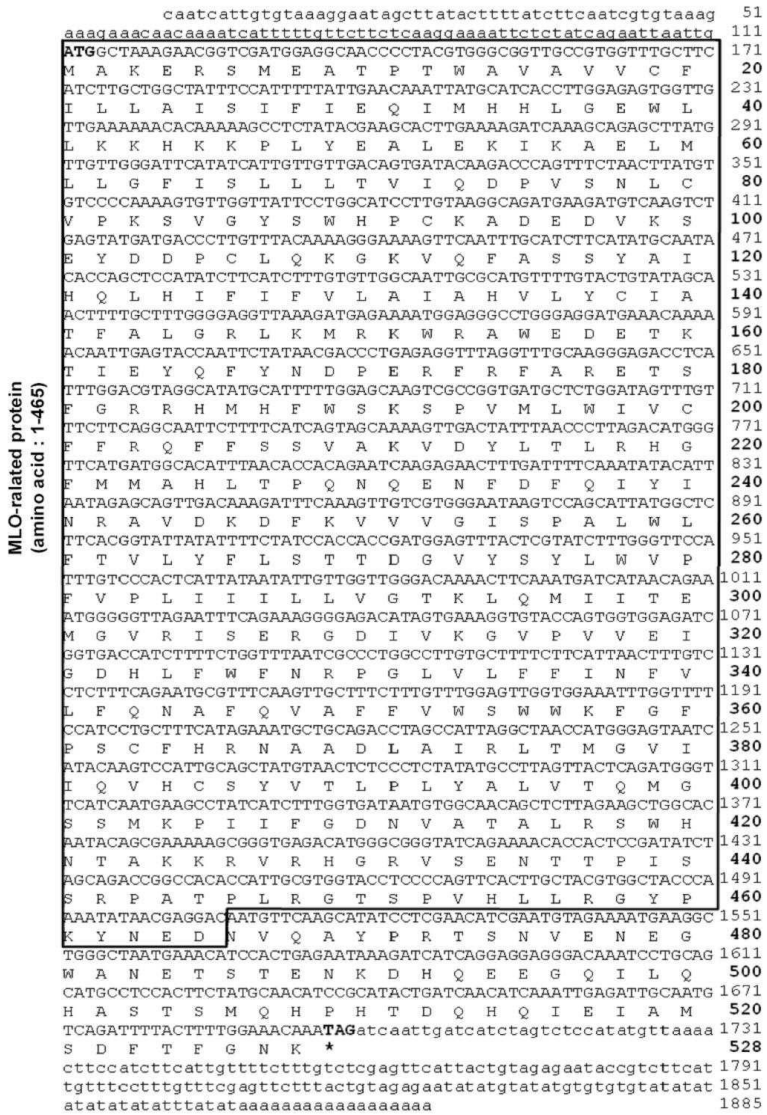
[0084] *CaMLO2*가 과다 발현된 식물에, 애기장대에서 노균병을 일으키는 순활물 기생체인 하이알로페로노스포라 파라시티카 Noco2 (*Hyaloperonospora parasitica* Noco 2)를 접종한 후 병저항성의 변화를 관찰하였다. *CaMLO2*가 과발현된 식물과 과발현하지 않는 야생형 대조구 식물의 떡잎시기에 하이알로페로노스포라 파라시티카 Noco2를 $5x10^4$ 포자 ml^{-1}의 농도로 스프레이접종 하였다. 접종 후 17℃의 온도에서 습실 처리하였다.

[0085] 그 결과 *CaMLO2*를 과발현하는 형질전환 애기장대 식물에서 감수성이 증가되어 노균병원균의 균사생장이 증가되는 것을 관찰할 수 있었고 그 결과를 도 12a ~ 도 12d에 나타내었다.

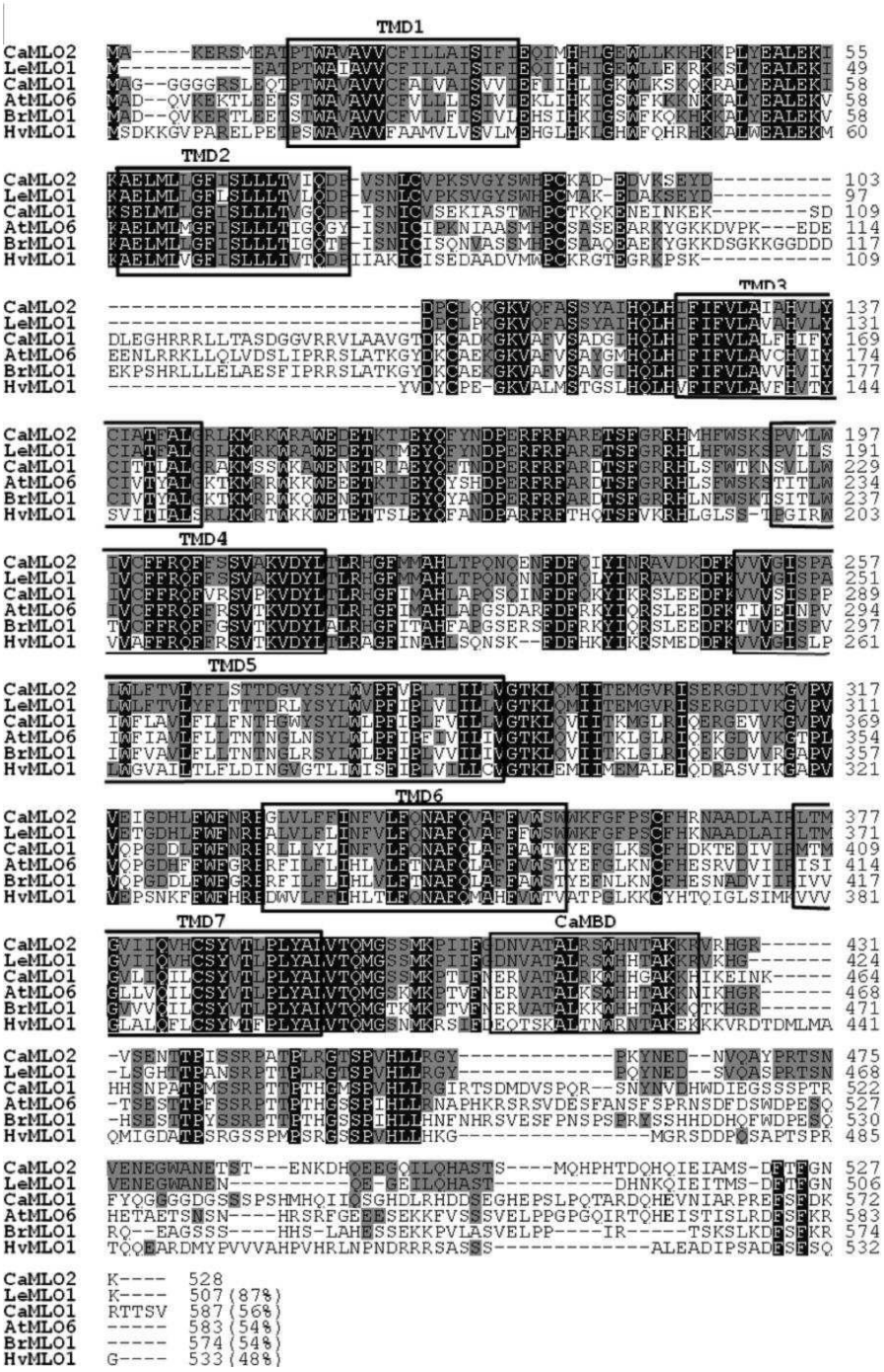
[0086] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

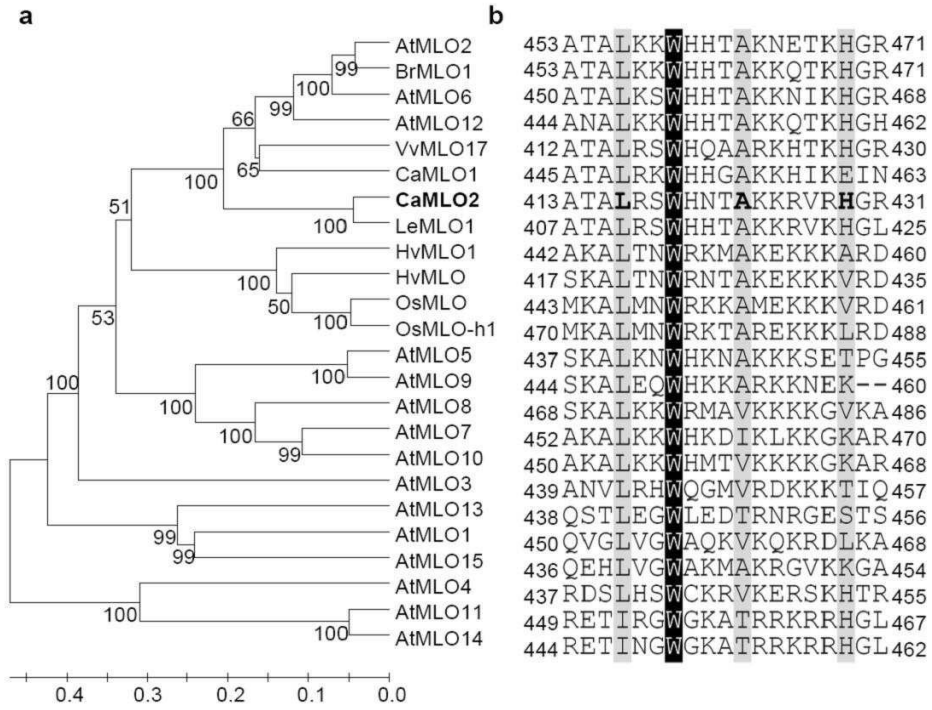
도면1



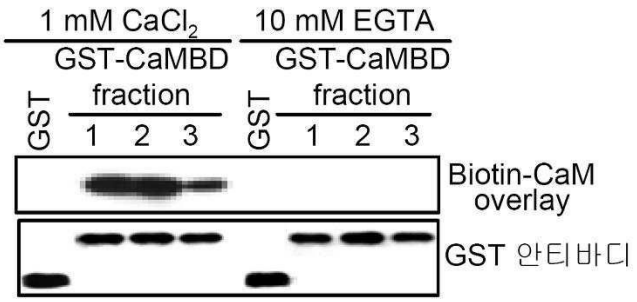
도면2


TMD1
TMD2
TMD3
TMD4
TMD5
TMD6
TMD7
CaMBD
CaMLO2
LeMLO1
CaMLO1
AtMLO6
BrMLO1
HvMLO1

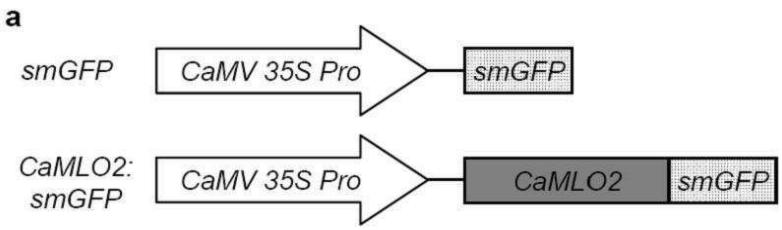
도면3


a
b
AtMLO2
BrMLO1
AtMLO6
AtMLO12
VvMLO17
CaMLO1
CaMLO2
LeMLO1
HvMLO1
HvMLO
OsMLO
OsMLO-h1
AtMLO5
AtMLO9
AtMLO8
AtMLO7
AtMLO10
AtMLO3
AtMLO13
AtMLO1
AtMLO15
AtMLO4
AtMLO11
AtMLO14
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
453 ATALKKWHHTAKNETKHGR 471
453 ATALKKWHHTAKKQTKHGR 471
450 ATALKSWHHTAKKNIKHGR 468
444 ANALKKWHHTAKKQTKHGH 462
412 ATALRSWHQAARKHTKHGR 430
445 ATALRKWHHGAKKHIKEIN 463
413 ATALRSWHNTAKKRVRHGR 431
407 ATALRSWHHTAKKRVKHGL 425
442 AKALTNWRKMAKEKKKARD 460
417 SKALTNWRNTAKEKKKVRD 435
443 MKALMNWRKKAMEKKKVRD 461
470 MKALMNWRKTAREKKKLRD 488
437 SKALKNWHKNAKKKSETPG 455
444 SKALEQWHKKARKKNEK--460
468 SKALKKWRMAVKKKKGVKA 486
452 AKALKKWHKDIKLKKGKAR 470
450 AKALKKWHMTVKKKKGKAR 468
439 ANVLRHWQGMVRDKKKTIQ 457
438 QSTLEGWLEDTRNRGESTS 456
450 QVGLVGWAQKVKQKRDLKA 468
436 QEHLVGWAKMAKRGVKKGA 454
437 RDSLHSWCKRVKERSKHTR 455
449 RETIRGWGKATRRKRRHGL 467
444 RETINGWGKATRRKRRHGL 462

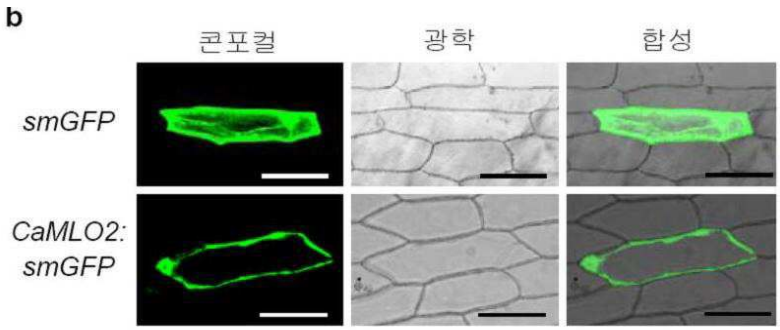
도면4


1 mM CaCl2
10 mM EGTA
GST-CaMBD
GST-CaMBD
fraction
fraction
GST
1 2 3
GST
1 2 3
Biotin-CaM overlay
GST 안티바디

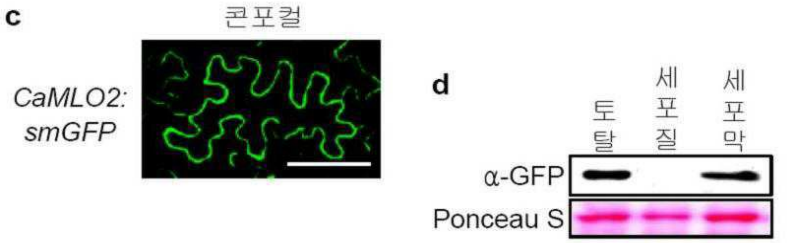
도면5a


a
smGFP
CaMV 35S Pro
smGFP
CaMLO2: smGFP
CaMV 35S Pro
CaMLO2
smGFP

도면5b



도면5c



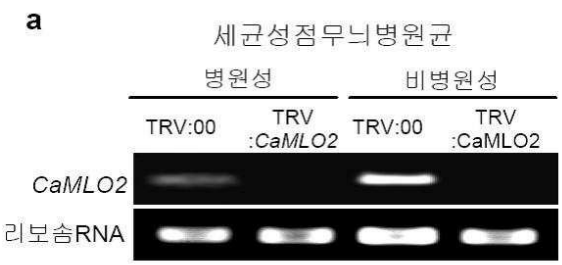
도면6a



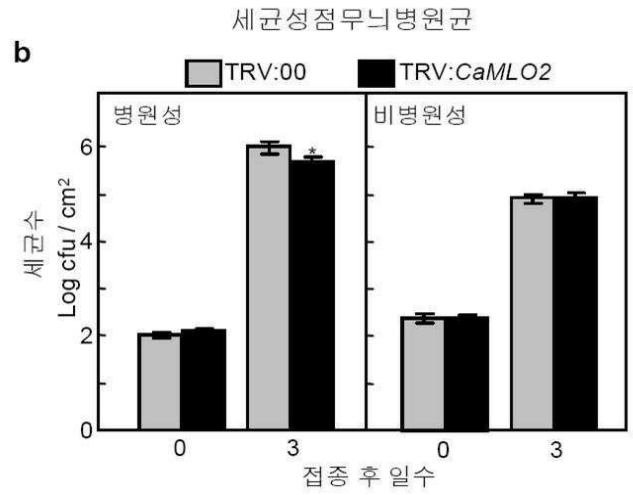
도면6b



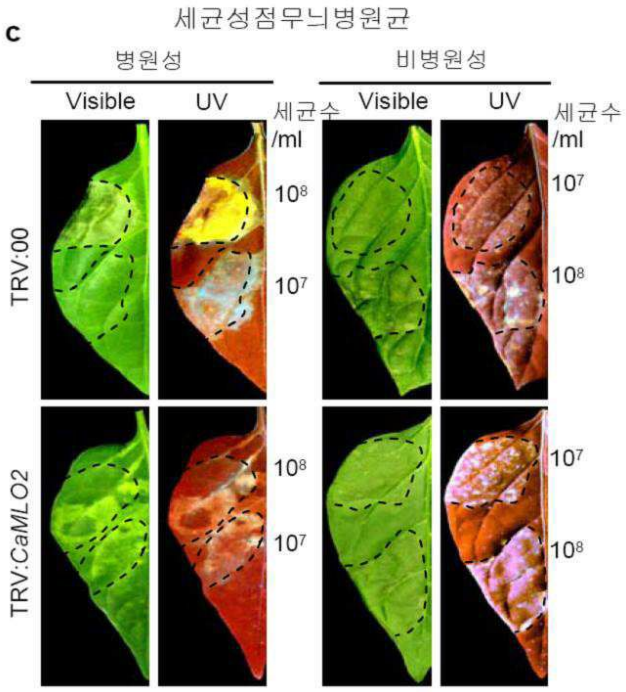
도면7a



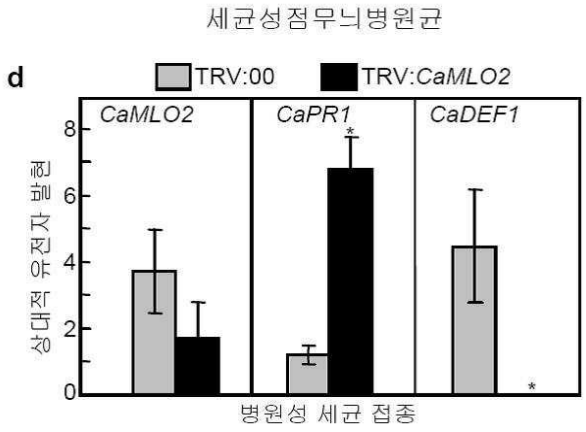
도면7b


세균성점무늬병원균
b
TRV:00
TRV:CaMLO2
병원성
비병원성
세균수
Log cfu / cm²
6
4
2
0
*
0
3
0
3
접종 후 일수

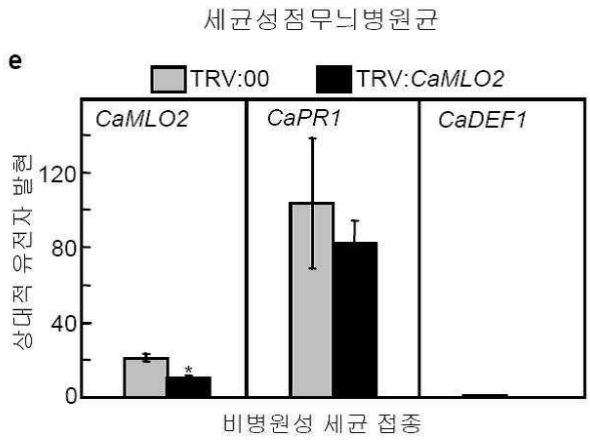
도면7c


세균성점무늬병원균
c
병원성
비병원성
Visible
UV
Visible
UV
세균수
/ml
세균수
/ml
TRV:00
TRV:CaMLO2
10⁸
10⁷
10⁷
10⁸
10⁸
10⁷
10⁷
10⁸

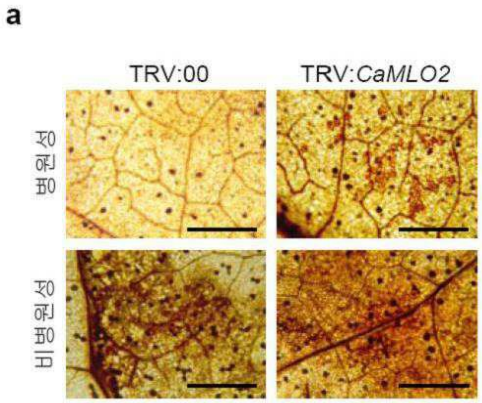
도면7d



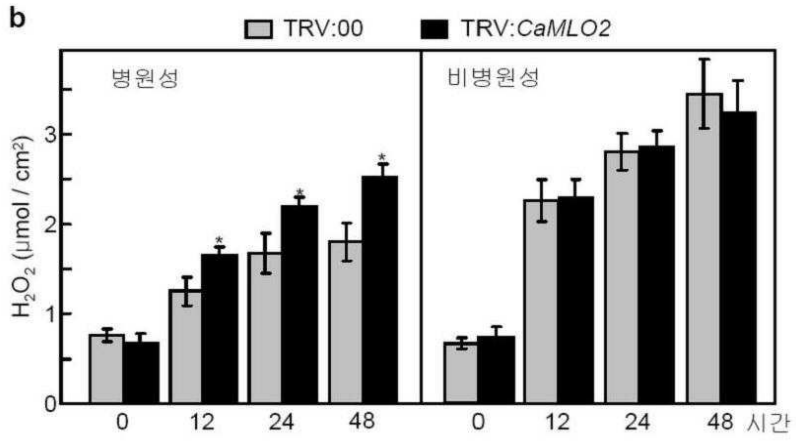
도면7e



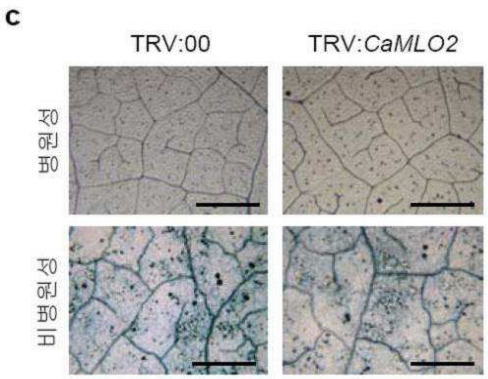
도면8a



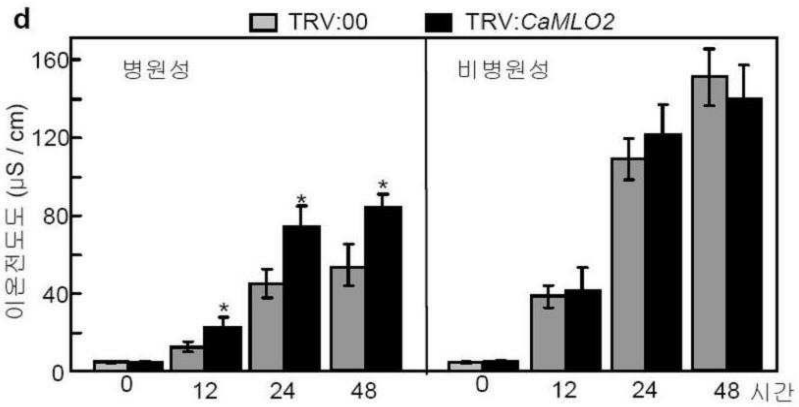
도면8b



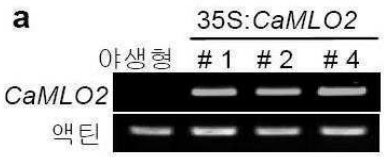
도면8c



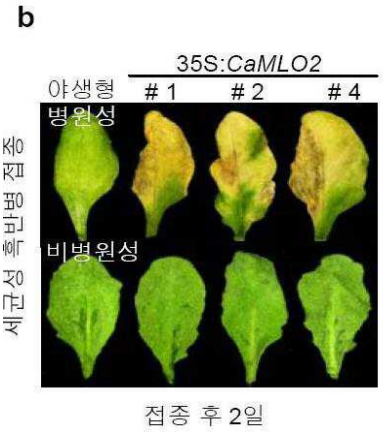
도면8d



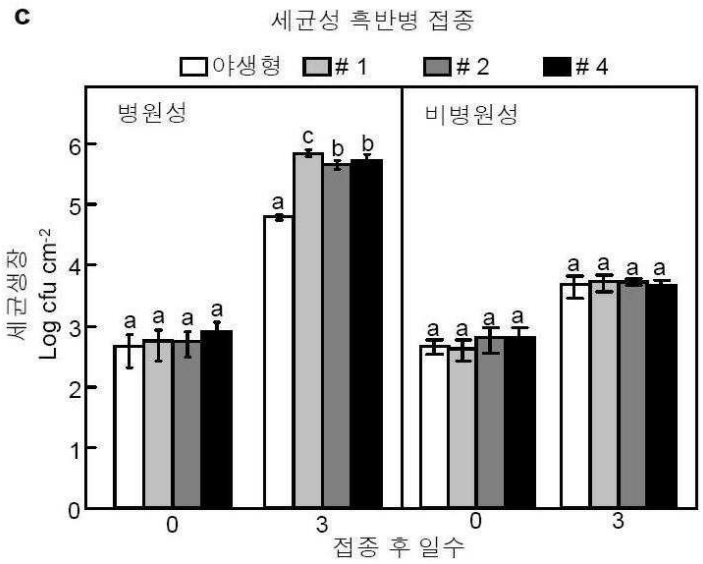
도면9a



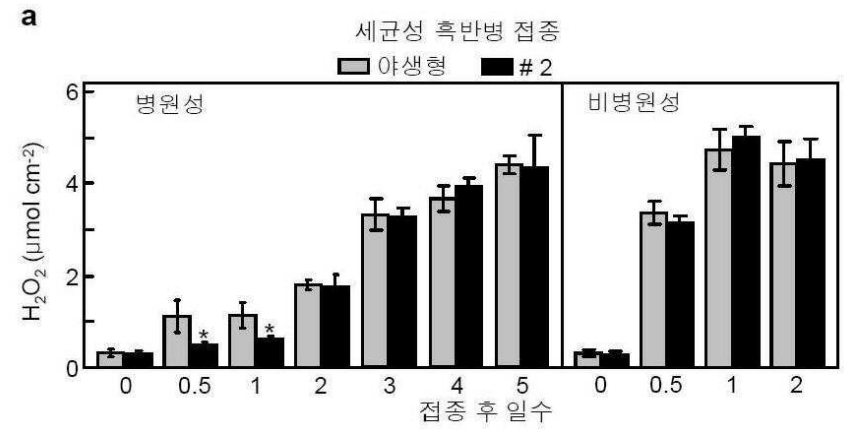
도면9b



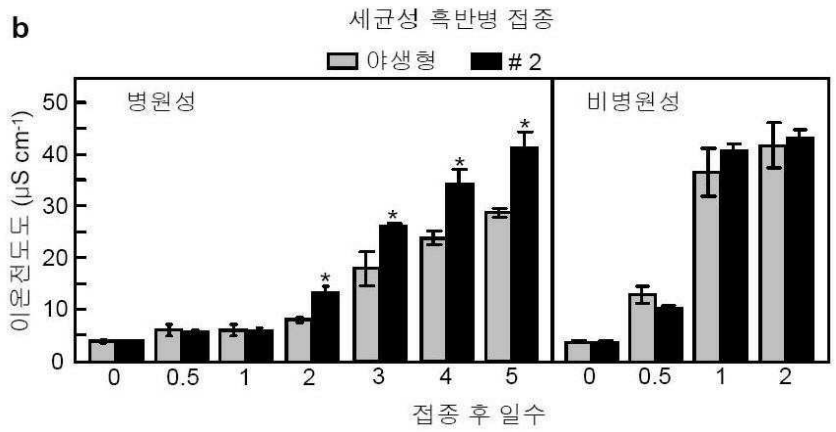
도면9c



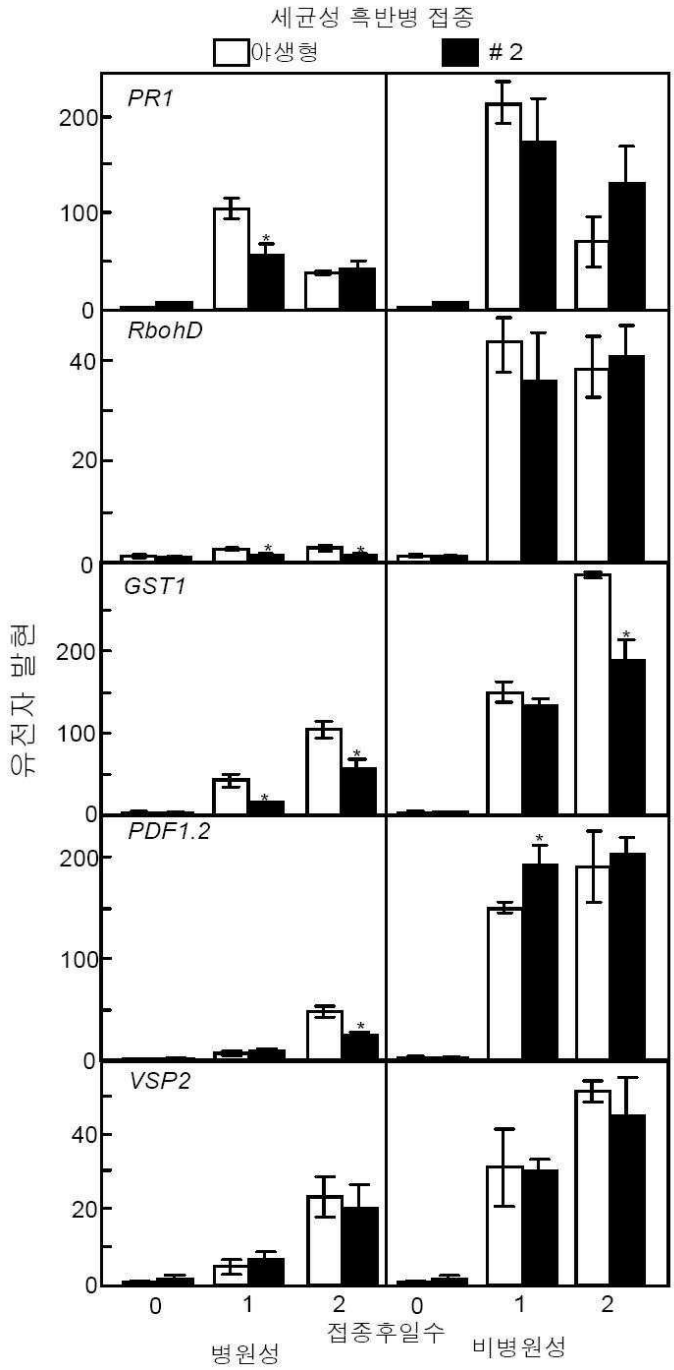
도면10a



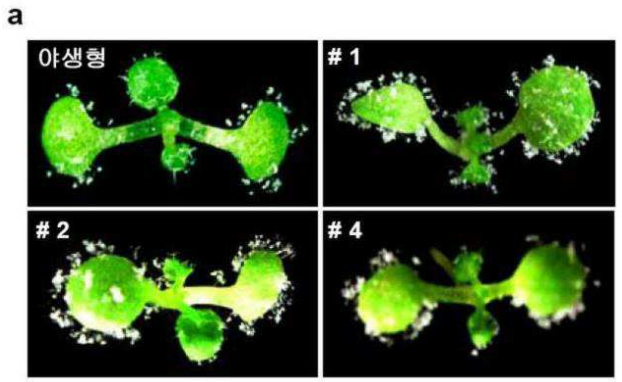
도면10b


b
세균성 흑반병 접종
야생형
#2
병원성
비병원성
이온전도도 (μS cm-1)
50
40
30
20
10
0
0
0.5
1
2
3
4
5
0
0.5
1
2
접종 후 일수

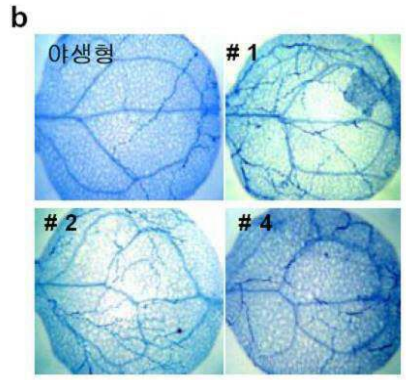
도면11


세균성 흑반병 접종
야생형
#2
PR1
RbohD
GST1
PDF1.2
VSP2
유전자 발현
200
100
0
40
20
0
0
1
2
0
1
2
병원성
접종후일수
비병원성

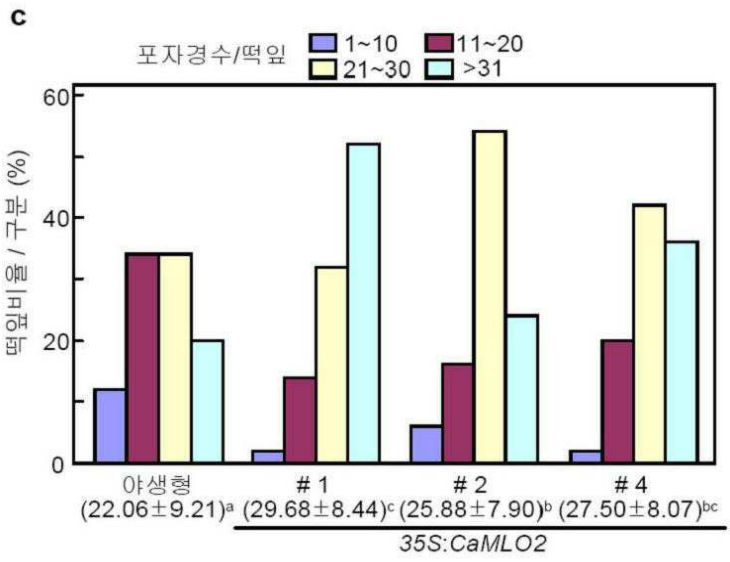
도면12a



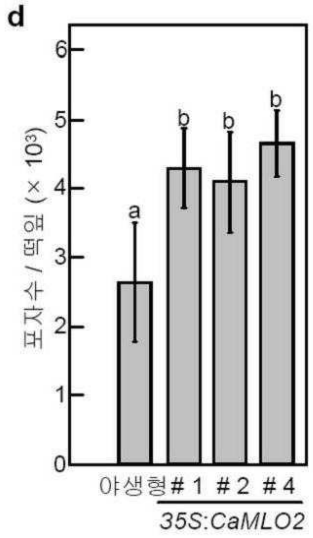
도면12b



도면12c



도면12d



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Disease resistance-related Mildew resistance Locus O 2 protein gene CaMLO2, plant resistance screening, and transgenic plants using the same

<130> P11-111123-02-CaMLO2

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1885

<212> DNA

<213> Capsicum annnuum L. cv. Nockwang

<400> 1

caatcattgt gtaaaggaat agcttatact tttatcttca atcgtgtaaa gaaagaaaca 60

acaaaatcat ttttgttctt ctcaaggaaa attctctatc agaattaatt gatggctaaa 120

gaacggtcga tggaggcaac ccctacgtgg gcggttgccg tggtttgctt catcttgctg 180

gctatttcca tttttattga acaaattatg catcaccttg gagagtggtt gttgaaaaaa 240

cacaaaaagc ctctatacga agcacttgaa aagatcaaag cagagcttat gttgttggga 300

ttcatatcat tgttgttgac agtgatacaa gacccagttt ctaacttatg tgtccccaaa 360

agtgttggtt attcctggca tccttgtaag gcagatgaag atgtcaagtc tgagtatgat 420

gacccttgtt tacaaaaggg aaaagttcaa tttgcatctt catatgcaat acaccagctc 480

catatcttca tctttgtgtt ggcaattgcg catgttttgt actgtatagc aacttttgct 540

ttggggaggt taaagatgag aaaatggagg gcctgggagg atgaaacaaa aacaattgag 600

taccaattct ataacgaccc tgagaggttt aggtttgcaa gggagacctc atttggacgt 660

aggcatatgc atttttggag caagtcgccg gtgatgctct ggatagtttg tttcttcagg 720

caattctttt catcagtagc aaaagttgac tatttaaccc ttagacatgg gttcatgatg 780

gcacatttaa caccacagaa tcaagagaac tttgattttc aaatatacat taatagagca 840

gttgacaaag atttcaaagt tgtcgtggga ataagtccag cattatggct cttcacggta 900

ttatattttc tatccaccac cgatggagtt tactcgtatc tttgggttcc atttgtccca 960

ctcattataa tattgttggt tgggacaaaa cttcaaatga tcataacaga aatgggggtt 1020

agaatttcag aaaggggaga catagtgaaa ggtgtaccag tggtggagat cggtgaccat 1080

cttttctggt ttaatcgccc tggccttgtg cttttcttca ttaactttgt cctctttcag 1140

aatgcgtttc aagttgcttt ctttgtttgg agttggtgga aatttggttt tccatcctgc 1200

tttcatagaa atgctgcaga cctagccatt aggctaacca tgggagtaat catacaagtc 1260

cattgcagct atgtaactct ccctctatat gccttagtta ctcagatggg ttcatcaatg 1320

aagcctatca tctttggtga taatgtggca acagctctta gaagctggca caatacagcg 1380

aaaaagcggg tgagacatgg gcgggtatca gaaaacacca ctccgatatc tagcagaccg 1440

gccacaccat tgcgtggtac ctccccagtt cacttgctac gtggctaccc aaaatataac 1500

gaggacaatg ttcaagcata tcctcgaaca tcgaatgtag aaaatgaagg ctgggctaat 1560

gaaacatcca ctgagaataa agatcatcag gaggagggac aaatcctgca gcatgcctcc 1620

acttctatgc aacatccgca tactgatcaa catcaaattg agattgcaat gtcagatttt 1680

acttttggaa acaaatagat caattgatca tctagtctcc atatgttaaa acttccatct 1740

tcattgtttt ctttgtctcg agttcattac tgtagagaat accgtcttca ttgtttcctt 1800

tgtttcgagt tctttactgt agagaatata tgtatatgtg tgtgtatata tatatatata 1860

tttatataaa aaaaaaaaaa aaaaa 1885

<210> 2

<211> 528

<212> PRT

<213> Capsicum annnuum L. cv. Nockwang

<400> 2

Met Ala Lys Glu Arg Ser Met Glu Ala Thr Pro Thr Trp Ala Val Ala

1 5 10 15

Val Val Cys Phe Ile Leu Leu Ala Ile Ser Ile Phe Ile Glu Gln Ile
20 25 30
Met His His Leu Gly Glu Trp Leu Leu Lys Lys His Lys Lys Pro Leu

35 40 45
Tyr Glu Ala Leu Glu Lys Ile Lys Ala Glu Leu Met Leu Leu Gly Phe
50 55 60
Ile Ser Leu Leu Leu Thr Val Ile Gln Asp Pro Val Ser Asn Leu Cys
65 70 75 80
Val Pro Lys Ser Val Gly Tyr Ser Trp His Pro Cys Lys Ala Asp Glu
85 90 95
Asp Val Lys Ser Glu Tyr Asp Asp Pro Cys Leu Gln Lys Gly Lys Val
100 105 110

Gln Phe Ala Ser Ser Tyr Ala Ile His Gln Leu His Ile Phe Ile Phe
115 120 125
Val Leu Ala Ile Ala His Val Leu Tyr Cys Ile Ala Thr Phe Ala Leu
130 135 140
Gly Arg Leu Lys Met Arg Lys Trp Arg Ala Trp Glu Asp Glu Thr Lys
145 150 155 160
Thr Ile Glu Tyr Gln Phe Tyr Asn Asp Pro Glu Arg Phe Arg Phe Ala
165 170 175
Arg Glu Thr Ser Phe Gly Arg Arg His Met His Phe Trp Ser Lys Ser

180 185 190
Pro Val Met Leu Trp Ile Val Cys Phe Phe Arg Gln Phe Phe Ser Ser
195 200 205
Val Ala Lys Val Asp Tyr Leu Thr Leu Arg His Gly Phe Met Met Ala
210 215 220
His Leu Thr Pro Gln Asn Gln Glu Asn Phe Asp Phe Gln Ile Tyr Ile
225 230 235 240
Asn Arg Ala Val Asp Lys Asp Phe Lys Val Val Val Gly Ile Ser Pro
245 250 255

Ala Leu Trp Leu Phe Thr Val Leu Tyr Phe Leu Ser Thr Thr Asp Gly

260 265 270

Val Tyr Ser Tyr Leu Trp Val Pro Phe Val Pro Leu Ile Ile Ile Leu

275 280 285

Leu Val Gly Thr Lys Leu Gln Met Ile Ile Thr Glu Met Gly Val Arg

290 295 300

Ile Ser Glu Arg Gly Asp Ile Val Lys Gly Val Pro Val Val Glu Ile

305 310 315 320

Gly Asp His Leu Phe Trp Phe Asn Arg Pro Gly Leu Val Leu Phe Phe

325 330 335

Ile Asn Phe Val Leu Phe Gln Asn Ala Phe Gln Val Ala Phe Phe Val

340 345 350

Trp Ser Trp Trp Lys Phe Gly Phe Pro Ser Cys Phe His Arg Asn Ala

355 360 365

Ala Asp Leu Ala Ile Arg Leu Thr Met Gly Val Ile Ile Gln Val His

370 375 380

Cys Ser Tyr Val Thr Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Val Thr Gln Met Gly

385 390 395 400

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

405 410 415

Arg Ser Trp His Asn Thr Ala Lys Lys Arg Val Arg His Gly Arg Val

420 425 430

Ser Glu Asn Thr Thr Pro Ile Ser Ser Arg Pro Ala Thr Pro Leu Arg

435 440 445

Gly Thr Ser Pro Val His Leu Leu Arg Gly Tyr Pro Lys Tyr Asn Glu

450 455 460

Asp Asn Val Gln Ala Tyr Pro Arg Thr Ser Asn Val Glu Asn Glu Gly

465 470 475 480

Trp Ala Asn Glu Thr Ser Thr Glu Asn Lys Asp His Gln Glu Glu Gly

485 490 495

Gln Ile Leu Gln His Ala Ser Thr Ser Met Gln His Pro His Thr Asp

500 505 510

Gln His Gln Ile Glu Ile Ala Met Ser Asp Phe Thr Phe Gly Asn Lys

515 520 525