



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0025843

(43) 공개일자 2007년03월08일

(21) 출원번호 10-2005-0082413

(22) 출원일자 2005년09월05일

심사청구일자 2005년09월05일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 백경희
서울 강남구 대치동 66 쌍용아파트 3-1411
김기정
경북 안동시 서부동 77-3번지
박창진
서울 동대문구 제기1동 한신아파트 103-1504
함병국
서울 서초구 반포동 삼호가든 4차 맨션 라동 808호
최수복
충남 공주시 계룡면 경천리 605-2번지 상보안농원
이부자
대구 달서구 월성동 영남아파트 101-1201

(74) 대리인 이원희

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 담배 모자이크 바이러스에 대한 병저항성 반응에서 그 발현이 증가되는 고추 유래 세포질내 파이루베이트 카이네이즈

(57) 요약

본 발명은 담배 모자이크 바이러스(*Tobacco mosaic virus*)에 대한 과민성 반응에서 발현이 증가되는 고추 유래 세포질내 피루브산 키나제(cytosolic pyruvate kinase)에 관한 것으로 *CaPKC ϵ* 은 상기 바이러스에 대항하는 식물의 방어 신호 반응 전달 과정의 규명과 이를 이용한 병저항성 유용 작물의 제작 및 과민성 반응과 관련된 식물의 질환을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1a

특허청구의 범위

청구항 1.

식물체 바이러스 또는 스트레스 저항성 신호 전달 경로에 관여하는 고추 유래 피루베이트 카이네이즈를 코딩하는 하기 (a) 내지 (c) 중의 어느 하나의 DNA.

(a) 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 코딩하는 DNA;

(b) 서열번호 1로 기재된 DNA; 및

(c) 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열에서 하나 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 코딩하는 DNA.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 스트레스는 바이러스성 또는 화학성 스트레스인 것을 특징으로 하는 DNA.

청구항 3.

제 1항의 DNA에 의해 인코딩되는 고추 유래 파이루베이트 카이네이즈.

청구항 4.

제 3항의 고추 유래 파이루베이트 카이네이즈의 발현 정도를 비교하여 식물의 항바이러스제를 스크리닝하는 방법.

청구항 5.

제 1항의 유전자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 발현 벡터가 도입된 형질전환 식물체 세포.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 형질전환된 식물세포를 포함하는 형질전환 식물체.

청구항 8.

i) 제 1항의 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;

ii) 상기 발현 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 단계;

iii) 상기 아그로박테리움과 식물 세포를 공동 배양하여 식물 세포를 형질 전환시키는 단계; 및

iv) 상기 형질전환된 식물세포를 조직 배양하여 재분화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 병저항성이 유도된 형질 전환 식물체의 제조 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

식물은 여러 가지 방어 기전을 활성화하여 스스로를 병원균의 공격으로부터 방어한다. 과민성 반응(hypersensitive reaction: HR)은 가장 효율적이고 즉각적인 저항 반응인데, 이 반응은 병원균이 침투된 부위에서 세포들이 부분적으로 신속하게 사멸되는 것으로 특징화된다(Lamb et al., *Cell*, 1989; Dangl et al., *Plant Cell*, 1996). 이러한 신속한 세포 반응은 무독화된(avirulent) 병원균의 인식 및 고도로 조절된 신호 전달 경로의 활성화에 의해 유발된다(Martin, *Curr Opin Plant Biol*, 1999; Ellis, *Curr Opin Plant Biol*, 2000). 병원균은 살리실산(Salicylic acid: 이하 "SA" 라 칭함) 및 에틸렌(ethylene: 이하 "ET" 라 칭함) 같은 저분자량 분자 생산을 유도하는데, 상기 분자들은 식물 내 다수의 독립적 또는 비독립적 생화학 대사 경로를 유도하는 신호로 작용한다. 그 결과 과민성 반응, 방어벽 형성 증진 및 질병 저항에 도움이 되는 병원성 관련(Pathogenesis-related : PR) 단백질 같은 합성물이 생성된다.

병원균에 감염된 동안 식물체에 축적되는 SA, ET 및 자스몬산(jasmonic acid) 등과 같은 식물 신호물질(signal)은 방어 반응 경로의 중요 성분으로 알려져 있다(Dong, *Curr Opin Plant Biol*, 1998; Dempsey, *Crit Rev Plant Sci*, 1999; Reymond and Farmer, *Curr Opin Plant Biol*, 1998; Pieterse and van Loon, *Trends Plant Sci*, 1999; Penninckx et al., *Plant Cell*, 1998). 다수의 병원성 관련(pathogenesis-related:PR) 유전자들도 병원균 감염 결과 식물체 내에서 증가하는 하나 또는 복수의 상기 신호전달 분자들에 의해 조절된다(Malamy et al., *Science*, 1990; Thomma et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998). 많은 보고에 의하면, 유전적, 생화학적 다양한 현상이 서로 다른 경로들-상호 길항적 반응의 협동적 조절이 가능할 수 있는 경로들-사이의 커뮤니케이션을 위해 존재하는 것으로 알려졌다(Maleck and Dietrich, *Trends Plant Sci*, 1999; Feys and Parker, *Trends Genet*, 2000).

고추에 감염되어 피해를 입히는 바이러스로는 오이 모자이크 바이러스(CMV), 감자 바이러스X(PVX) 및 담배 모자이크 바이러스(*Tobacco mosaic virus*:이하 "TMV"라 칭함)등이 있는데, 이중 TMV는 막대형으로 크기는 300×18nm 이다. 상기 바이러스는 종자전염 또는 접촉전염으로 전염되고 자연 감염 숙주가 전염원으로 항상 주위에 있어서 발병이 잘된다. TMV에 감염된 고추는 모자이크 현상이 나타나며 새로 나온 잎이 황색으로 되는 때도 있으나 일반적으로 생육이 왕성한 여름에는 병징이 잘 나타나지 않고 줄기, 잎자루, 잎 등에 갈색 반점이 나타나기도 하며 심하면 잎과 꽃눈이 떨어지고 잔가지가 고사한다.

Pyruvate kinase(이하 "PK"라 칭함)는 당분해 경로의 중요 조절 효소로서, 기질인 Phosphoenolpyruvate(PEP)와 결합하여 PEP에서 ADP로 Pi의 비가역적 전이를 촉매하여, pyruvate와 ATP를 산출한다. 상기 효소는 식물, 아메바 및 박테리아에서 거의 유사하다고 보고되었다. PK는 생물 및 조직 타입에 따라 여러 가지 다른 동질효소(isozyme)로 존재한다. 모든 진핵세포에서 PK는 세포질에 위치하지만, 관식물과 녹조류의 PK는 세포질 PK(PKc)와 색소체 PK(PKp) 동질효소로 존재하는데, 이들은 각각의 물리적, 면역학적 및 동적/조절 특성이 두드러지게 다르다. PKc는 다양한 생합성 대사과정과 미토콘드리아 호흡을 위한 pyruvate 전구체를 생성하는 중요역할을 하고, PKp는 여러 색소체 생합성 대사과정을 위한 pyruvate와 ATP 공급과정의 중요한 역할을 한다. PK는 모든 생명체의 탄소 및 질소 메카니즘의 중개역할을 하는 중요 효소로 작용하지만 스트레스에 의한 식물의 방어 신호 전달 경로에서의 작용은 아직 보고된 바 없다.

본 발명자들은 고추에서 최초로 분리된 PK(이하 "*CaPK_cI*" 라 칭함)가 *C. annuum* cv. Bugnag과 TMV-P₀ 사이의 과민성 반응시 특이적으로 발현이 유도됨을 확인하였고, 상기 단백질이 생물 또는 화학성 유도제 및 상처를 포함하는 다양한 스트레스에도 발현이 유도됨을 확인하여, 고추 유래 *CaPK_cI*이 SA/MeJA/에틸렌 의존 바이러스 방어 신호 전달 경로에 관여함을 확인함으로 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 주된 목적은 고추에서 유래한 것으로서, 식물체의 바이러스 방어 신호 전달 경로에 관여하는 PK를 암호화하는 DNA 및 단백질을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 고추 유래의 식물체 바이러스 방어 신호 전달 경로에 관여하는 PK를 암호화하는 DNA를 제공한다.

또한 상기 DNA에 의해 암호화되는 식물체의 바이러스 방어 신호 전달 경로에 관여하는 PK 단백질을 제공한다.

또한 방어 신호 전달 조절제로서 PK의 새로운 용도를 제공한다.

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

본 발명은 서열번호 1로 기재되는 *CaPK_c1* 유전자, 그 상동형 유전자(homologs) 및 그 변이형 유전자(variants)를 제공한다. 또한 본 발명은 서열번호 2로 기재되는 *CaPK_c1* 단백질 또는 변이형 단백질(variants)을 제공한다. 상기 *CaPK_c1* 유전자의 "상동형 유전자(homologs)"는 서열번호 2로 기재되는 *CaPK_c1* 단백질에 대한 코딩서열을 포함하는 유전자를 뜻한다. 따라서 상동형 유전자의 범주에는 발현시 서열번호 2로 기재되는 *CaPK_c1* 단백질을 생산할 수 있는 모든 종류의 유전자가 포함된다. 상기 *CaPK_c1* 단백질의 "변이형 단백질(variants)"은 서열번호 2로 기재되는 *CaPK_c1* 단백질 중 하나 이상의 아미노산 잔기를 결실, 부가, 삽입 또는 치환시킨 단백질을 의미하며, 상기 *CaPK_c1* 유전자의 "변이형 유전자(variants)"는 *CaPK_c1* 단백질의 변이형 단백질을 코딩하는 모든 유전자를 의미한다. 상기 *CaPK_c1* 단백질의 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것이 바람직하며, 상기 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하다.

바이러스를 접종한 고추에서 과민성 반응이 일어날 때 발현이 증가하는 유전자를 마이크로어레이 방법으로 분리하였다. 과민성 반응에서 마이크로어레이 결과 다른 유전자와 비교했을 때 2배 이상의 발현이 증가하는 것들을 중점적으로 선택하였다. 고추 cDNA 라이브러리(Park et al., *Plant Mol Biol*, 2002)에서 기존 PK 서열로부터 디자인한 서열번호 3 및 4로 기재되는 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction: 이하 "PCR"이라 칭함)을 통해 cDNA 부분 단편(partial cDNA)을 증폭하고, 상기 cDNA를 pGEN-T 벡터에 삽입한 후 서열을 결정하였다. 전체길이 *CaPK_c1* cDNA는 서열번호 5 및 6으로 기재되는 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 증폭하였다. 서열 결정 결과 전체 cDNA 서열은 서열번호 1번으로 기재되는 1,536bp였으며, *CaPK_c1*으로 명명하였다. 상기 *CaPK_c1* 유전자는 서열번호 2로 기재되는 *CaPK_c1* 단백질을 코딩하는 것을 확인하였다(도 1a 참조). *CaPK_c1*의 아미노산 서열은 다양한 식물의 PK와 높은 상동성을 보인다(도 1b 참조).

*CaPK_c1*의 지놈 조직(genomic organization)을 조사하기 위하여 *Capsicum annuum* cv. Bugang에서 게놈 DNA를 분리하여 제한효소 *Eco*RI (E), *Hind*III(H) 및 *Xba*I (X)으로 절단하여 서던 블롯을 수행하였다. 그 결과 *CaPK_c1* cDNA 탐침과 하이브리드하는 단일 밴드가 측정되었다(도 2 참조). 이를 통해 *CaPK_c1*이 고추 지놈에서 단일 카피로 존재함을 알 수 있다.

*CaPK_c1*이 식물의 방어 신호 전달 경로에 관여하는지 확인하기 위해 다양한 종류의 생물 또는 화학성 스트레스에 대한 상기 유전자의 발현을 측정하였다.

우선적으로 바이러스 또는 병원균 침입에 의한 과민성 반응시 고추에서의 *CaPK_c1*의 발현 유도를 조사하였다. 본 발명을 위해 TMV-P₀에 저항성이며, TMV-P_{1,2}에 감수성인 고추 *Capsicum annuum* L cv. Bugang을 사용하였다. 고추에 TMV-P₀ 및 TMV-P_{1,2}를 접종한 후 *CaPK_c1*의 3'-UTR을 탐침으로 사용하여 노던 블롯을 수행했을 때, *CaPK_c1*의 발현은 TMV-P_{1,2} 접종 및 모조 접종의 모든 시간대에서 탐지되지 않았다. 대조적으로 같은 조건에서 TMV-P₀ 접종 후 24시간대부터 *CaPK_c1*의 발현을 측정할 수 있었다(도 3a 참조). 양성대조군으로, 고추에서 유래한 병원성 연관 단백질(Pathogenesis-related protein:PR) 유전자인 *CaPR-1*의 발현 패턴을 조사하였다(Kim and Hwang, *Physiol*

Plantarum, 2000). *CaPR-1* 유전자의 강한 발현 유도는 48시간대와 72시간대에서 관찰되었는데, 이는 TMV 접종에 의한 과민성 반응에서 *CaPK_c1*의 발현이 양성 대조군인 *CaPR-1*과 같이 유도되며, 양성대조군보다 더 빠른 시간에 발현이 유도됨을 보여준다. 고추 더듬이병균(*Xanthomonas campestris* cv. *vesicatoria*(이하 "*Xcv*"라 칭함)) 접종시 *CaPK_c1*의 발현을 측정하기 위해, *Capsicum annuum* cv. Early Calwonder(이하 "ECW"라 칭함)와 Early Calwonder-20R(이하 "ECW-20R"이라 칭함)에 각각 접종하고 RNA를 분리하여 노던 블롯을 수행하였다. ECW는 *bs2* 유전자를 포함하며, ECW와 근동질 유전자계통인 ECW-20R은 *Bs2*의 우성대립형질을 포함하고 있어 *Xcv*종의 *avrBs2* 병원성 유전자에 대항하는 저항성을 가진다(Tai et al., *T Urol*, 1999). 노던 블롯 결과 *CaPK_c1*은 ECW와 ECW-20R에 접종 후 3시간대부터 동시에 축적이 시작되었고, 강한 발현 패턴은 감수성 ECW와 저항성 ECW-20R에서 모두 비슷하게 유지되었다(도 3b 참조). 상기 결과를 통해 박테리아 침입에 의한 과민성 반응시 *CaPK_c1*의 특이 발현은 유도되지 않으며, 오직 바이러스 유도성 방어 반응에만 기능함을 알 수 있다.

본 발명에서는 다양한 화학물질과 상처에 대한 반응에서 *CaPK_c1*의 발현 패턴을 측정하였다. 살리실산(salicylic acid: 이하 "SA"라 칭함), 에틸렌(ethylene: 이하 "ET"라 칭함) 및 자스몬산(Jasmonic acid: 이하 "JA"라 칭함)은 병원체 침입 후 병 저항성 신호 전달 과정 중 이차 신호전달자로 활동하면서 많은 방어-관련 유전자들의 발현을 유도한다(Cheng and Shopkey, *Curr Opin Plant Biol*, 1999; Reymond and Farmer, *Curr Opin Plant Biol*, 1998; Yang et al., *Gene Dev*, 1997). 상기 화학성 유도제를 고추에 처리하여 시간대별로 채취하고 RNA를 분리하여 노던 블롯을 수행하였다. 고추에 10mM SA를 분무했을 때, *CaPK_c1*과 양성 대조군 *CaPR-1*이 동시에 발현이 증가하며, *CaPK_c1*의 발현 유도 시간이 *CaPR-1*과 비교했을 때 더 빠르다는 것을 알 수 있었다(도 4a-a 참조). 메틸 자스몬산(Methyl jasmonic acid: 이하 "MeJA"라 칭함)을 고추에 분무했을 때의 *CaPK_c1*의 발현을 측정하기 위해, 100μM MeJA를 SA 처리 방법대로 처리하고 RNA를 분리하여 노던 블롯을 수행하였다. MeJA 처리시 발현이 유도되는 *proteinase inhibitor II* (*CaPin II*)를 양성 대조군으로 사용하였다. 그 결과 *CaPK_c1*이 자스몬산 자극에 의해 발현이 유도됨이 측정되었다(도 4a-b 참조). ET-유리 화합물 에테폰(ethephon)은 ET를 대신하여 방어 반응의 유도자로 사용될 수 있다(Menelink et al., *Plant Mol Biol*, 1990). 비교를 위해, 에테폰 처리 후 발현 유도되는 *CaPR-1*을 양성 대조군으로 사용하였다. 그 결과 *CaPK_c1*과 *CaPR-1* 모두 발현이 증가하며, *CaPK_c1*의 발현 유도 시간이 *CaPR-1*보다 더 빠르게 유도됨이 측정되었다(도 4b-c 참조).

자연 상태에서 식물은 염 스트레스에 빈번하게 노출된다. 염 스트레스를 받은 식물체에서 *CaPK_c1*의 발현을 측정하기 위해 400 mM NaCl에서 뿌리째 뽑힌 고추 식물체를 처리하였고, 대조군 식물은 상기 고추 식물체를 증류수에 처리하였다. 양성 대조군으로는 비생물성 장애에서 발현이 유도되는 dehydrin을 사용하였다. 그 결과 *CaPK_c1*은 염 스트레스에 의해 12시간대 이후에서 발현이 유도됨을 확인하였다(도 4b-d 참조).

상처를 받은 식물체에서 *CaPK_c1*의 발현을 측정하기 위해 고추 잎사귀를 가위로 절단하고, 국부 스트레스로 인한 *CaPK_c1*의 발현을 측정하기 위해 절단한 잎사귀에서 RNA를 분리하고, 전신 스트레스로 인한 *CaPK_c1*의 발현을 측정하기 위해 절단한 잎사귀의 상위 잎사귀에서 RNA를 분리하여 노던 블롯을 수행하였다. 양성 대조군으로 국부 및 전신 스트레스로 인해 발현이 유도되는 *CaPin II*을 사용하였다. 그 결과 국부 스트레스로 인해 *CaPK_c1*의 발현은 유도되나, 전신 스트레스로 인한 발현은 탐지되지 않았다(도 4b-e 참조). 이를 통해 상처 신호가 식물의 상처를 가하지 않은 구역으로 전달되지 않는 것을 알 수 있다.

상기 결과들을 통해 *CaPK_c1*이 비생물적 스트레스(SA, MeJA 및 에테폰) 또는 염 스트레스 및 상처 스트레스에 의해 특이적으로 발현이 유도됨을 알 수 있고, 식물체의 방어 반응의 신호 전달 경로에 관여하고 있음을 알 수 있다.

모든 진핵 세포에서 PK는 세포질에서 발견되지만, 식물 PK는 색소체에도 위치한다. *CaPK_c1*의 세포 내 분포도를 조사하기 위해, 형광마커인 smGFP를 사용하여 in vivo 표적 실험을 수행하였다. *CaPK_c1*과 smGFP를 융합하고 이를 고추의 원형질체에 주입하였다(도 5a 참조). smGFP 단백질과 *CaPK_c1::smGFP* 융합 단백질은 형광 현미경을 사용하여 세포 내 위치를 확인하였다. 대조군인 smGFP 단백질이 세포질에 분포되었고, 융합 단백질도 고추 원형질체의 세포질에 분포했다(도 5b 참조). 세포 내 공간 또는 세포벽을 표적으로 하는 일부 방어 관련 단백질과는 달리, *CaPK_c1* 단백질은 감염된 잎사귀의 세포질에 독점적으로 합성되는 것으로 보이며, 이는 국부적으로 침입한 병원균을 저항하는 방어 체계를 보조하는 중요한 역할을 할 것으로 보인다. 기존 연구에서는 당분해 효소인 PK도 미토콘드리아와 결합되어 있다고 보고하였다. 당분해 효소와 미토콘드리아 사이의 결합 형성에 의해, 당분해 효소는 고농도의 pyruvate를 직접적으로 미토콘드리아에 공급할 수

있으므로, 미토콘드리아는 pyruvate를 세포 호흡을 위한 기질로 흡수할 수 있다. 그러므로 이 과정은 식물이 에너지 생산을 위한 일반적 당분해 과정보다 적은 양의 ATP를 소모하게 한다. 방어 반응에서의 *CaPK_c1*의 발현 유도는 어떤 스트레스로 인해 많은 에너지가 필요한 고추의 비정상적 상태와 관련이 있다. 병원균이 침입했을 때, 식물은 pyruvate부터 대량의 ATP를 필요로 하며 *CaPK_c1*은 PEP를 pyruvate로 전환시킬 수 있으므로, 식물의 방어 메카니즘에서 에너지 생산의 주반응을 유도할 것으로 추정된다.

본 발명은 *CaPK_c1*의 발현 정도를 비교하여 식물의 항바이러스제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

*CaPK_c1*은 바이러스에 감염시 그 발현양이 특이적으로 증가함으로, 바이러스로 감염된 식물에 실험 대상의 항 바이러스를 처리한 후 발현되는 *CaPK_c1*의 정도를 조사함으로써 식물의 항 바이러스제를 스크리닝 할 수 있다. *CaPK_c1*의 발현 정도는 노던 블롯, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 사용될 수 있다.

또한 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현벡터, 이를 포함하는 형질전환 식물 세포 및 식물체를 제공한다.

본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다. 본 발명의 발현 벡터에 포함되는 유전자는 *CaPK_c1*를 코딩하는 염기서열을 포함하며, 바람직하게는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 포함하는 것이다.

상기 유전자를 삽입하기 위하여 사용되는 벡터로는 일반적인 식물 형질전환용 발현 벡터이면 어느 것이든 무방하나, 본 발명에서는 *CaPK_c1* 유전자를 삽입하기 위한 벡터로 식물 형질전환용 pCAMBIA2300 M2 벡터나 pCAMBIA2300 M2 HA2 벡터 등을 사용할 수 있다.

본 발명은 상기 유전자를 보유하는 형질전환 식물 세포를 제공한다. 본 발명의 벡터가 도입되는 식물 세포는 세포가 식물로 재생될 수 있는 한 특정한 형태로 특별히 제한되는 것은 아니다. 이들 세포는, 예를 들면, 배양된 세포 부유물, 원형질체(protoplast), 잎 절편(leaf section) 및 캘러스(callus)를 포함한다. 발현 벡터는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 방법, 전기천공법(electroporation), 아그로박테리움(*Agrobacterium*)에 의해 매개되는 전달 및 입자 충격(particle bombardment)방법과 같은 공지의 방법에 의하여 식물 세포에 도입될 수 있다.

본 발명은 상기 식물세포를 조직배양 방법으로 재분화시켜 제조되는 병저항성이 유도된 형질전환 식물체를 제공한다. 본 발명의 형질전환 식물을 얻기 위하여 수행하는 조직 배양을 통한 재분화는 일반적인 형질전환 식물체 제조 공정을 통해 수행하는 것이 바람직하다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 식물 재배

본 발명에서는 TMV의 병원성생물 Po에 저항성이며, TMV의 병원성생물 P_{1,2}에는 감수성인 고추(*Capsicum annuum* L cv. Bugang)를 식물 재료로 사용하였다. 두 고추 재배종 즉 Early Calwonder(ECW; *bs1/bs1*, *bs2/bs2*, *bs3/bs3*)와 Early Calwonder-20R(ECW-20R; *bs1/bs1*, *bs2/bs2*, *bs3/bs3*)을 바이러스 접종 또는 화학물질 및 상처 처리에 사용하였다. *Bs* 유전자는 *Xcv*에 의한 박테리아 반점 질병에 저항하는 저항(R) 유전자로 분류된다. 모든 식물은 성장 챔버 또는 온실에서 27°C, 16시간 빛에 노출시키고 8시간 빛으로부터 차단하는 조건에서 재배하였다. 대략 1달된 식물의 건강하고 팽창된 잎사귀를 병원균 접종과 DNA 및 RNA 분리에 사용하였다.

<실시예 2> DNA 분리 및 서열 분석

고추에서 TMV에 의한 과민성 반응시 마이크로어레이(microarray) 방법(Lee *et al.*, *Funct Integr Genomics*, 2004)으로 *CaPK_c1* 유전자를 분리하였다. RNA를 분리한 후, mRNA를 다시 분리하였다(Qiagen, USA). 2μg mRNA에 Cy-3, 또는 Cy-5가 부착되어 있는 dUTP(Amersham Pharmacia Biotech, USA)로 라벨 한 후, Pat Brown 연구소(http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/4_yeast_RNA.html)에서 제공하는 방법을 이용하여 다시 정제하였다. 최종 부피

는 5 μ l를 이용하였고, 이것에 10 μ l의 formamide와 5 μ l 2X hybridization 용액을 함께 혼합하였다. 이 용액은 다시 95 $^{\circ}$ C에서 3분 동안, 42 $^{\circ}$ C에서 16시간 배양된 마이크로어레이 슬라이드에 적용하였다. 이 슬라이드는 Axon GenePix 4000A scanner (Axon, USA)를 이용하여 이미지화되었다. 이미지화된 형광값을 수치로 전환하여 유전자의 발현 양상을 비교하였다. 이 중 다른 유전자보다 2배 이상의 발현 변화를 보이는 유전자를 선별하고 그 중 *CaPK ϵ 1*을 선택하였다. 고추에서 *CaPK ϵ 1*를 분리하기 위해 기존 PK 서열로부터 디자인한 서열번호 3 및 4로 기재되는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응(이하 "PCR"이라 칭함)에 이용하였다. *CaPK ϵ 1* 단백질의 cDNA 부분 단편(partial cDNA)은 합성된 고추 cDNA 라이브러리를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 합성하였다(Park et al., *Plant Mol Biol*, 2002). PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 53 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 40초 과정으로 30번 반복하였다. 증폭된 PCR 생산물은 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동 한 후 DNA가 들어있는 부분의 겔을 오려내어 65 $^{\circ}$ C에서 녹이고, Gel extraction kit(Genemed, JKorea)를 이용하여 분리한 후, 분리된 단편을 용출하여 pGEM-T 벡터(Promega, USA)에 삽입한 후 바이오니아사(Bioneer, Korea)에 의뢰하여 서열을 결정하였다. 전체 길이 *CaPK ϵ 1* cDNA는 서열번호 5 및 6으로 기재되는 프라이머를 제작하여 PCR로 증폭하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 53 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초 과정으로 30번 반복하였다.

서열 결정 결과 *CaPK ϵ 1* cDNA의 핵산 서열의 전체 길이는 단일 open reading frame(ORF)로 1,536 bp이며, 60bp의 5'-untranslated region(UTR) 및 287 bp의 3'-UTR을 포함하여 1,884 bp이다(도 1a 참조). 또한 512 아미노산의 폴리펩티드를 암호화하고 있고, 단백질의 분자량은 56.3 kDa이다. *CaPK ϵ 1*의 아미노산 서열은 다양한 식물에서 유래한 PK와 높은 상동성을 보인다(도 1b 참조). *CaPK ϵ 1*은 *Solanum tyberosum*(X53688), *Citrus sinensis*(DQ083548), *Glycine max*(AY128952), *Lilium longiflorum*(X53688), *Citrus sativa*(XM_474351) 및 *Arabidopsis thaliana*(At5g63680)의 PK와 각각 92%, 81%, 80%, 80%, 82% 및 80%의 상동성을 보인다.

<실시예 3> *CaPK ϵ 1*의 지놈 조직(genomic organization)

고추 게놈 DNA는 *Capsicum annuum* cv.Bygang에서 분리하였고, 제한효소 *Eco*RI (E), *Hind*III(H), 및 *Xba*I (X)으로 절단하였다. 서던 블롯 실험은 전체 길이 *CaPK ϵ 1* cDNA 탐침으로 수행하였다. 고추의 게놈 DNA 분리 방법은 다음과 같다. 고추를 갈아낸 다음 게놈 DNA 용출 버퍼(최종 부피는 400ml에 168g Urea, 25ml 5M NaCl, 20ml 1M Tris-HCl pH 8.0, 16ml 0.5M EDTA pH 8.0, 20ml 20% sarcosine, 190ml 증류수)에 담아 녹여낸 후, 원심분리를 수행하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액에 동일 부피의 에탄올 첨가하여 게놈 DNA 침전물이 생성되면 다시 원심분리하여 증류수에 녹였다. 분리한 게놈 DNA 30 μ g를 상기 제한효소 1U로 37 $^{\circ}$ C로 16시간 동안 절단한 후 0.8% 아가로스겔을 제작하여 전기영동을 수행하였다. 이후 막에 이동시키고 32 P가 라벨된 dCTP를 이용하여 만들어진 탐침으로 고추 지놈에서 *CaPK ϵ 1* 유전자가 몇 카피로 존재하는지 확인하였다. 65 $^{\circ}$ C 고온조건에서, 모든 제한효소는 *CaPK ϵ 1* DNA 탐침과 하이브리드하는 단일 밴드를 형성하였다(도 2 참조). 본 실시예는 3회 반복하였다.

본 실시예의 결과를 통해 *CaPK ϵ 1*이 고추 지놈에서 단일 카피로 존재함을 확인하였다.

<실시예 4> 바이러스 및 병원균 접종에 의한 과민성 반응시 *CaPK ϵ 1*의 발현 조사

1달 된 고추 식물에 *Tobacco mosaic virus*(TMV) P₀, P_{1,2} 또는 *Xanthomonas campestris*(Xcv) 접종은 박 등의 방법으로 수행하였다(Park et al., *Plant J*, 2004). TMV 접종을 위해, 철가루(LeeHyo Bio Science, Korea)를 이용하여 TMV와 함께 붓으로 식물에 발라주면, 철가루에 의해 상처가 난 부분으로 TMV가 침투하는 방식을 택하였다. Xcv의 처리는 Xcv를 28 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 배양한 후 1 $\times 10^7$ /ml가 되도록 주사기를 이용하여 식물에 주입하였다. 고추 잎사귀에서 상기 바이러스를 접종한 후 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간대에서 RNA를 분리하였고, 상기 병원균을 접종한 경우 0, 3, 6, 15, 18 및 24 시간대에서 RNA를 분리하였다. RNA 분리 방법은 다음과 같다. 고추를 갈아낸 다음 RNA 용출 버퍼(최종부피 250ml에 13.5g p-AminoSA, 2.25g 5-Naphthalenedisulfonic acid, 5ml 2-mercaptoethanol)에 담아 녹여낸 후, 원심분리를 수행하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액에 동일 부피의 페놀을 첨가하여 DNA 오염을 막고, 동일 부피의 에탄올을 첨가하여 RNA 침전물이 생성되면 다시 원심분리하여 증류수에 녹였다. 노던 블롯 하이브리디제이션은 32 P-라벨된 *CaPK ϵ 1* cDNA 탐침으로 수행하였다. RNA를 동일하게 0.8% 마가로스겔에 전기영동을 수행하고 막(membrane)(AgenBio, Korea)에 흡착시킨 후 32 P-라벨된 *CaPK ϵ 1* cDNA를 탐침으로 65 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 노던 블롯을 수행하였다. 수행 후 세척 버퍼(0.1% SDS, Sodium citrate, Sodium chloride)를 이용하여 세척하였다. 본 실시예는 각각 3회 반복하였다.

TMV-Po 접종에 의한 *CaPK_c1* 발현 측정에서, *CaPK_c1*은 TMV-P_{1,2} 접종 및 모조(mock) 접종 후 모든 시간대에서 측정되지 않았다. 대조적으로, 같은 조건에서 상기 전사체는 TMV-P₀의 접종 후 12시간대부터 전사체의 축적이 시작되었고 36시간대에서 최고수치에 도달했다. 양성 대조군으로, 고추에서 유래한 병원성 연관 단백질(pathogenesis-related protein:PR) 유전자인 *CaPR-1*의 발현 패턴을 조사하였다(Kim and Hwang, *Physiol Plantarum*, 2000). *CaPR-1*의 강한 발현 유도는 접종 후 48시간대와 72시간대에서 관찰되었다(도 3a 참조).

Xanthomonas campestris(Xcv) 접종에 의한 *CaPK_c1* 발현 조사에서, *CaPK_c1*은 ECW와 ECW-20R 모두에서 발현이 유도됨을 볼 수 있다. 동시에 3시간대에서 전사체 축적이 시작되었고 강한 발현 패턴 또한 감수성 ECW와 저항성 ECW-20R 모두 비슷하게 유지되는 것을 확인하였다(도 3b 참조).

본 실시예 결과를 통해서 고추 식물에서 *CaPK_c1*은 바이러스 유도성 방어 반응에서만 발현이 유도되며, TMV 처리 하에서 *CaPK_c1*의 특이적 발현 유도 패턴은 상기 유전자 생산물이 저항성 식물과 바이러스 병원균 사이의 부적합성 상호방어 반응에 관여함을 알 수 있다.

<실시예 5> 다양한 화학물질과 상처에 대한 반응에서 *CaPK_c1* 유전자 발현 조사

1달된 고추 식물에 10% 에탄올에 용해한 10mM 살리실산(salicylic acid: 이하 "SA"라 칭함) 또는 100 μ M 메틸 자스몬산(methyl jasmonate: 이하 "MeJA"라 칭함)을 분무하였다. 대조군 식물에는 10% 에탄올을 분무하였다. 에테폰(ethephon) 처리는 1달 된 고추 식물에 증류수에 용해한 10mM 에테폰을, 대조군 식물에는 증류수를 분무하였다. 잎사귀는 살리실산과 메틸 자스몬산의 경우 0, 6, 12, 24, 36 및 48 시간대에서, 에테폰의 경우 0, 0.5, 1, 2, 6, 12 및 24 시간대에서 채취하여 액체 질소에 신속하게 냉동시켰고, -80°C에서 보관하였다. sodium chloride(NaCl) 처리를 위해, 뿌리째 뽑은 고추 식물을 400mM NaCl 또는 증류수가 담긴 페트리 디쉬에서 배양하였고, 0, 0.5, 1, 2, 6, 12, 및 24 시간대에서 채취하여 액체 질소로 냉동하였다. 상처를 주기 위해 면도칼로 잎사귀를 10등분으로 평행 절개하였고, 3mm 부분으로 절개하였다. 식물에 상처를 준 후 0, 0.5, 1, 2, 6, 12 및 24 시간대에서 상처를 가한 잎사귀와 상처를 가하지 않은 잎사귀에서 RNA를 추출하였다. 처리 후 고추 잎사귀에서 RNA를 분리하고 실시예 4의 방법과 동일하게 수행하였다. 노던 블롯 하이브리디제이션은 ³²P-라벨된 탐침으로 수행하였고 실시예 3의 방법과 동일하게 수행하였다. 본 실시예는 3회 반복하였다.

고추에 100mM SA를 분무하였을 때, *CaPK_c1*은 분무 후 6시간대에서 발현이 유도되며, 24시간대에 최고수치에 도달한다. 양성 대조군인 *CaPR-1*은 24시간대에서 발현이 유도되며 36시간대까지 지속된다(도 4a-a 참조). *CaPK_c1*과 양성 대조군인 *CaPR-1*이 동시에 발현이 증가하나, *CaPK_c1*의 발현 유도 시간이 대조군과 비교했을 때 빠르게 유도됨이 측정되었다.

고추에 100 μ M MeJA를 분무했을 때, *CaPK_c1*은 6시간대에서 발현되고 24시간대에서 최고수치에 도달한다. 양성 대조군인 *CaPin II* 역시 6시간대에서 강하게 발현되고 시간대가 지나면서 감소되는 양상을 보인다(도 4a-b 참조).

고추에 10mM 에테폰 용액을 분무했을 때, *CaPK_c1*은 12시간대에서 강하게 발현되었고 24시간대에서 감소했다(도 4b-c 참조). *CaPK_c1*은 양성대조군인 *CaPR-1*보다 빠르게 발현이 유도됨을 알 수 있다.

고추에 400mM NaCl에서 재배했을 때, *CaPK_c1*은 처리 후 6시간대에서 발현유도가 증가하고 24시간대에서 강하게 발현이 증가하였다(도 4b-d 참조).

고추에 상처를 가하였을 때, *CaPK_c1*은 2시간대에서 발현이 유도되었고, 24시간대까지 발현이 유지되었다. 국부 상처에서는 *CaPK_c1*의 발현이 증가하나 전신 상처에서는 발현이 탐지되지 않은 것으로 보아 상처 신호가 식물의 상처를 가하지 않은 다른 기관으로는 전달되지 않는 것으로 보인다(도 4b-e 참조).

본 실시예 결과 화학성 스트레스 및 상처 스트레스에 *CaPK_c1*이 특이적으로 발현이 유도되는 것으로 보아 *CaPK_c1*이 다양한 종류의 스트레스에 대한 식물체의 신호 전달 경로에 관여함을 알 수 있다.

<실시예 6> *CaPK_c1::smGFP* 구조체의 제조 및 발현

유전자 특이 올리고뉴클레오티드 서열 7 및 8로 기재되는 프라이머를 이용하여 PCR을 고추 cDNA 라이브러리를 주형으로 수행하였다. 그 결과 *CaPK_c1* cDNA의 종료 코돈이 제거되었다. PCR 증폭 생산물은 soluble modified green fluorescent protein(smGFP) 코딩 구역과 융합하였다(도 5a 참조)(Davis and Vierstra, *Plant Mol Biol*, 1998; Park et al., *Plant Cell*, 2001). 1U T4 라이게이즈(Roche, Germany)를 이용하여 발현 벡터에 DNA를 연결한 후, 대장균과 DNA가 함께 들어 있는 튜브를 1분 30초 동안 42℃에 방치한 후 얼음으로 옮긴다. 그 후 37℃에서 1시간 배양하여, 대장균 내의 융합 단백질을 과다 발현하였다. transient-발현 분석을 위하여, 융합 construct의 플라스미드 DNA(3μg)를 particle gun(PDS-1000/He;Bio-Rad)으로 고추 원형질체에 주입하였다. 녹색 형광 단백질(GFP) 융합 construct의 transient 발현은 고추 원형질체에 PEG-mediated transformation 방법으로 DNA를 주입하여 형광 현미경(Zeiss Axioplan fluorescence microscope, Jena, Germany)으로 조사하였다(Park et al. *Plant J*, 2004). PGE-mediated transformation 방법은 다음과 같다. 실험 튜브에 3μg DNA를 넣은 후 BY-2 세포와 혼합하였다. 그 후 300μl PEG를 넣고 튜브를 가볍게 진동하였다. 본 실시예는 3회 반복하였다.

실시에 결과 smGFP와 *CaPK_c1::smGFP* 융합 단백질 모두 세포질에 분포하고, *CaPK_c1*이 색소체 안에는 분포되지 않음을 확인하였다(도 5b 참조).

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 고추에서 유래한 신규 *CaPK_c1*은 TMV의 침입, 식물체의 방어 신호 분자들, 및 염 또는 상처 스트레스에 의해 발현이 유도되며, 식물체의 세포에서 원형질체에 분포하는 것이 확인됨으로, 상기 단백질은 식물의 방어 신호 전달 조절체로서 사용되고, 식물의 방어 신호 전달 체계를 규명할 수 있고, 상기 단백질이 상기 바이러스에 대항하는 방어 반응이 강화된 식물체 제작에 유용하게 사용될 수 있으며, 상기 유전자 및 단백질은 과민성 반응과 관련된 식물의 질환을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1a는 *CaPK_c1*의 유전자 서열 및 아미노산 서열이고,

도 1b는 *CaPK_c1*과 다른 종의 PK간의 아미노산 서열을 비교한 그림이고,

도 2는 *CaPK_c1*의 유전자를 지노믹 DNA를 서던 블롯 방법으로 분석한 그림이고, E는 *EcoRI* 을, H는 *HindIII*를, X는 *Xba I* 을 나타내고,

도 3은 고추에 바이러스 및 박테리아를 접종했을 때 *CaPK_c1*의 유전자 발현을 측정된 그림으로, a는 TMV-P₀과 TMV-P_{1,2}를 접종했을 때 *CaPK_c1*의 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고, b는 *Xanthomonas campestris*를 접종했을 때 *CaPK_c1*의 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고,

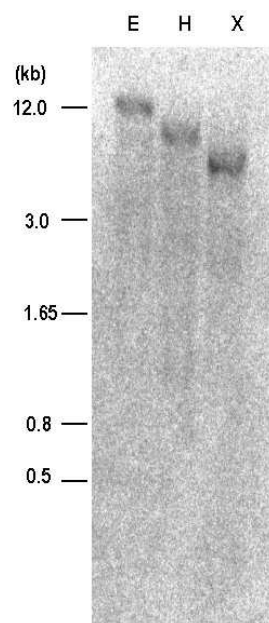
도 4a는 고추에 화학성(chemical) 스트레스를 가하였을 때 *CaPK_c1* 유전자 발현을 측정된 그림으로, a는 살리실산(Salicylic acid)를 처리했을 때 *CaPK_c1*의 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고, b는 메틸 자스몬산(Methyl jasmonic acid)을 처리했을 때 *CaPK_c1*의 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고,

도 4b는 고추에 화학성(chemical)스트레스를 가하였을 때 *CaPK_c1* 유전자 발현을 측정된 그림으로, c는 에테폰(ethephon)을 처리했을 때 *CaPK_c1*의 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고, d는 염(sodium chloride)을 처리했을 때 *CaPK_c1*의 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고, e는 상처를 주었을 때 *CaPK_c1*의 발현을 노던 블롯 방법으로 분석한 그림이고,

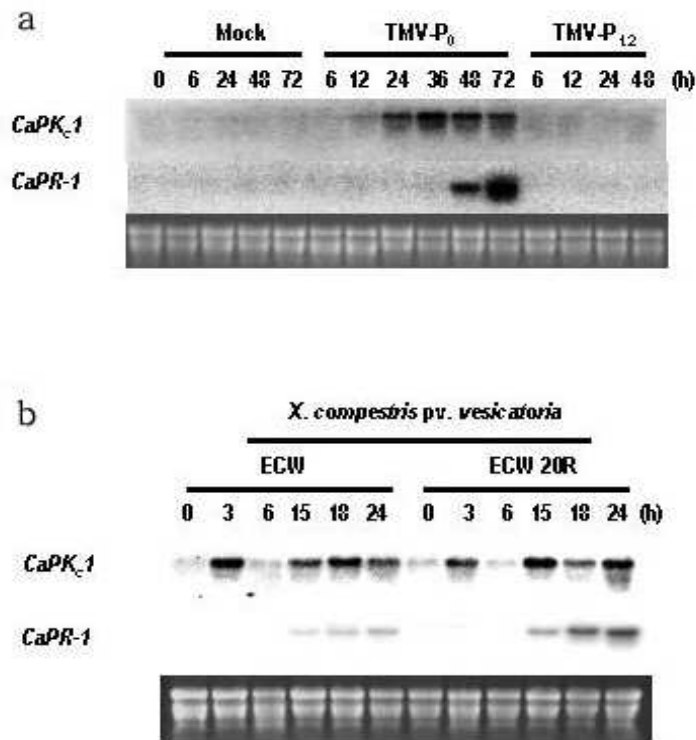
도면1b

<i>Citrus sinensis</i>	M A N I D I E G L I P L I P E N D - G R U P K T K I V C T L G P A S R S U P M L E K L L R A G M N U A R F M F S H G T H E Y H Q E T L D N L R I A M H 73
<i>Glycine max</i>	M A N I D I E G L I P L I P E N D - G R U P K T K I V C T L G P A S R S U P M L E K L L R A G M N U A R F M F S H G T H E Y H Q E T L D N L R I A M H 73
<i>Lilium longiflorum</i>	M A N I D I E G L I P L I P E N D - G R U P K T K I V C T L G P A S R S U P M L E K L L R A G M N U A R F M F S H G T H E Y H Q E T L D N L R I A M H 73
NM_125763	M S N I D I E G L I P L I P E N D - G R U P K T K I V C T L G P A S R S U P M L E K L L R A G M N U A R F M F S H G T H E Y H Q E T L D N L R I A M H 73
<i>Oryza sativa</i>	M A N I D I E G L I P L I P E N D - G R U P K T K I V C T L G P A S R S U P M L E K L L R A G M N U A R F M F S H G T H E Y H Q E T L D N L R I A M H 74
<i>Solanum tuberosum</i>	M A N I D I E G L I P L I P E N D - G R U P K T K I V C T L G P A S R S U P M L E K L L R A G M N U A R F M F S H G T H E Y H Q E T L D N L R I A M H 73
<i>Capitum annuum</i>	M A N I D I E G L I P L I P E N D - G R U P K T K I V C T L G P A S R S U P M L E K L L R A G M N U A R F M F S H G T H E Y H Q E T L D N L R I A M H 73
<i>Citrus sinensis</i>	N T Q I L C A U M L D T K G P E I R T G F L K D G K P I Q L K E G Q E I T U S T D Y D I K G D E E M I S M S Y K K L P U D U K P G M T I L C A D G T 147
<i>Glycine max</i>	N T Q I L C A U M L D T K G P E I R T G F L K D G K P I Q L K E G Q E I T U S T D Y D I K G D E E M I S M S Y K K L P U D U K P G M T I L C A D G T 147
<i>Lilium longiflorum</i>	N T Q I L C A U M L D T K G P E I R T G F L K D G K P I Q L K E G Q E I T U S T D Y D I K G D E E M I S M S Y K K L P U D U K P G M T I L C A D G T 147
NM_125763	N T Q I L C A U M L D T K G P E I R T G F L K D G K P I Q L K E G Q E I T U S T D Y D I K G D E E M I S M S Y K K L P U D U K P G M T I L C A D G T 147
<i>Oryza sativa</i>	N T Q I L C A U M L D T K G P E I R T G F L K D G K P I Q L K E G Q E I T U S T D Y D I K G D E E M I S M S Y K K L P U D U K P G M T I L C A D G T 148
<i>Solanum tuberosum</i>	N T Q I L C A U M L D T K G P E I R T G F L K D G K P I Q L K E G Q E I T U S T D Y D I K G D E E M I S M S Y K K L P U D U K P G M T I L C A D G T 147
<i>Capitum annuum</i>	N T Q I L C A U M L D T K G P E I R T G F L K D G K P I Q L K E G Q E I T U S T D Y D I K G D E E M I S M S Y K K L P U D U K P G M T I L C A D G T 147
<i>Citrus sinensis</i>	I T L T V L S C D P P A G T V R C R C E N T A T L G E R K K V N L P G U V V D L P T L T E K D K E D I L E W G V P N N I D M I A L S F U R K G S D L 221
<i>Glycine max</i>	I T L T V L S C D P P A G T V R C R C E N T A T L G E R K K V N L P G U V V D L P T L T E K D K E D I L E W G V P N N I D M I A L S F U R K G S D L 221
<i>Lilium longiflorum</i>	I S L T V L S C D P P A G T V R C R C E N T A T L G E R K K V N L P G U V V D L P T L T E K D K E D I L E W G V P N N I D M I A L S F U R K G S D L 221
NM_125763	I S L T V L S C D P P A G T V R C R C E N T A T L G E R K K V N L P G U V V D L P T L T E K D K E D I L E W G V P N N I D M I A L S F U R K G S D L 221
<i>Oryza sativa</i>	I S L T V L S C D P P A G T V R C R C E N T A T L G E R K K V N L P G U V V D L P T L T E K D K E D I L E W G V P N N I D M I A L S F U R K G S D L 222
<i>Solanum tuberosum</i>	I T L T V L S C D P P A G T V R C R C E N T A T L G E R K K V N L P G U V V D L P T L T E K D K E D I L E W G V P N N I D M I A L S F U R K G S D L 221
<i>Capitum annuum</i>	I T L T V L S C D P P A G T V R C R C E N T A T L G E R K K V N L P G U V V D L P T L T E K D K E D I L E W G V P N N I D M I A L S F U R K G S D L 221
<i>Citrus sinensis</i>	U N U R K V L G P H A K R I Q L M S K V E N Q E G U V V F D E I L R E T D S F M V A R G D L G M E I P V E K I F L A Q K M M I Y K C N L A G K P V V 295
<i>Glycine max</i>	U N U R K V L G P H A K R I Q L M S K V E N Q E G U V V F D E I L R E T D S F M V A R G D L G M E I P V E K I F L A Q K M M I Y K C N L A G K P V V 295
<i>Lilium longiflorum</i>	U N U R K V L G P H A K R I Q L M S K V E N Q E G U V V F D E I L R E T D S F M V A R G D L G M E I P V E K I F L A Q K M M I Y K C N L A G K P V V 295
NM_125763	U N U R K V L G P H A K R I Q L M S K V E N Q E G U V V F D E I L R E T D S F M V A R G D L G M E I P V E K I F L A Q K M M I Y K C N L A G K P V V 295
<i>Oryza sativa</i>	U N U R K V L G P H A K R I Q L M S K V E N Q E G U V V F D E I L R E T D S F M V A R G D L G M E I P V E K I F L A Q K M M I Y K C N L A G K P V V 296
<i>Solanum tuberosum</i>	U N U R K V L G P H A K R I Q L M S K V E N Q E G U V V F D E I L R E T D S F M V A R G D L G M E I P V E K I F L A Q K M M I Y K C N L A G K P V V 295
<i>Capitum annuum</i>	U N U R K V L G P H A K R I Q L M S K V E N Q E G U V V F D E I L R E T D S F M V A R G D L G M E I P V E K I F L A Q K M M I Y K C N L A G K P V V 295
<i>Citrus sinensis</i>	T A T Q M L E S M I K S P R P T R A E A T D V A N A U L D G T D C U M L S G E S A A G A Y P E L A U K I M A R I C I E A E S S L D Y D A I F K E M I 369
<i>Glycine max</i>	T A T Q M L E S M I K S P R P T R A E A T D V A N A U L D G T D C U M L S G E S A A G A Y P E L A U K I M A R I C I E A E S S L D Y D A I F K E M I 369
<i>Lilium longiflorum</i>	T A T Q M L E S M I K S P R P T R A E A T D V A N A U L D G T D C U M L S G E S A A G A Y P E L A U K I M A R I C I E A E S S L D Y D A I F K E M I 369
NM_125763	T A T Q M L E S M I K S P R P T R A E A T D V A N A U L D G T D C U M L S G E S A A G A Y P E L A U K I M A R I C I E A E S S L D Y D A I F K E M I 369
<i>Oryza sativa</i>	T A T Q M L E S M I K S P R P T R A E A T D V A N A U L D G T D C U M L S G E S A A G A Y P E L A U K I M A R I C I E A E S S L D Y D A I F K E M I 370
<i>Solanum tuberosum</i>	T A T Q M L E S M I K S P R P T R A E A T D V A N A U L D G T D C U M L S G E S A A G A Y P E L A U K I M A R I C I E A E S S L D Y D A I F K E M I 369
<i>Capitum annuum</i>	T A T Q M L E S M I K S P R P T R A E A T D V A N A U L D G T D C U M L S G E S A A G A Y P E L A U K I M A R I C I E A E S S L D Y D A I F K E M I 369
<i>Citrus sinensis</i>	R S T P L P M S P L E S L A S S A - U R T A N K A K A K L I V U L T R G G T A K L V A K Y R P A U P I L S U V U P U L T T D S F D W T I S D E T P 442
<i>Glycine max</i>	R S T P L P M S P L E S L A S S A - U R T A N K A K A K L I V U L T R G G T A K L V A K Y R P A U P I L S U V U P U L T T D S F D W T I S D E T P 442
<i>Lilium longiflorum</i>	R S T P L P M S P L E S L A S S A - U R T A N K A K A K L I V U L T R G G T A K L V A K Y R P A U P I L S U V U P U L T T D S F D W T I S D E T P 442
NM_125763	R S T P L P M S P L E S L A S S A - U R T A N K A K A K L I V U L T R G G T A K L V A K Y R P A U P I L S U V U P U L T T D S F D W T I S D E T P 442
<i>Oryza sativa</i>	R S T P L P M S P L E S L A S S A - U R T A N K A K A K L I V U L T R G G T A K L V A K Y R P A U P I L S U V U P U L T T D S F D W T I S D E T P 443
<i>Solanum tuberosum</i>	R S T P L P M S P L E S L A S S A - U R T A N K A K A K L I V U L T R G G T A K L V A K Y R P A U P I L S U V U P U L T T D S F D W S I S D E T P 442
<i>Capitum annuum</i>	R S T P L P M S P L E S S I I S C P H G L T E L K Q N S I V U L T R G G T A K L V A K Y R P A U P I L S U V U P U L T T D S F D W S I S D E T P 443
<i>Citrus sinensis</i>	A R H S L I Y R G L I P L L G E S A K A T D S E S T E V I L E A A L K S A T A R R L C K P G D A U V A L H R I G A S V I K I C I V R 510
<i>Glycine max</i>	A R H S L I Y R G L I P L L G E S A K A T D S E S T E V I L E A A L K S A T A R R L C K P G D A U V A L H R I G A S V I K I C I V R 510
<i>Lilium longiflorum</i>	A R H S L I Y R G L I P L L G E S A K A T D S E S T E V I L E A A L K S A T A R R L C K P G D A U V A L H R I G A S V I K I C I V R 510
NM_125763	A R H S L I Y R G L I P L L G E S A K A T D S E S T E V I L E A A L K S A T A R R L C K P G D A U V A L H R I G A S V I K I C I V R 510
<i>Oryza sativa</i>	A R H S L I Y R G L I P L L G E S A K A T D S E S T E V I L E A A L K S A T A R R L C K P G D A U V A L H R I G A S V I K I C I V R 511
<i>Solanum tuberosum</i>	A R H S L I Y R G L I P L L G E S A K A T D S E S T E V I L E A A L K S A T A R R L C K P G D A U V A L H R I G A S V I K I C I V R 510
<i>Capitum annuum</i>	A R H S L I Y R G L I P L L G E S A K A T D S E S T E V I L E A A L K S A T A R R L C K P G D A U V A L H R I G A S V I K I C I V R 511

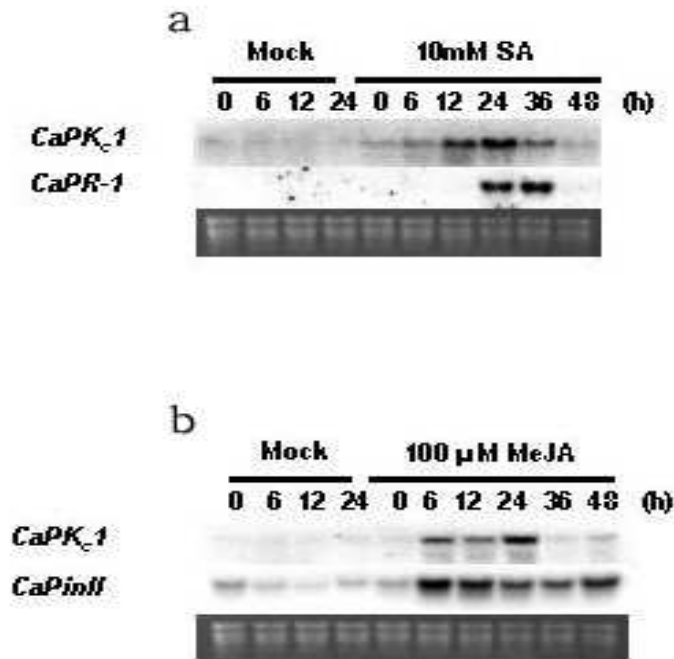
도면2



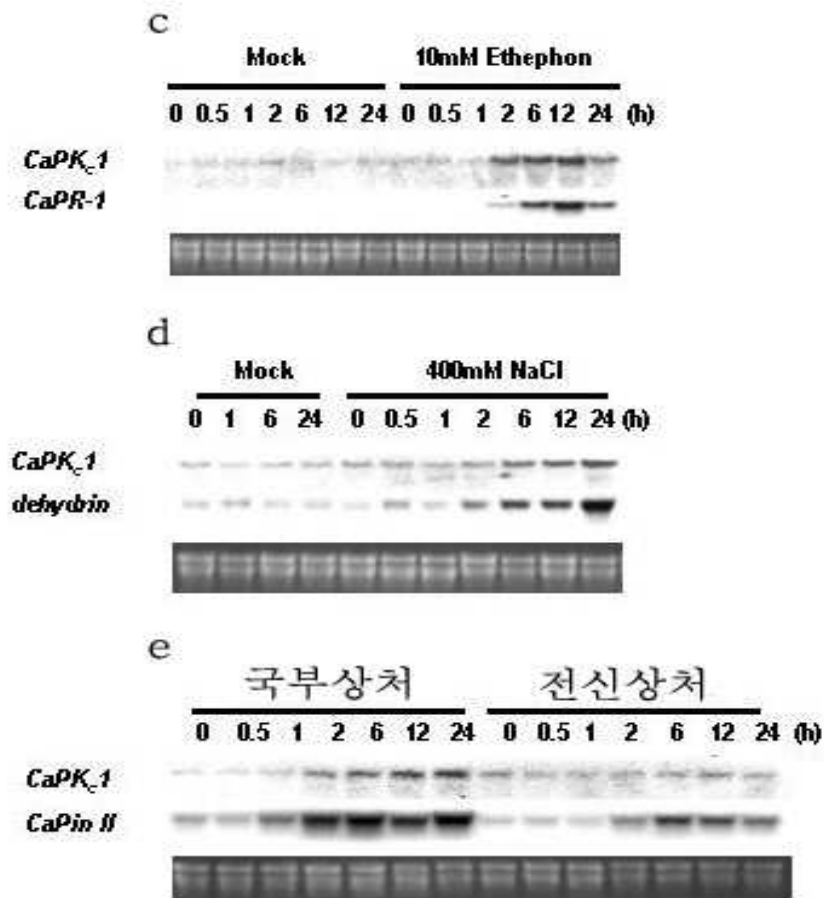
도면3



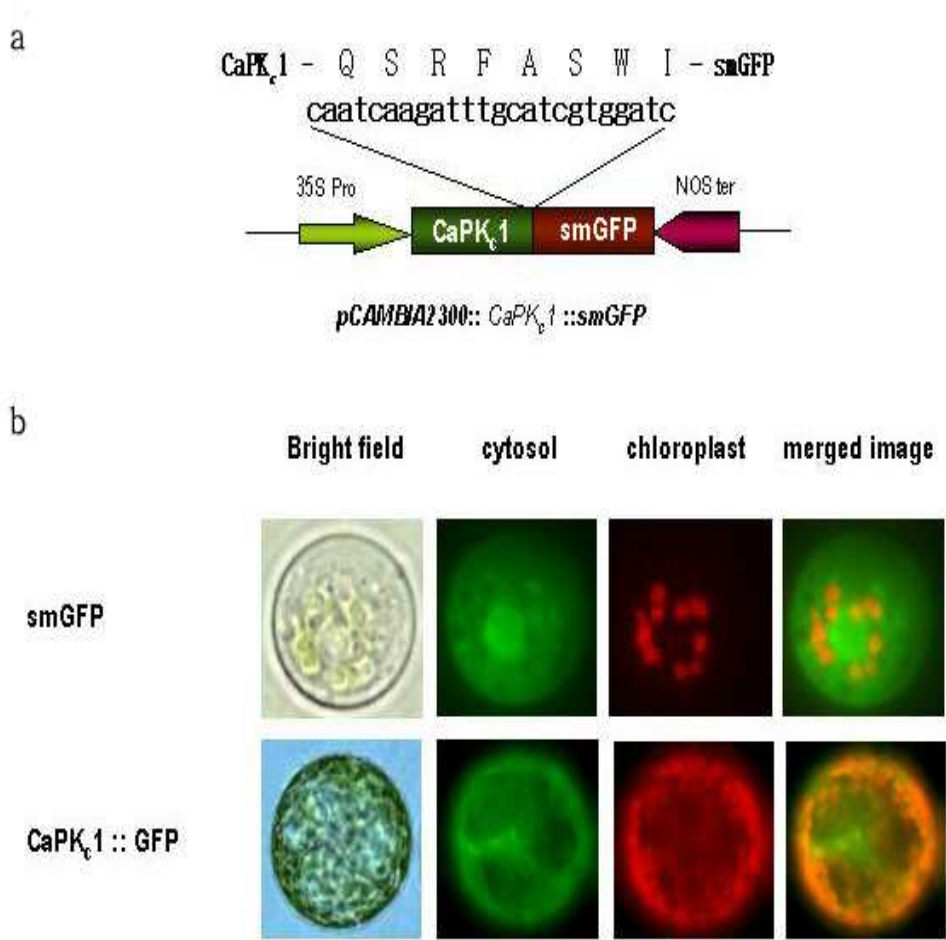
도면4a



도면4b



도면5



서열목록

<110>	PAEK, Kyung-Hee
<120>	The cytosolic pyruvate kinase homologus gene induced during the resistance response to Tobacco mosaic virus in Capsicum annum
<130>	5p-07-20
<160>	6
<170>	KopatentIn 1.71
<210>	1
<211>	1884
<212>	DNA
<213>	CaPKc1 sequence
<400>	1
tgctatactg tgttactagc ttgaatcttt agcttctctc ttgactgata tatagaagaa	

atggccaaca tagacatagc tggaatcatg aaggatctcc ccaatgatgg ccgtgtccca	120
aagaccaaga ttgtttgcac tttagggcca tcttctagat cagtgccaat gttagagaag	180
cttcttcgtg ctggcatgaa tggtgccagg ttttaactttt cccatgggac ccacgagtac	240
catcaggaga cattgaacaa tcttaagatt gcaatgcaga atactcagat tctatgtgct	300
gtcatgcttg ataccaaggg gcctgagatt cgaactgggt ttttaaagga tggaaaaccg	360
attcagctta aggaaggcca agaaatcact gtatccacag actataccat aaaaggaaat	420
gtagaaatga tctcaatgag ctataagaag ttggtagtgg acttgaagcc tggaaatacc	480
atcctgtgtg cagatggtac aattaccctt actgttttgt catgtgatcc agcggcggga	540
acggtgagat gtcgctgcga gaacactgcc accttaggag agaggaagaa tgtgaacctt	600
ccaggtgtgg ttgttgacct tccaacactt acggagaagg ataaagaaga tatactagag	660
tggggtgttc ctaacaacat cgatatgatt gctctttcat ttgtgcgcaa gggttcagat	720
cttgtcaatg ttcgcaaggt tcttggtcca catgccaaagc gcattcaact aatgtcaaag	780
gttgagaatc aggagggagt tgtcaacttc gatgaaatcc ttcgtgagac agattctttc	840
atggttgctc gaggtgatct cggaatggag attcctgttg agaagatttt cttggcccag	900
aagatgatga tatacaagtg taatcttgct ggtaagcctg tggtaactgc tactcagatg	960
cttgaatcaa tgatcaagtc tccacgaccc acccgtgctg aggctactga tgtggctaata	1020
gccgtcttgg atggcactga ctgtgttatg ttaagtgggg agagtgcagc tggagcttat	1080
cctgagttgg cggtaaaaat catggcacga atctgccttg aggcagagtc ttcacttgag	1140
tacgaggcta tcttcaagga aatgatcagg tgtactccat tgccaatgag cccattggat	1200
gagtctagca tcatcagctg tccgcacggg ctaacaaagc taaagcaaaa ctccattgtt	1260
gtccttacac gtggcgggag cacagcaaaa ctggttgcc aagtataggcc tgctgttcct	1320
attctttcag tagttgtgcc tgttttgact acagattctt tcgattgggt catcagtgc	1380
gagaccccag ctagacacag tttggtatat aggggcttga ttccaattct tggatgaaggt	1440
tcagcaaaaag ctactgattc tgaatcaact gaggtaatct tggaagcttc cttgaaatca	1500
gccacagaga aagggtatg ccaaccgggt gatgctgtcg tggcacttca tcgtattggt	1560
gctgcatctg ttatcaagat ttgcatcgtg aagtaaacad cgtgtcaaag ccttacgatt	1620

cttgagcccc cacctgtgct cagactgggt tccgttatgc tttctgggtt tgataatgca 1680
tctatatgct gattttgtca caatgtctta ggatatctta gtattatcac caaggattac 1740
gatataatttc atgttaattc catatctggt tcaaacactg gatttgaata aatataccttt 1800
ggtgcagcaa taccattttg ttattgtata aggaggaaga aagataaata ctttgaactt 1860
gagaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1884

<210> 2
<211> 511
<212> PRT
<213> CaPKc1 amino acid

<400> 2
Met Ala Asn Ile Asp Ile Ala Gly Ile Met Lys Asp Leu Pro Asn Asp
1 5 10 15
Gly Arg Val Pro Lys Thr Lys Ile Val Cys Thr Leu Gly Pro Ser Ser
20 25 30
Arg Ser Val Pro Met Leu Glu Lys Leu Leu Arg Ala Gly Met Asn Val
35 40 45
Ala Arg Phe Asn Phe Ser His Gly Thr His Glu Tyr His Gln Glu Thr
50 55 60
Leu Asn Asn Leu Lys Ile Ala Met Gln Asn Thr Gln Ile Leu Cys Ala
65 70 75 80
Val Met Leu Asp Thr Lys Gly Pro Glu Ile Arg Thr Gly Phe Leu Lys
85 90 95
Asp Gly Lys Pro Ile Gln Leu Lys Glu Gly Gln Glu Ile Thr Val Ser
100 105 110
Thr Asp Tyr Thr Ile Lys Gly Asn Val Glu Met Ile Ser Met Ser Tyr
115 120 125
Lys Lys Leu Val Val Asp Leu Lys Pro Gly Asn Thr Ile Leu Cys Ala
130 135 140
Asp Gly Thr Ile Thr Leu Thr Val Leu Ser Cys Asp Pro Ala Ala Gly
145 150 155 160
Thr Val Arg Cys Arg Cys Glu Asn Thr Ala Thr Leu Gly Glu Arg Lys
165 170 175
Asn Val Asn Leu Pro Gly Val Val Val Asp Leu Pro Thr Leu Thr Glu
180 185 190

Lys Asp Lys Glu Asp Ile Leu Glu Trp Gly Val Pro Asn Asn Ile Asp
 195 200 205
 Met Ile Ala Leu Ser Phe Val Arg Lys Gly Ser Asp Leu Val Asn Val
 210 215 220
 Arg Lys Val Leu Gly Pro His Ala Lys Arg Ile Gln Leu Met Ser Lys
 225 230 235 240
 Val Glu Asn Gln Glu Gly Val Val Asn Phe Asp Glu Ile Leu Arg Glu
 245 250 255
 Thr Asp Ser Phe Met Val Ala Arg Gly Asp Leu Gly Met Glu Ile Pro
 260 265 270
 Val Glu Lys Ile Phe Leu Ala Gln Lys Met Met Ile Tyr Lys Cys Asn
 275 280 285
 Leu Ala Gly Lys Pro Val Val Thr Ala Thr Gln Met Leu Glu Ser Met
 290 295 300
 Ile Lys Ser Pro Arg Pro Thr Arg Ala Glu Ala Thr Asp Val Ala Asn
 305 310 315 320
 Ala Val Leu Asp Gly Thr Asp Cys Val Met Leu Ser Gly Glu Ser Ala
 325 330 335
 Ala Gly Ala Tyr Pro Glu Leu Ala Val Lys Ile Met Ala Arg Ile Cys
 340 345 350
 Leu Glu Ala Glu Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Ala Ile Phe Lys Glu Met
 355 360 365
 Ile Arg Cys Thr Pro Leu Pro Met Ser Pro Leu Asp Glu Ser Ser Ile
 370 375 380
 Ile Ser Cys Pro His Gly Leu Thr Lys Leu Lys Gln Asn Ser Ile Val
 385 390 395 400
 Val Leu Thr Arg Gly Gly Ser Thr Ala Lys Leu Val Ala Lys Tyr Arg
 405 410 415
 Pro Ala Val Pro Ile Leu Ser Val Val Val Pro Val Leu Thr Thr Asp
 420 425 430
 Ser Phe Asp Trp Ser Ile Ser Asp Glu Thr Pro Ala Arg His Ser Leu
 435 440 445
 Val Tyr Arg Gly Leu Ile Pro Ile Leu Gly Glu Gly Ser Ala Lys Ala
 450 455 460
 Thr Asp Ser Glu Ser Thr Glu Val Ile Leu Glu Ala Ser Leu Lys Ser

465 470 475 480

Ala Thr Glu Lys Gly Leu Cys Gln Pro Gly Asp Ala Val Val Ala Leu

485 490 495

His Arg Ile Gly Ala Ala Ser Val Ile Lys Ile Cys Ile Val Lys

500 505 510

<210>	3
<211>	27
<212>	DNA
<213>	CaPKc1 sense primer

```
<400>      3
cccagctaga cacagtttgg tatatag                                     27
```

<210>	4
<211>	30
<212>	DNA
<213>	CaPKc1 antisense primer

```
<400>      4
tggtattgct gcaccaaagg atattttattc                                     30
```

```
<210>      5
<211>      26
<212>      DNA
<213>      CaPKc1 full length sense primer
```

```
<400>      5
gggatccatg gccaacatag acatag                                26
```

<210>	6
<211>	26
<212>	DNA
<213>	CaPKc1 full length antisense primer

```
<400>      6
gggatacctaa ggctttgaca cgatgt                                     26
```